

170921

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**BAZI TERMOFİLİK BAKTERİLERDEKİ KATALAZ AKTİVİTESİNİN  
İNCELENMESİ**

**Barbaros DİNÇER**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"Doktor"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26.07.2005  
Tezin Savunma Tarihi : 01.09.2005**

**Tez Danışmanı : Yrd.Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Jüri Üyesi : Prof.Dr. Asım KADIOĞLU**

**Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Murat KÜÇÜK**

**Jüri Üyesi : Prof.Dr. Oktay ARSLAN**

**Enstitü Müdürü :Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**Trabzon 2005**

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, bazı termofilik bakterilerdeki katalaz aktivitesinin incelenmesini içermektedir. Çalışmadaki deneysel kısımlar, Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Spektroskopi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tüm akademik yaşantım boyunca olduğu gibi, doktora çalışmamda da gerek konu seçiminde gerekse çalışmanın büyük bir aşamasında engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen rahmetli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Saadettin GÜNER'e sonsuz teşekkür eder, kendisine Allah'tan rahmet dilerim. Ruhunuz şad olsun.

Sonradan danışmanlığımı üstlenip, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Y.Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK'a teşekkür ederim.

Spektroskopik çalışmalarımda göstermiş oldukları yardım ve sabırdan dolayı Sayın Uzman Muammer ERDÖL'e teşekkür ederim.

Çalışmada bana her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na, Sayın Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, Sayın Doç.Dr. Ahmet Faik AYAZ'a, Sayın Y.Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya, Sayın Arş.Gör. Aykut SAĞLAM'a ve diğer Biyoloji Bölümü elemanlarına teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca bana vermiş oldukları her türlü yardım ve desteklerinden dolayı, Sayın Y.Doç.Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, Sayın Y.Doç.Dr. Murat KÜÇÜK'e, Sayın Arş.Gör. Esra ULUSOY'a ve Kimya Bölümü'ndeki diğer hocam ve mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi her konuda büyük desteğini gördüğüm sevgili eşim Deryanur DİNÇER'e, arkadaşlarıma, bütün hayatım boyunca her zaman yanımda oldukları ve desteklerini benden esirgemedikleri için sevgili anneme ve merhum babama, kardeşlerime en derin sevgi ve saygılarımı sunmayı borç bilirim.

Barbaros DİNÇER

Ağustos 2005

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET .....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Katalazlar .....	3
1.2.1. Tek İşlevli Katalazlar .....	4
1.2.2. Katalaz-Peroksidazlar .....	5
1.2.3. Mangan-Katalazlar (pseudokatalaz) .....	7
1.2.4. Katalazın Yapısı .....	8
1.2.5. Katalazların Reaksiyon Mekanizması .....	12
1.3. Katalazın Kullanıldığı Endüstri Alanları .....	14
1.4. Oksijen Serbest Radikalleri .....	15
1.5. Biyokimyasal Antioksidan Olarak Katalaz .....	16
1.6. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri .....	18
1.6.1. UV - Spektrofotometrik Yöntem .....	18
1.6.2. Titrimetrik Yöntem .....	18
1.6.3. Diğer Tayin Yöntemleri .....	19
1.7. Katalaz Aktivite Birimleri .....	19
1.8. Termofilik Mikroorganizmalar .....	20
1.8.1. Termofilliğin Moleküler Temelleri .....	23
1.9. Çalışmada Kullanılan Termofilik Bakterilerin Özellikleri .....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	30
2.1. Materyal .....	30
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar .....	30

2.1.2.	Çalışmada Kullanılan Termofilik Suşlar .....	31
2.1.3.	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	31
2.2.	Yöntemler .....	32
2.2.1.	Termofilik Bakterilerin Katalaz Kapasitesinin Belirlenmesi (Petri Testi) ..	32
2.2.2.	Termofilik Bakterilerin Sıvı Besi Ortamlarında Büyütülmesi .....	32
2.2.3.	Protein Miktarının Belirlenmesi .....	33
2.2.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	33
2.2.5.	Doğal Elektroforez .....	34
2.2.6.	Termofilik Katalazların Spektroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	34
2.2.7.	Termofilik Suşlardan Elde Edilen Katalazların Kinetiğinin İncelenmesi ...	35
2.2.8.	pH ve Sıcaklığın Katalaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi .....	35
2.2.9.	pH ve Isıl Kararlılığın Belirlenmesi .....	36
2.2.9.1.	$\Delta H$ , $\Delta S$ ve $\Delta G$ Değerlerinin Hesaplanması .....	36
2.2.9.1.1.	Hız Sabitinin Hesaplanması .....	36
2.2.9.1.2.	Aktivasyon Enerjisinin ( $E_a$ ) Hesaplanması .....	36
2.2.9.1.3.	Serbest Enerjinin ( $\Delta G$ ) Hesaplanması .....	37
2.2.9.1.4.	Entalpi ( $\Delta H$ ) Değişiminin Hesaplanması .....	37
2.2.9.1.5.	Entropi ( $\Delta S$ ) Değişiminin Hesaplanması .....	37
2.2.9.	Değişik İyon ve Deterjanların Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	38
3.	BULGULAR .....	39
3.1.	Termofilik Bakterilerin Katalaz Kapasitesi .....	39
3.2.	Doğal Elektroforez .....	41
3.3.	Termofilik Suşlardaki Protein Miktarı ve Katalaz Aktivitesi .....	44
3.4.	Termofilik Katalazların Spektroskopik Özellikleri .....	45
3.5.	pH ve Sıcaklığın Termofil Bakterilerdeki Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	51
3.6.	Termofilik Katalazların pH Kararlılıkları .....	58
3.7.	Termofilik Katalazların Isıl Kararlılıkları .....	64
3.6.	Termofilik Suşlardan Elde Edilen Katalazların Kinetiği .....	79
3.8.	Bazı İyon ve Deterjanların Termofilik Katalazların Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	90
4.	TARTIŞMA .....	94
5.	SONUÇLAR .....	100

6.	ÖNERİLER .....	102
7.	KAYNAKLAR .....	103
	ÖZGEÇMİŞ .....	114



## ÖZET

Bu çalışmada, K.T.Ü. Biyoloji Bölümü'nde bir araştırma grubunun izole ettiği bazı termofilik suşların endüstriyel bir enzim olan katalazı üretebilme kapasitesi belirlenerek, bu enzimin bazı kinetik verileri ve spektroskopik özellikleri ortaya kondu.

Bu çalışmada kullanılan termofilik suşların katalaz üretebildikleri petri testi ve doğal elektroforezle ortaya konarak, bu katalazların oldukça yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edildi. Özellikle, *Bacillus thermosphaericus* A3 suşu (A3) katalazının aktivitesi oldukça yüksek olduğu ve potansiyel bir katalaz kaynağı olabileceği görüldü. Tüm suşlardan elde edilen katalazların pH 7,0'de en yüksek aktivite gösterdikleri belirlendi. A3, *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 suşu (Ay9), *Saccharococcus caldoxylolyticus* TK4 suşu (TK4), *Anoxybacillus gonensis* A9 suşu (A9), *Anoxybacillus gonensis* A5 suşu (A5) ve *Anoxybacillus gonensis* A6 suşu (A6) katalazlarının geniş bir pH aralığında kararlı oldukları görüldü.

Çalışmada kullanılan suşlara göre katalaz aktivitesi düşük olmasına rağmen A2 katalazının, hem daha termofilik hem de daha alkalofilik olduğu tespit edildi. Bunun yanında Ay9, TK4, *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 suşu (K1) ve A5 katalazlarının da 50 °C'ye kadar aktivitelerini büyük oranda korudukları belirlendi.

Katalazların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratına ilgisinin sırasıyla A3>TK4>A9>Ay9>A5>A4>K4>A2>K1>A6 şeklinde olduğu tespit edildi. Yapılan inhibisyon çalışmasında, tüm suşlardan elde edilen katalazların 0,5 mM NaN<sub>3</sub>, KCN ve HgCl<sub>2</sub> ile %100'e yakın bir oranda inhibe oldukları görüldü.

En yüksek aktiviteyi gösteren 10 suştan elde edilen katalazların hepsinin 408-417 nm arasında hem grubunu gösteren Soret pikini verdikleri ve bu katalazların indirgenmesiyle 520 ile 550 nm civarında α-bandı ve β-bandı piklerini gösterdikleri tespit edildi.

Kısaca çalışmada kullanılan termofilik suşların yüksek katalaz aktivitesine sahip olmalarından dolayı, hidrojen peroksidin kullanıldığı endüstri alanları için potansiyel katalaz kaynağı olarak kullanılabilirliği önerilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Katalaz, hidrojen peroksit oksidoredüktaz, termofilik bakteri

## SUMMARY

### Investigation of Catalase Activities from Some Thermophilic Bacteria

In this study, the capacity of some thermophilic species that were isolated by a research group in the Department of Biology of K.T.U. to produce catalase, an industrial enzyme, was investigated, and some kinetic parameters and spectroscopic properties of these catalase enzymes were determined.

The catalase-producing ability of these thermophilic species was explored by petri test and native electrophoresis. The catalases were shown to possess considerably high activity. The catalase activity of *Bacillus thermosphaericus* A3 (A3) was found to be especially high and this species appears to be a good industrial source of this enzyme. The catalases of all the species exhibited the highest activity at pH 7.0. The catalases of A3, *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 (Ay9), *Saccharococcus caldoxylolyticus* TK4 (TK4), *Anoxybacillus gonensis* A9 (A9), *Anoxybacillus gonensis* A5 (A5), and *Anoxybacillus gonensis* A6 (A6) were found to be stable at a wide pH range.

Although its activity was lower than that of other species used in the investigation, the catalase of A2 species was both more thermophilic and more alkalophilic. In addition, the catalases of Ay9, TK4, *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 (K1), and A5 preserved their activity up to 50 °C.

The affinity of the catalases for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate was in the order A3>TK4>A9>Ay9>A5>A4>K4>A2>K1>A6. Inhibition studies showed that all the catalases were inhibited almost to 100% by 0.5 mM NaN<sub>3</sub>, KCN and HgCl<sub>2</sub>.

The catalases obtained from ten species having the highest activity were observed to give Soret peak between 408-417 nm showing the heme group, and the reduction of these catalases yielded  $\alpha$ -band and  $\beta$ -band peaks around 520-550 nm.

In conclusion, the thermophilic species tested in this study were found, because of their high catalase activity, to be a potential source of catalase for the industries utilizing hydrogen peroxide.

**Key words:** Catalase, hydrogen peroxide oxidoreductase, thermophilic bacteria

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Ferriprotoporfirin IX yapısı .....	4
Şekil 2. Katalazın aktif bölgesinin şematik gösterimi .....	9
Şekil 3. Aktif bölgede bulunan kanalın yapısı .....	10
Şekil 4. Hamur mayasından elde edilen katalaz A'nın kanal yapısı .....	11
Şekil 5. Altbirim bölgelerinin şematik gösterimi .....	12
Şekil 6. A) Bileşik-I, B) Demir ile koordinasyon oluşturmuş O-O bağı .....	13
Şekil 7. Termofilik suşlardaki katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonuçları .....	39
Şekil 8. Termofilik suşlardaki katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonuçları .....	40
Şekil 9. Termofilik suşlardan elde edilen özütlerdeki katalaz aktivitesi için yapılan doğal elektroforez jeli .....	41
Şekil 10. Termofilik suşlardan elde edilen özütlerin doğal protein elektroforezi .....	42
Şekil 11. A3 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	45
Şekil 12. Ay9 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	46
Şekil 13. TK4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	46
Şekil 14. A9 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	47
Şekil 15. K1 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	48
Şekil 16. A4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	48
Şekil 17. K4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	49
Şekil 18. A5 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	49
Şekil 19. A6 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	50
Şekil 20. A2 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu .....	51
Şekil 21. Termofilik suşlardan elde edilen katalazların aktivite-pH değişimi .....	52
Şekil 22. A3 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	52
Şekil 23. Ay9 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	53
Şekil 24. TK4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	54
Şekil 25. A9 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	54
Şekil 26. K1 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	55
Şekil 27. A4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	55



Şekil 28. K4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	56
Şekil 29. A5 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	57
Şekil 30. A6 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	57
Şekil 31. A2 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi .....	58
Şekil 32. A3 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	59
Şekil 33. Ay9 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	59
Şekil 34. TK4 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	60
Şekil 35. A9 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	60
Şekil 36. K1 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	61
Şekil 37. A4 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	61
Şekil 38. K4 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	62
Şekil 39. A5 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	62
Şekil 40. A6 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	63
Şekil 41. A2 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği .....	64
Şekil 42. A3 katalazının termal kararlılık grafiği .....	65
Şekil 43. A3 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	65
Şekil 44. Ay9 katalazının termal kararlılık grafiği .....	66
Şekil 45. Ay9 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	67
Şekil 46. TK4 katalazının termal kararlılık grafiği .....	68
Şekil 47. TK4 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	68
Şekil 48. A9 katalazının termal kararlılık grafiği .....	69
Şekil 49. A9 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	70
Şekil 50. K1 katalazının termal kararlılık grafiği .....	71
Şekil 51. K1 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	71
Şekil 52. A4 katalazının termal kararlılık grafiği .....	72
Şekil 53. A4 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	73
Şekil 54. K4 katalazının termal kararlılık grafiği .....	74
Şekil 55. K4 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	74
Şekil 56. A5 katalazının termal kararlılık grafiği .....	75
Şekil 57. A5 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	76
Şekil 58. A6 katalazının termal kararlılık grafiği .....	77
Şekil 59. A6 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	77
Şekil 60. A2 katalazının termal kararlılık grafiği .....	78

Şekil 61. A2 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği .....	79
Şekil 62. A3 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	81
Şekil 63. A3 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	81
Şekil 64. Ay9 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	82
Şekil 65. Ay9 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	82
Şekil 66. TK4 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	83
Şekil 67. TK4 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	83
Şekil 68. A9 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	84
Şekil 69. A9 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	84
Şekil 70. K1 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	85
Şekil 71. K1 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	85
Şekil 72. A4 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	86
Şekil 73. A4 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	86
Şekil 74. K4 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	87
Şekil 75. K4 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	87
Şekil 76. A5 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	88
Şekil 77. A5 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	88
Şekil 78. A6 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	89
Şekil 79. A6 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği.....	89
Şekil 80. A2 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği .....	90
Şekil 81. A2 katalazının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği .....	90

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Reaktif Oksijen Türleri .....	16
Tablo 2. Biyolojik Sistemlerdeki Antioksidanlar .....	17
Tablo 3. Katalaz aktivite ölçüm yöntemleri .....	19
Tablo 4. Termofilik organizmalarından elde edilen bazı enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar .....	23
Tablo 5. Termofilik suşların isimleri ve izole edildikleri yerler .....	26
Tablo 6. Diyadin (Ağrı), Kestanbol (Çanakkale) ve Gönen (Balıkesir) kaplıcalarından elde edilen izolatların biyokimyasal özellikleri .....	28
Tablo 7. Termofilik katalazlara ait Rf değerleri ve molekül ağırlıkları .....	43
Tablo 8. Termofilik suşlardan elde edilen ekstraktların protein miktarları ve katalaz aktiviteleri .....	44
Tablo 9. A3 katalazına ait termodinamik parametreler .....	66
Tablo 10. Ay9 katalazına ait termodinamik parametreler .....	67
Tablo 11. TK4 katalazına ait termodinamik parametreler .....	69
Tablo 12. A9 katalazına ait termodinamik parametreler .....	70
Tablo 13. K1 katalazına ait termodinamik parametreler .....	72
Tablo 14. A4 katalazına ait termodinamik parametreler .....	73
Tablo 15. K4 katalazına ait termodinamik parametreler .....	75
Tablo 16. A5 katalazına ait termodinamik parametreler .....	76
Tablo 17. A6 katalazına ait termodinamik parametreler .....	78
Tablo 18. A2 katalazına ait termodinamik parametreler .....	79
Tablo 19. Termofilik katalazlara ait bazı kinetik veriler .....	80
Tablo 20. Termofilik katalazların aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisi .....	92
Tablo 21. Termofilik katalazların aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisi .....	92
Tablo 22. Termofilik katalazların aktivitesi üzerine bazı iyon ve deterjanların etkisi	93

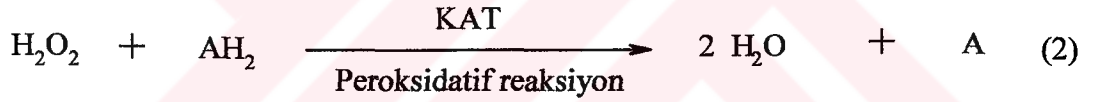
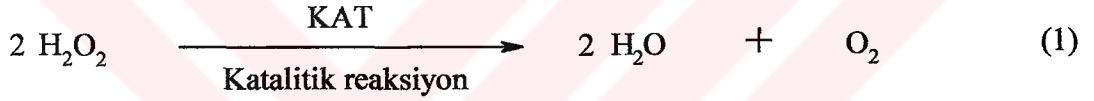
## SEMBOLLER DİZİNİ

A2	:	<i>Bacillus gonensis</i> A2 suşu
A3	:	<i>Bacillus thermosphaericus</i> A3 suşu
A4	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A4 suşu
A5	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A5 suşu
A6	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A6 suşu
A7	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A7 suşu
A9	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A9 suşu
Ay13	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay13 suşu
Ay2	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay2 suşu
Ay5	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay5 suşu
Ay8	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay8 suşu
Ay9	:	<i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 suşu
G1	:	<i>Bacillus thermoleovarans</i> G1 suşu
G2	:	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 suşu
K1	:	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> K1 suşu
K3	:	<i>Anoxybacillus thermosphaericus</i> K3 suşu
K4	:	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> K4 suşu
KAT	:	Katalaz
KP	:	Katalaz-peroksidaz
MK	:	Mangan-katalaz
TK4	:	<i>Saccharococcus caldoxylolyticus</i> TK4 suşu
U	:	Unite

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Katalaz (KAT) (Hidrojen Peroksit; Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz, E.C. 1.11.1.6),  $H_2O_2$ ' in su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen, tetramerik demir porfirin içeren, yüksek molekül ağırlıklı bir antioksidan enzimdir (Brown-Peterson ve Salin, 1995; Gonçalves vd., 1999; Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). KAT yüksek konsantrasyonlarda  $H_2O_2$ 'i indirgeyebildiği gibi (Reaksiyon 1) düşük  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite de gösterebilir (Reaksiyon 2) (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999; Ahmad, 2001).



Doğada geniş bir dağılım gösteren katalaz, aerobik mikroorganizmalarda, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer ve Grabl, 1983; Aebi, 1984; Baldwin, 1997). KAT'lar bütün organizmalarda birbirlerine benzerlik gösterirler. Molekül ağırlıkları yaklaşık 225-270 kDa olan KAT'ların, her biri bir demir *hem* (protoporfirin IX) yapısına sahip dört alt birimden oluşmaktadır. Bu enzimler, geniş bir pH (4-10) ve sıcaklık (20-50 °C) aralığında aktivite gösterebilmektedirler. Katalazlar, özgün olarak 3-amino-1,2,4-triazol ile inhibe olmaktadır (Darr ve Fridovich, 1986; Kim vd., 1994; Brown-Peterson ve Salin, 1995; Ahmad, 2001; Thompson vd., 2003;). Ayrıca, pH 4,5-5,5 arasında izoelektrik (pI) noktaya sahiptirler (Chary ve Natvig, 1989; Baldwin, 1997).

Genel olarak KAT'lar, tipik tek işlevli katalazlar, peroksidatif aktiviteye sahip katalaz-peroksidaz ve Mangan-katalaz (pseudokatalaz) olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar (Kagawa vd., 1999; Thompson vd., 2003). Tek işlevli katalazlar ile katalaz-peroksidazlar

birbirinden farklı iki enzim gibi görülmelerine rağmen, baz dizilerinde benzerlik gösterirler. Hem proteinlerinin klasik inhibitörü olan siyanür ve azid ile kolayca inhibe olurlar. Mangan-katalazlar ise bu enzimlerden farklı olarak aktif bölgelerinde hem prostetik grubu yerine  $Mn^{+2}$  iyonlarını içerdikleri için siyanür ve azid ile inhibe olmazlar (Thompson vd., 2003).

KAT'ın antioksidan işlevleri çok iyi bilinmektedir. Pek çok hayvan hücresinde katalazın büyük bir kısmı,  $H_2O_2$  konsantrasyonunun  $10^{-4}$  M'dan yüksek olduğu peroksizomlarda, çok az miktarda da mitokondri matriksinde bulunur. Moleküler oksijenin hücresel metabolik işlemleri; superoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif olan oksijen türleri oluşumu ile son bulur. Bu radikallerin birikmesi sonucunda hücreler zarar görür. Toksik  $O_2^-$  radikali, superoksit dismutaz tarafından dismutasyon yoluyla  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülerek hücreye zarar vermesi engellenir. Ayrıca, oluşan  $H_2O_2$  radikalinin katalaz tarafından su ve oksijene indirgenmesi ile de hücrenin bir kez daha zarar görmesi önlenir (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999).

Günümüz endüstrisinde klasik kimyasal yöntemlerin yerini biyoteknolojik uygulamalar almaktadır. Endüstriyel enzimler arasında yer alan katalazlar; gıda, süt, tekstil, kağıt gibi ağartma işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında, hidrojen peroksidin ortamdaki uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Akertek ve Tarhan, 1995; Dhaese, 1996; Costa vd., 2001). Son yıllarda, özellikle bu endüstri alanlarında  $H_2O_2$ 'in ağartıcı olarak kullanımının artması, üretim aşamalarında bazı sorunlara sebep olabilmektedir (Weck, 1991). Bu aşamalarda,  $H_2O_2$ 'in ortamdaki uzaklaştırılması için ya aşırı miktarda su ile yıkanmakta ya da atık suda yüksek tuz konsantrasyonuna sebep olan sodyum bisülfid veya hidrosülfid ile indirgenmesi yöntemi kullanılmaktadır (Hillenbrand, 1999; Fruhwirth vd., 2002).

Biyoteknolojinin de katkısıyla enzimler, birçok endüstriyel işlemleri hem daha ılımlı şartlarda gerçekleştirilmekte, hem de oluşan yan ürünlerin çevreye verdikleri zararlar en aza indirgemektedirler. Enzimler bu avantajlara sahip olmalarına rağmen yakın zamana kadar bazı önemli endüstri dalları haricinde kullanımları çok yaygın değildi. Ancak son yıllarda; enzim üretim, saflaştırma, türevlendirme teknolojilerindeki ve biyoteknolojideki gelişmelere bağlı olarak hızla uygulama alanı bulmuştur. Enzimlerin sınırlı uygulama alanları bulmasında en önemli etken, enzimlerin saflaştırılma işlemlerinin zahmetli ve pahalı olmasıdır. Bir hücre içerisindeki enzimi, yüksek düzeyde etkinliğini koruyarak ve zarar görmeden ayırmak için çeşitli yöntemlerin uygulanması gerekir. Ayrıca, enzimler

hücre dışına alındıklarında genellikle kararsızdırlar ve değişen mikro çevreleri nedeniyle doğal yapılarını kolayca kaybedebilirler. Enzimlerin pek çoğu sulu ortamda çözünme özelliğindedirler. Bu özelliklerinden dolayı enzimler, eğer endüstriyel bir işlemde kullanılmışlarsa onları sulu ortamdan geri kazanmak zordur ve de ekonomik değildir. Ayrıca, enzimlerle katalizlenen endüstriyel bir işlemin sonlandırılmasında, enzim kolayca sulu ortamdan uzaklaştırılmadığı için, enzimatik reaksiyon ancak inhibitör (aktivite durdurucu veya önleyici) denilen maddeler varlığında gerçekleştirilebilir. Bunun sonucunda, saf olarak elde edilmek istenilen ürünlerin bulunduğu ortamlara yeni maddeler ilave edildiği için, safsızlık söz konusu olacaktır. Bu kirliliklerin uzaklaştırılmasının ürün maliyetini artıracığı da açıktır.

Katalazın kullanıldığı endüstri alanlarında  $H_2O_2$ ' in ortamdan uzaklaştırılması işlemi yüksek sıcaklık ve pH'larda gerçekleştirilmektedir. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen katalazlar, mezofilik mikroorganizmalardan daha fazla ısı kararlılığına sahiptirler. Bundan dolayı termofilik katalazlar endüstrinin ihtiyaç duyduğu enzimlerin önemli bir sınıfını oluştururlar. Buna rağmen, termofilik mikroorganizmalarda katalazla ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır.

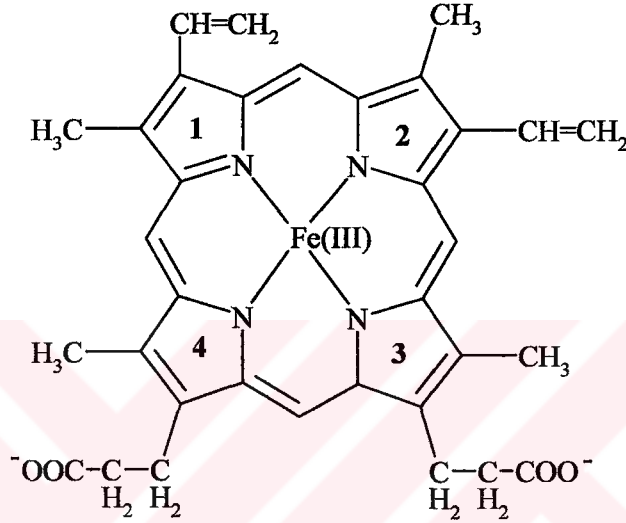
Bu çalışmada, KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü araştırmacıları tarafından (Dülger, 1997; Çanakçı, 2003) izole edilmiş olan termofilik bakterilerin katalaz kapasiteleri belirlenerek, bu enzimin en uygun çalışma koşulları ve kinetik bazı parametreleri incelenecektir. Ayrıca, bu termofilik katalazların, pH ve ısı (termal) kararlılığı yanında deterjanlar, çeşitli iyonlar ve reaktifler varlığında aktivitelerinin değişimi belirlenecektir.

## 1.2. Katalazlar

Katalazların yapısı (hidroperoksidazlar), ilk olarak 1901 yılında (Loew, 1901) aydınlatılmış ve günümüze kadar araştırmalar devam etmiştir (Chelikani, 2004). KAT'lar homotetramer bir yapıya sahip olup, her bir altbirimi kovalent bağlı olmayan yüksek spinli Fe (III) içeren ve protoferrihem (protoporfirin IX) olarak bilinen hem prostetik grup içerir (Şekil 1) (Chelikani, 2004). Katalazların, önemli aktiviteye sahip, baz dizisi ve yapısal olarak birbirinden farklı üç tip protein yapıları bulunmaktadır. Katalazlar genel olarak, tipik tek işlevli katalazlar, peroksidatif aktiviteye sahip katalaz-peroksidaz ve Mangan-katalaz

(pseudokatalaz) olmak üzere üç sınıfta toplanmaktadır (Kagawa vd., 1999; Thompson vd., 2003; Chelikani, 2004).

Hem içeren katalazlar karakteristik olarak 420 nm'de Soret piki verirler. Ayrıca aktif bölgede hem grubunun merkezinde yer alan  $Fe^{+3}$  520-550 nm arası pik vermezken, bu demir atomunun  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmesi sonucu bu bölgede absorbands gösterir (Dos Santos vd., 2000; Zou ve Schrempf, 2000; Ro vd., 2003; Baker vd., 2004).



Şekil 1. Ferriprotoporfirin IX yapısı

### 1.2.1. Tek İşlevli Katalazlar

Tek işlevli katalazlar, doğada oldukça geniş bir yayılım gösterirler. Bu tür katalazlar, hem içeren 60-75 arasında molekül ağırlıklarına sahip altbirimler içermektedirler. Tek işlevli katalazların,  $H_2O_2$ 'yi bozmaları iki adımda gerçekleşen bir reaksiyon mekanizması içermektedir. Birinci adım; bir oksijen peroksit molekülü katalazın hem demiri ile etkileşerek, oksijence zengin demir peroksit (Porphirin katyon radikali; bileşik I) ve bir mol su oluşturmasıyla gerçekleşir (Dounce, 1983; Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999; Dinçer, 2000; Chelikani, 2004).





İkinci adım; başka bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün bileşik I ile reaksiyona girerek su ve oksijene indirgenmesiyle son bulur (Dounce, 1983; Chaudiere vd., 1999; Dinçer, 2000; Chelikani, 2004).



Son yüzyıldan beri katalazın karakterizasyonu çalışılmaktadır. Fakat bu enzimlerin tam olarak karakterize edildiği birkaç çalışma mevcuttur. Birbirinden bağımsız olarak yapılan, katalazın aktivite ve özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarının karşılaştırılmasında farklı bulguların elde edildiği gözlenmiştir. Örneğin, 16 yaygın katalazın karşılaştırılmasında sekiz yapının tespit edilmesi, katalaz ailesi özelliklerinin ne kadar farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır (Switala ve Loewen, 2002).

Katalazlar düşük substrat konsantrasyonları hariç Michaelis-Menten kinetiğine uymazlar ve yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında, farklı katalazlar farklı şekilde etkilenirler. Bazı küçük altbirimli katalazların, 300-500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun üzerine çıkıldığında inhibe olduğu ve bu katalazlara ilişkin hazırlanan substrat doygunluk eğrisinin düşük substrat konsantrasyonlarında ekstrapolasyon olmasından dolayı Michaelis-Menten kinetiğindeki V<sub>maks</sub> değerine ulaşamadığı görülmüştür. Büyük yapıli altbirimlere sahip katalazlar, 3 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerinde inhibe olmaya başlamış ve V<sub>maks</sub> değerine ulaşamamıştır. Bu nedenle, elde edilen V<sub>maks</sub> ve K<sub>m</sub> değerleri Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı için yanıltıcıdır. Katalazların protein dizilerindeki farklılıklar oldukça farklı reaksiyon eğilimlerinin ve substrat ilgilerinin olmasından kaynaklanmaktadır (Chelikani, 2004). Ayrıca, tek işlevli katalazlar ditiyonitli ortamda aktivite kaybına karşı direnç gösterirler ve kolay indirgenemezler (Terzenbach ve Blaut, 1998).

### 1.2.2. Katalaz-Peroksidazlar

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

sonucunda indirgenmesinden kaynaklanmaktadır (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999; Halliwell, 1999; Carpena vd., 2003).



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

İlk olarak, katalaz-peroksidaz HPI *E. coli*' den 1979'da (Claiborne vd., 1979) izole ve karakterize edilmiştir. İlk katalaz-peroksidaz gen dizisi, 1988 yılında (Triggs-Raine vd., 1988) *katG* gen dizisiyle ortaya çıkmış ve filogenetik olarak, bitki peroksidazlarına bağlantılı olduğu görülmüştür (Chelikani, 2004). Anti-verem ilaçlarında yaygın olarak kullanılan izoniazidin aktivasyonunu (INH) *Mycobacterium tuberculosis*'deki KatG'nin sağladığı ve katalaz-peroksidazları görünür hale getirdiği bulunmuştur (Zhang vd., 1992). Bu proteinin, ilaçla olan bu etkileşiminden dolayı dünyanın birçok yerinde, moleküler seviyede karakterize edilebilmesi için kristallendirme çalışmaları yapılmıştır. 1987' de yapılan *E. coli*' den HPI ve *M. tuberculosis* katalaz-peroksidaz kristallendirme çalışmaları başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Katalaz peroksidazların kristallendirilmesi ilk olarak, halofilik archaebacterium *Haloarcula marismortui*'nde elde edilen katalaz-peroksidazla (Yamada vd., 2001) gerçekleştirilmiş, bunu bir siyanobakteri olan *Synechococcus*'dan (Wada vd., 2002) ve gram negatif bakteri olan *Burkholderia pseudomallei* (BpKatG)'den (Carpena vd., 2002) izole edilen, katalaz-peroksidazların kristallendirilmesi takip etmiştir.

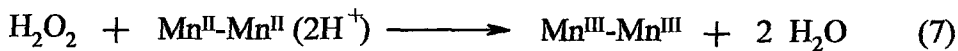
Katalaz-peroksidazların yapısı, iki dimerik altbirimin asimetrik yerleşmesinden oluşmaktadır. Katalaz-peroksidazların her altbiriminde, 20  $\alpha$ -heliks yapıya sahip birimlerin üç veya dört  $\beta$ -silindir yapısına sahip birimlerle birbirine bağlanmasıyla oluşan yapıları, tek işlevli katalazlardan oldukça farklılık göstermektedir (Carpena vd., 2002). Katalaz-peroksidazın yapısının en çok göze çarpan özelliği, aktif bölgesinde bulunan Trp'nun (BpKatG 111. aminoasit) indol halkasının ve Met'inin (BpKatG 264. aminoasit) kükürdünün, Tyr (BpKatG 238. aminoasit) halkasına orto-pozisyonundan kovalent olarak bağlanmasıdır. Bu yapı, elektron yoğunluk haritasıyla açık bir şekilde ortaya konulmuştur. Ama bu kovalent bağ beklenenden biraz daha uzun ve incedir. Tyr ile Trp arasındaki bu kovalent bağ düzlemsel olduğu için, tam bir sp<sup>2</sup> hibrit karakterine sahip değildir (Donald

vd., 2003). Aktif bölgede bulunan Trp, katalitik aktivite için önemlidir. Trp'inin Phe ile yeri değiştirildiğinde, KP'in katalitik aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir (Regelsberger vd., 2000; Hillar vd., 2000; Regelsberger vd., 2001). Met<sup>264</sup> ve Tyr<sup>238</sup> için yapılan yer değiştirme çalışmalarında, katalaz aktivitesinin benzer şekilde etkilendiği, fakat peroksidaz aktivitesinin değişmediği belirtilmiştir. Bunun sonucunda da, bu üçlünün katalitik aktivite için gerekli olduğu, peroksidatik aktivite için gerekli olmadığı bulunmuştur (Donald vd., 2003; Jakopitsch vd., 2003).

### 1.2.3. Mangan-Katalazlar (pseudokatalaz)

Mangan-katalazlar (MK) önceleri, hem grubu içermedikleri için pseudokatalazlar olarak anılmışlardır (Kono ve Fridovich, 1983). Sonraları, yapılarına daha uygun olduğu düşünülen Mn-içeren (Allgood ve Perry, 1986), hem içermeyen (Nicholls vd., 2001), dimanganez katalaz (Antonyuk vd., 2000) olarak adlandırılmışlardır. Hem içermeyen katalazlar, hem içeren katalazlar gibi geniş bir dağılım göstermemekte ve yalnız birkaç tür bakteride bulunmaktadır. Bu tip enzimlerin doğada yaygın olarak bulunmamasının nedeninin, diğer katalazlara göre, daha az özgün aktiviteye sahip olmaları ve birçok bakteride karmaşık yapılarda bulunuyor olmalarından dolayı olduğu düşünülmektedir (Klotz ve Loewen, 2003).

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



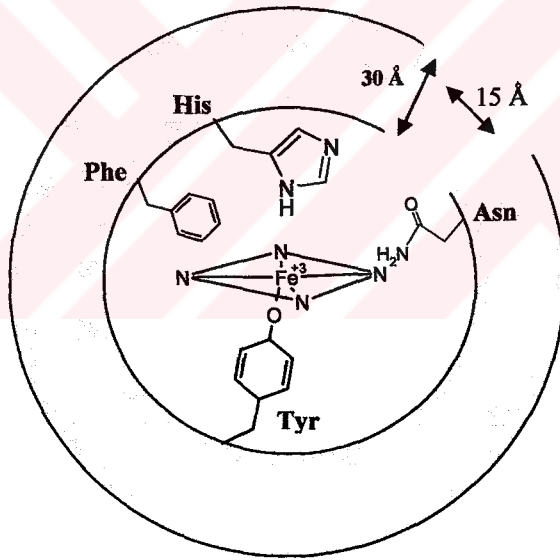
Bu reaksiyonlar hem içeren katalazların reaksiyonlarına benzeseler bile, genel olarak farklılık göstermektedirler. Yükseltgenmenin aktif bölgedeki elektronların uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmesine rağmen, reaktif olan bir ara ürün oluşmamaktadır. Sonuç olarak, ikinci adım reaktif bir ara ürünün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

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

#### 1.2.4. Katalazın Yapısı

Birçok farklı türde katalazın X-ray çalışmaları yapılmıştır. Katalazlar bazı farklılıklar göstermelerine rağmen genel bir yapıya sahiptirler. Sığır ciğerinden elde edilen katalazın yapısı ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Unwin, 1975). Tek işlevli katalazlar tetramer yapıya sahiptirler. Her bir altbirim, ortasında gömülü bir hem ve yüzeylerinde uzanmış bir NADPH içerir (Bravo vd., 1997). Yalnızca bitkisel katalazlarda NADPH bulunmamaktadır (Beaumont vd., 1990). NADPH, katalitik aktivite için gerekli olmadığı, katalazı  $H_2O_2$  substratının oksidasyonundan koruduğu belirtilmiştir (Chuan vd., 1988). Ayrıca, NADPH'nin enzimin inaktif formu olan bileşik II'yi indirgeyerek aktif duruma getirdiği tahmin edilmekte (Kirkman ve Gaetani, 1984; Green, 2001;), fakat mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Hillar vd., 1994; Olson ve Bruce, 1995). Bunun yanında katalazın bu grubundan dolayı ATP sentezinde kullanıldığı literatürlerde yer almaktadır (Villaume vd., 1988). Hem, protoporfirin halkası ve bu halkanın merkezinde bir demir (Fe) atomu içeren yapıya sahiptir. Protoporfirin halkası, dört pirolinin metan köprüleri ile birbirine bağlanmasından oluşur (Şekil 1). Bu demir atomu ferrous ( $Fe^{2+}$ ) veya ferik ( $Fe^{3+}$ ) okside

formlarında olabilir. Her bir altbirimi 30 Å uzunluğunda ve 15 Å genişliğinde huni şeklinde bir substrat giriş kanalına sahiptir (Şekil 2) (Murthy, 1981; Belal vd., 1989). Bu kanalın giriş kısmında hidrofilik aminoasit, hem merkezine doğru daralan kısmında ise hidrofobik aminoasit birimleri yer almaktadır. Bu dar kanal,  $H_2O_2$  den daha büyük moleküllerin aktif bölgeye girişlerini önlemektedir (Belal, 1989). Heme yakın ve uzak olan bölgeler oldukça farklı çevrelere sahiptirler. Heme yakın olan bölge Val<sup>145</sup>, His<sup>217</sup>, Pro<sup>335</sup>, Arg<sup>353</sup>, Ala<sup>356</sup> ve Tyr<sup>357</sup> aminoasitleri ile çevrelenmiştir (Reid vd., 1981; Fita vd. 1985). Protopofirinin dört azotu ile dördü koordinasyonunu oluşturan merkezdeki demir atomu 5. koordinasyonunu tirosinin (Tyr<sup>357</sup>) fenolik grubunun oksijeniyle gerçekleştirir. Tyr ile Fe arasındaki bağın uzunluğu 1.9 Å civarındadır. Fe tarafından elektronlar güçlü olarak çekileceği için, fenolik oksijen protonunu bırakır. Arg<sup>353</sup>, tirosin fenolunun pKa değerini düşürerek Tyr<sup>357</sup> iyonlaşmasını kolaylaştırır (iki aminoasit uçları arasındaki mesafe 3.5 Å civarındadır).



Şekil 2. Katalazın aktif bölgesinin şematik gösterimi (Belal vd., 1989).

Heme yakın bölgenin çok sınırlandırılmış olmasına rağmen kanalın yüzey bölgeleri çok az sınırlandırılmıştır. Heme yakın bölgedeki aminoasitler  $\beta$ -silindir bir yapı oluştururlar. Bu bölge, hem pirol halkalardan bir tanesine paralel olarak yerleşmiş fenilalanin (Phe<sup>160</sup>), Histidin (His<sup>74</sup>) ve farklı bir pirol halkasıyla hidrofobik etkileşen Valin (Val<sup>173</sup>) birimi içermektedir (Reid vd., 1981; Fita ve Rossmann, 1985). Bu yapılanma,

Arg<sup>111</sup> ve Thr<sup>114</sup> birbirleriyle etkileşmesiyle daha kararlı bir hal oluşturmakta ve bu da enzimatik aktivite ile direkt ilişkili olmaktadır (Fita ve Rossmann, 1985).

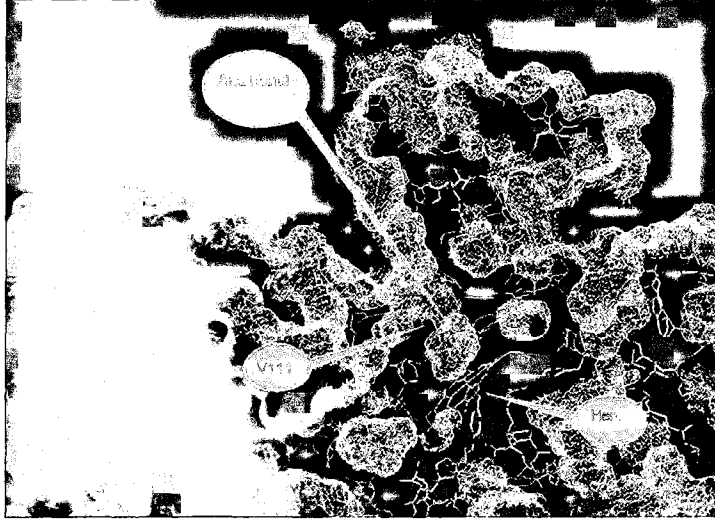
Son yıllarda, CatF (Carpena vd., 2003) ve HPII varyantlarından (Melik-Adamyanyan vd., 2001) elde edilen katalazlarda yapılan yapısal çalışmalar, katalazlardaki kanalların içyüzlerinin mimarisinin önemini ortaya koymaktadır. Katalazlarda, hem içeren aktif bölge ile dış yüzey arasında bağlantıyı sağlayan üç kanal mevcuttur (Şekil 3). Ana kanal, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ilk giriş yaptığı ve hem düzlemine dik olarak yaklaşan kanal olarak bilinmektedir (Amara vd., 2001; Kalko vd., 2001). İkinci kanal, hem düzlemine yakındır. Bu kanal tali veya yakın kanal olarak adlandırılmıştır. HPIII'de yakın kanalın rolünü ispatlayacak çok sayıda kanıt mevcuttur. Bu kanalın içinde yerleşmiş Glu-Arg iyonik çiftinden Arg<sup>260</sup>'ın uzaklaştırılmasıyla büyüyen kanalın aktiviteyi 3 kat arttırdığı gözlenmiştir. Üçüncü kanalın, hem ile merkezi kavite arasındaki dengeyi muhafaza ettiği düşünülmektedir. Fakat üçüncü kanalın bu rolünü ispatlayan bir kanıt mevcut değildir (Melik-Adamyanyan vd., 2001).



Şekil 3. Aktif bölgede bulunan kanalın yapısı (Evans, 1993; Kleywegt vd., 1994).

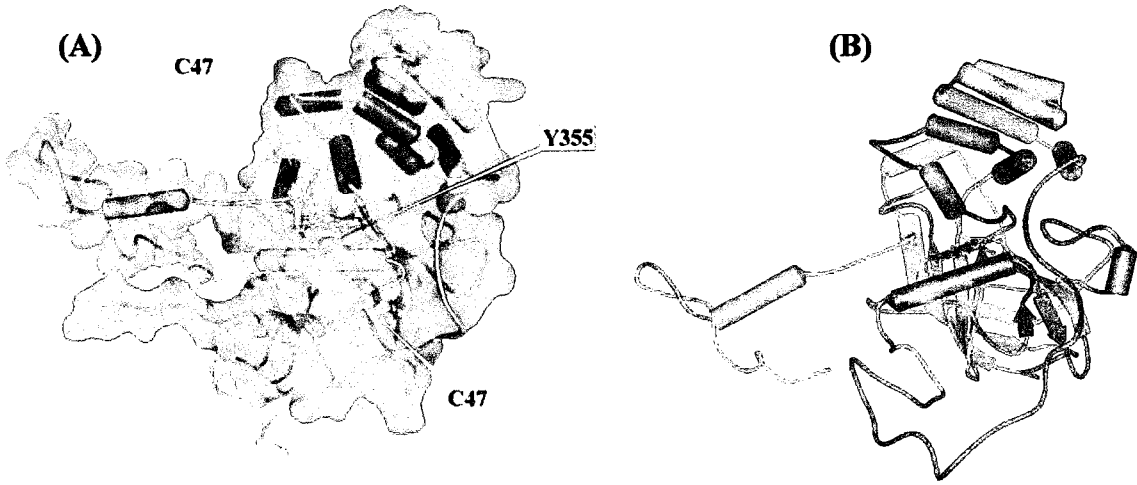
Hamur mayasından (SCC-A) elde edilen katalaz A'nın kanal boyunun yaklaşık 26 Å uzunluğunda, girişinin çapı 17 Å ve en dar kısmının çapı 4.5 Å civarında olduğu belirtilmiştir. Bu kanaldan taşınması gereken substratlar hem ve histidinle etkileşmeden Val<sup>111</sup> tarafından korunmaktadır (Şekil 4). Ayrıca, Val 111 tarafından biçimlenmiş bu

kanalın girişi hem ile çözücü faz arasındaki etkileşimi kontrol etmektedir (Berthet vd., 1997; Zamocky vd., 1997; Zamocky ve Koller, 1999).



Şekil 4. Hamur mayasından elde edilen katalaz A'nın kanal yapısı (Koller, 2005).

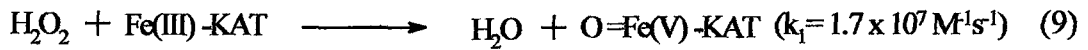
Her bir altbirim dört bölge içermektedir. Bu bölgeler; N-terminal kolu, anti paralel yerleşmiş 8 tane  $\beta$ -silindir yapı, diğer iki bölgeyi saran sargılama bölgesi ve  $\alpha$ -heliks bölgesi olarak adlandırılmaktadırlar (Şekil 5). Katalazlarda bu N-terminal bölgesi oldukça benzerlik göstermekte ve ilk katalitik histidinin de içinde bulunduğu 48-50 amino asit birimi içermektedir. Bu bölge bir  $\alpha$ -heliks yapı ve hem ile etkileşimi sağlayan önemli aminoasit birimlerinden meydana gelmektedir.  $\beta$ -silindir bölgesi, dört  $\beta$ -birimi ile bunu izleyen üç  $\alpha$ -heliks ve sonra tekrar dört tane  $\beta$ -biriminden oluşan bir yapıya sahiptir. İlk dört  $\beta$ -birimi hem cebinin uzak bölgesinin aminoasit birimlerini içermektedir. Diğer dört  $\beta$ -birimi, katalazların kofaktörü gibi olan NADPH'in bağlandığı bölgeyi oluşturmaktadır. Bu bölge yaklaşık 264 amino asitten oluşur ve katalazın altbirimleri için oldukça önemlidir. Sargılama bölgesi heliks ile  $\beta$ -silindir bölgelerine bağlanmış durumdadır. Bu bölge, hemin yakın çevresini oluşturan ve ikincil yapının oluşmasında rol oynayan aminoasitlerinde yer aldığı,  $\alpha$ -heliks yapıya sahip 110 aminoasit biriminden meydana gelmektedir.  $\alpha$ -heliks bölgesi ise  $\beta$ -silindir bölgesinde yer alan üç heliks birimiyle etkileşen dört  $\alpha$ -heliks birimden oluşmaktadır.  $\alpha$ -heliks bölgesi yaklaşık 60 aminoasit birimi içermektedir ( Bravo vd., 1997).



Şekil 5. Altbirim bölgelerinin şematik gösterimi (Sarı, N-terminal ucu; mavi, b-silindir bölgesini; beyaz, sargılama bölgesini; pembe, hem birimini; kırmızı, ikinci altbirimin N-terminal ucunu göstermektedir) (Koller, 2005).

### 1.2.5. Katalazların Reaksiyon Mekanizması

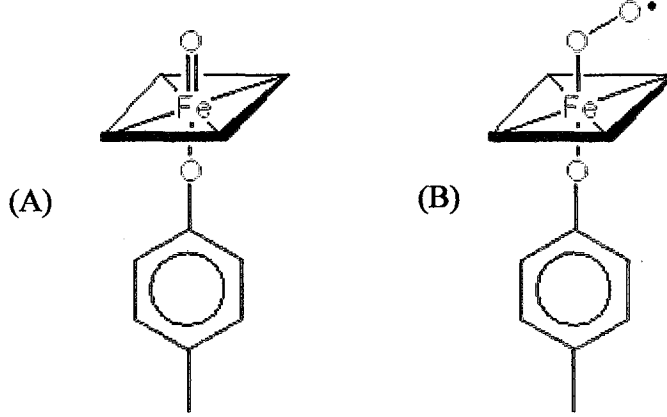
Katalaz iki farklı aktivite gösteren bir enzimdir (Loewen, 1997; Ahmad 2001). Bunlardan bir tanesi  $H_2O_2$ ' in bozunmasını gerçekleştiren katalitik aktivite, diğeri ise, peroksidatif aktivitedir (Reaksiyon 2). Katalitik aktivite iki basamakta gerçekleşmektedir (Reaksiyon 9-10).



Bu reaksiyonda,  $Fe(III)\text{-KAT}$  katalazın doğal formunu,  $O=Fe(V)\text{-KAT}$  bileşik-I formunu (Şekil 6A) göstermektedir (Chance vd., 1979; Ahmad, 2001). Peroksit hem kavitesine girerken şiddetli sterik etkiden dolayı engellenir ve  $His^{74}$  ve  $Asn^{147}$  etkileşmek zorunda kalır (Fita vd., 1985). Bu katalitik reaksiyonun ilk adımını oluşturmaktadır.  $His^{74}$  tarafından  $H_2O_2$ 'in bir oksijeninin protonu diğerine transfer edilir ve O-O bağı polarize olarak uzar. Polarize olan peroksit oksijeni, hemin merkezinde bulunan Fe atomu ile koordinasyon sağlar (Şekil 6B). Bu koordinasyondan su molekülünün ayrılmasıyla



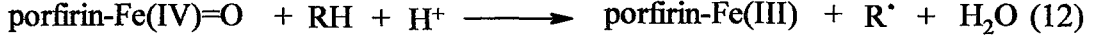
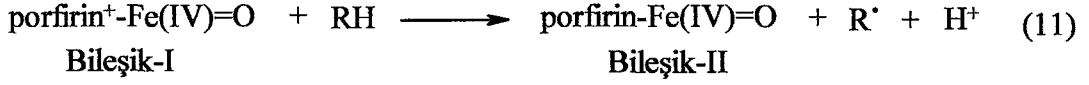
Fe(V)=O formundaki hem radikali oluşur. Oluşan radikal, hem halkasından bir elektron transfer edilmesiyle çabuk bozular.



Şekil 6. A) Bileşik-I, B) Demir ile koordinasyon oluşturmuş O-O bağı

İkinci aşamada, Fe(V)=O'dan iki elektronun ikinci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e transfer edilmesiyle katalazın doğal hali olan Fe(III)-KAT, diğer su molekülü ve bir mol moleküler oksijen oluşur. Fe'in 5. koordinasyonunda bulunan Tyr<sup>357</sup> fenolat ligandı, Fe(III)'ün Fe(V) yükseltgenmesinde hem halkasından bir elektronun taşınmasına yardımcı olarak hem reaktifliğini artırmaktadır (Fita vd., 1985). His<sup>74</sup> ve Asn<sup>147</sup> ile araürünler arasındaki bu etkileşimin katalazın verimini arttırmak için olabileceği düşünülmektedir (Darr vd., 1986). Bu mekanizma, 3-amino-1,2,4-triazolün (3-ATA) katalazı inhibe etmesiyle anlaşılmıştır. 3-ATA His<sup>74</sup> ile etkileşerek substratın bağlanmasını engelleyerek katalaz enzimini inhibe etmektedir (Brown-Peterson ve Salin, 1993; Nadler vd., 1986; Darr vd., 1986). Bu inhibitör, bileşik-I üzerinde etkilidir. Bu nedenle 3-ATA, yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında katalazları inhibe edebilmektedir (Chance vd., 1979; Terzenbach ve Blaut 1998; Ahmad, 2001).

Katalazların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile olan reaksiyonundan oluşan Fe(IV)-porfirin katyon radikalinin (bileşik-I), alifatik alkoller gibi tek elektron donörlü bileşiklerle indirgenmesinden inaktif şekli olan bileşik-II meydana gelmektedir. Bileşik-II genellikle katalazların peroksidatif aktivitesi sonucunda oluşmaktadır. Fakat yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında (>0,1 M) bileşik-I, bileşik-II'ye dönüşerek katalazlar inhibe olmaktadır (Dinçer, 2000). Katalaz aktivitesini, tekrar bileşik-II'nin, başka tek elektron donörlü bileşiklerle indirgenmesiyle kazanır (Reaksiyon 12) (Kettle ve Winterbourn, 2001; Rovira ve Fita, 2003).



Ayrıca katalazlar *in vitro* koşullarda nitriti (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) yükseltgenmesini de katalizleyebilir (Chance vd., 1979; Huang vd., 2004).

### 1.3. Katalazın Kullanıldığı Endüstri Alanları

Günümüzde birçok endüstri kolunda, klasik kimyasal yöntemlerin yerine enzim içeren biyolojik sistemler kullanılmaktadır. Biyoteknolojinin de katkısıyla bu işlemler hem daha ılımlı şartlarda gerçekleştirilmekte, hem de oluşan yan ürünlerin çevreye verdikleri zararlar en aza indirgenmektedir. KAT; gıda, süt, tekstil, kağıt gibi ağartma işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında, hidrojen peroksidin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Dhaese, 1996). Özellikle bu endüstri alanlarında son yıllarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ağartıcı olarak kullanımının artması, üretimin bazı aşamalarında problemlere sebep olabilmektedir (Weck, 1991). Örneğin, tekstil endüstrisinde kumaşların ağartılmasında kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, boyama işlemleri sırasında engel teşkil etmektedir (Weck, 1991; Paar vd., 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortamdan uzaklaştırılması için ya çok miktarda suyun kullanılmasına sebep olan bol su ile yıkamak, ya da atık suda yüksek tuz konsantrasyonuna sebep olan sodyum bisülfid veya hidrosülfid kullanılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in indirgenmesi yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Hillenbrand, 1999 ;Fruhworth vd., 2002). Son yıllarda, bütün bu işlemler yerine KAT kullanılarak ağartmadan sonra boyama işlemine geçilmektedir (Tzanov vd., 2001). Bu ağartma işlemleri, yüksek sıcaklıklarda (> 60 °C) ve yüksek pH'larda (> pH 9) gerçekleştiğinden dolayı yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlı katalazların araştırılması oldukça ilgi çekmektedir (Thompson vd., 2003).

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 bozundurularak ortamdan uzaklaştırılması yöntemlerinden biri, katalazın kullanıldığı enzimatik metottur. Katalaz esaslı yöntemlerde, hidrojen peroksidin oksijen ve suya dönüştürülerek insan

sağlığına verebileceği olumsuz etkiler ortadan kaldırılır (İnal, 1990; Akertek ve Tarhan, 1995; Akgöl ve Dinçkaya, 1999; Görenek, 1999; Yıldız, 1999).

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 katalazın biyosensörleriyle, hem bilimsel çalışmalara yardımcı olunmakta, hem de gıda sanayinden farmakolojiye, biyoteknolojik çalışmalardan çevre analizlerine kadar pek çok alanda hidrojen peroksidin ve ürünlerinin tayinleri yapılabilmektedir (Popescu vd., 1995; Akgöl ve Dinçkaya, 1999).

Enzimlerin diğer kullanım alanlarında olduğu gibi endüstriyel alanlarda da immobilize edildikten sonra kullanımı özellikle ekonomi ve proses kontrolü gibi konularda sağladıkları avantajlar nedeniyle tercih edilmektedir. İmmobilize katalazın, hidrojen peroksit bozundurulması işlemleri yanısıra, glukoz oksidazla birlikte immobilizasyonuyla yumurta akından ve bazı sıvı gıdalardan glukozun uzaklaştırılması ile glukonik asit üretimi gibi yöntemlerde de kullanımı söz konusudur (Tarhan ve Uslan, 1990; Akertek ve Tarhan, 1995).

Ayrıca, katalazın endüstriyel işlemlerde kullanılmasıyla enerjiden %48, kimyasal kullanımında %83, su kullanımında % 50 ve proses zamanında %33 oranlarında tasarruf sağlanmaktadır. İşlem sonrası oluşan atık nötral olduğu için çevreye zararı en aza indirgenmiş olmaktadır (Eberhardt vd., 2004).

#### **1.4. Oksijen Serbest Radikalleri**

Anaerobik olarak faaliyet gösteren bazı mikroorganizma dışında, bütün yaşam biçimlerinde oksijene ihtiyaç vardır ve oksijen yokluğu hızla ölüme götürür. Bununla beraber, bu esas element aynı zamanda toksiktir ve bir atmosfer basıncında bir süre için saf oksijene maruz kalınması hücresel zararlara ve sonunda ölüme neden olur. Bu toksisite moleküller oksijenden dolayı değil, normal metabolizmada küçük miktarlarda bulunan yüksek reaktifliği olan serbest radikallerden kaynaklanır. Normal durumlarda, zararlı radikallerin hücrede yok edilme oranı, düzenlenme oranından daha büyüktür. Oksijen reaktif şekillerinin üretim oranı, doğal savunma mekanizmaları tarafından yok edilme

oranından yüksek olduğu zaman toksisite oluşur ve hücrel hasarlar meydana gelir (Storz ve Imlay 1999; Dinçer 2000). Oksijen radikalleri, membran lipidlerine, proteinlere ve DNA'ya zarar vermektedir (Fridovich, 1986; Imlay, 1988).

Oksijen serbest radikallerinin (Tablo 1) bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronu vardır. Çoğunluğu kısa ömürlüdür ve bir kaçı kararlı olsa da büyük çoğunluğunun reaksiyona girme isteği fazladır (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Pürçüklü, 1996; Dündar ve Aslan, 2000).

Tablo 1. Reaktif Oksijen Türleri

Türler	Kimyasal formülü	Özellikleri
Süperoksit anyonu	$O_2^-$	İyi indirgen, zayıf yükseltgen.
Hidroksil radikali	$HO\cdot$	Son derece reaktif ama difüzyon hızı düşük.
Perhidroksil radikali	$HO_2\cdot$	Kuvvetli yükseltgen, lipid çözünürlüğü süperoksitten daha yüksek, lipid peroksidasyonunu başlatır.
Peroksil radikali	$ROO\cdot$	$HO\cdot$ 'a göre düşük oksitleme gücü, yüksek difüzyon hızı.
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Yükseltgen, organik substratlarla reaksiyon yavaş, yüksek difüzyon kapasitesi.
R-oksil, Alkoksil	$RO\cdot$	Oksijen merkezli organik radikal (ör; lipid)
R-hidroperoksit	$ROOH$	Organik hidroperoksit (örneğin; lipid-tiamin-OOH)
Singlet moleküler oksijen	$^1\Delta gO_2$ ( $O_2^*$ veya $^1O_2$ )	Birinci uyarılmış hal, temel seviyeden (triplet) 22 kcal/mol yukarıdaki hali, $O_2$ ; kırmızı (dimol) infrared (monomol) fotoemiyon
Triplet karbonil	$3 R^I R^{II} CO$ ( $R^I R^{II} CO^*$ )	Karbonil uyarılmış hali; mavi-yeşil fotoemiyon (ara ürün olarak dioksan oluşmaktadır)

### 1.5. Biyokimyasal Antioksidan Olarak Katalaz

Biyolojik sistemlerde antioksidanlar, genellikle non-enzimatik, enzimatik ve yardımcı enzimler olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2). Non-enzimatik antioksidanlardan  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) yağda çözünen önemli antioksidanlardır. Askorbik asit (vitamin C) glutatyonla birlikte su fazında önemli bir antioksidandır (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997; Çetin, 2000; Yurdakul, 2005).

Tablo 2. Biyolojik Sistemlerdeki Antioksidanlar

Sistem	Özellikleri
<u>Non-enzimatik</u>	
A-Tokoferol (vitamin E)	Membran bağlı reseptör, kromonoksil radikalden jenerasyon.
Askorbik asit (vitamin C)	Suda çözünebilir
Flavonoidler	Bitki antioksidanı
Kimyasal antioksidanlar	Gıda katkı maddeleri örn; BHA (bütillenmiş hidroksianizol) BHT (bütillenmiş hidrotoluen)
$\beta$ -Karoten (vitamin A)	Singlet oksijen sönmleyen
Ürik asit	Singlet oksijen sönmleyen, radikal uzaklaştırıcı
Plasma proteinleri	Ör, söröplazmin
<u>Enzimatik</u>	
Süperoksit dismutaz	CuZn enzim, Mn enzim, selenoenzim, non-Se enzim
GSH peroksidazlar	Bazı GSH transferazlar Örn; sitozol ve mitokondrial matriks
Katalaz	Hem içeren enzim, peroksisomal matriksde bulunur
<u>Yardımcı Enzimler</u>	
NADPH-kinon oksidoredüktaz	İki elektron redüksiyonu epoksit hidrolaz
Konjugasyon enzimleri	UDP-Glukronil transferaz, sülfotransferaz, GSH-Transferaz
GSSG-Redüktaz	Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukanolakton Dehidrogenaz
GSH sentez enzimleri	İzositrat dehidrojenaz, Malat enzim NADPH bağımlı
Transport sistemler	GSSG export

Enzimatik antioksidanları inceleyecek olursak; katalaz, glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz ve hemoprotein peroksidazlar gibi hidroperoksidazlar bu gruba girer. Bu antioksidan sistemler doğada yaygın olarak dağılmışlardır ve biyolojik sistemlerde reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı önlemede görev alırlar (Meister ve Anderson, 1983; Halliwell vd., 1992; Matés, 1999; Dünder ve Aslan; 2000; Yurdakul, 2005).

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 (Çetin, 2000).

## 1.6. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri

Katalaz aktivitesi, hem  $H_2O_2$ 'nin bozunması hem de  $O_2$ 'nin serbest kalması ile ölçülebilir. Biyolojik materyal için seçilen metot, UV spektrofotometrik metottur. Titrimetrik metotlar karşılaştırmalı çalışmalar 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 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 (Aebi, 1983; Afsar ve Demirata, 1993; Dinçer, 2000).

### 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 orijinli konsantre ekstratlar için bu metot uygundur.  $H_2O_2$ 'nin bozunması, karışımda örneğin permanganat ile geri titrasyon yapıldıktan sonra mevcut peroksidin ölçümü prensibine dayanır. 30 s'den fazla inkübasyon zamanlı titrimetrik metotlar sadece karşılaştırmalı sonuçlar verir. İyi düzeyde eğrilerin çizilmesi, çok sayıda ölçüm alınmasına 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 metodu uygun olup, deney koşulları Bonnicksen prosedürüne uygun olarak düzenlenmiştir (Aebi, 1983).

### 1.6.3. Diğer Tayin Yöntemleri

Yaygın olarak kullanılan katalaz tayin yöntemleri Tablo 3'de özetlemiştir.

Tablo 3.Katalaz aktivite ölçüm yöntemleri (Aebi, 1983).

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

### 1.7. Katalaz Aktivite Birimleri

Bergmeyer Birimi: Bir birim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin herhangi bir konsantrasyonunda (örneğin 10 mM) 25 °C'de ve 100 s'de peroksit oksijeninin yarısını açığa çıkaran enzim miktarıdır. Bu birim birinci dereceden reaksiyonun yarı ömrü  $\tau$  ile bağlantılıdır (Dinçer, 2000).

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k} \quad (16)$$

Gözlenen yarı ömür zamanı ( $\tau$  gözlenen) ve enzim aktivitesi ( $k$  gözlenen) arasındaki bağıntı:

$$1 \text{ ünite} = \frac{100}{\tau_{\text{gözlenen}}} = \frac{k_{\text{gözlenen}}}{6.93 \times 10^{-3}} \quad (17)$$

$k$  değerlerini ve üniteyi Bergmeyer'e çevirirsek:

$$\text{Bergmeyer'e göre ünite} = \frac{k}{6.93 \times 10^{-3}} \quad (18)$$

Uluslararası Ünite: Bir Uluslararası birim 25 °C'de dakikada 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi dönüşüme uğratan enzim miktarıdır. Burada özellikle  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu önem taşımaktadır. Bu amaç için 12,5 ve 5,9 mM önerilmiştir. Reaksiyon hızı ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu arasında direkt bir ilişki olduğu için çevirme faktörü kullanılan  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonuna bağlıdır (Gonçalves vd., 1999; Akgöl vd., 2001).

### 1.8. Termofilik Mikroorganizmalar

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğerlerinin büyümediği veya çok az büyüme gösterdikleri şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduklarından, çevre etkenleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyel oluştururlar.

Dünya nüfus artışına, sanayi ve endüstri gelişimine bağlı olarak, çevre giderek kirlenmekte ve dünyadaki doğal şartlar ekstrem şartlara doğru kaymaktadır. Dolayısıyla insanlık, son yıllarda ekstrem durumlardaki hayat şartlarının araştırılması yolunda yoğun çalışmalara girmektedir.

Termofilik bakterilerin ilk izole edilışinden bu yana yaklaşık olarak 100 seneden fazla bir zaman geçmiştir (Miquel, 1888). O yıllardan beri çok sayıda spor oluşturabilen *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait termofilik bakteri türleri ortaya çıkarılmış ve özellikleri belirlenmiştir. Üzerinde en çok çalışma yapılan termofilik bakteri türü *Bacillus steorothermophilus* olup, bu türün çok sayıda farklı suşu izole edilmiş ve bu suşların birçok özelliği belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu bakterilerin hepsinin genellikle optimum



olarak yaşayabildikleri sıcaklık 60 °C'dir. Bununla birlikte çalışılan çok az sayıda termofilik bakteri türünün 75 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinmektedir (Guagliardi vd., 1996).

Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonlu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamışlardır. Bu organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerde etkin olarak kullanılan aşırı şartlarda bile görev yapabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimler son zamanlarda endüstride kullanılan ve kirlenmeye neden olan bazı kimyasalların yerine kullanılabilirler. Bu endüstrilerin en göze çarpanları kağıt ve kağıt hamuru endüstrileridir. Ayrıca termofilik enzimlerin yoğun bir şekilde kullanılmaya başlandığı diğer bir alan ise besin endüstrisidir (Aguilar, 1996). Endüstride çoğu enzimatik ve mikrobiyolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda yapılması önemli faydalar sağlamaktadır. Böylece yüksek sıcaklıkta işlemin kararlı olmayan bileşikler tarafından engellenmesi önlenmiş olur. Yüksek sıcaklığın başlıca avantajları, daha yüksek reaksiyon hızı, çoğu kimyasalın daha yüksek oranda çözünebilmesi, akıcılığın ve difüzyon hızlarının yüksek olmasıdır (Kristjansson, 1989).

Bakteriler yaşayabildikleri sıcaklık aralığına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller -10 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak bunların optimum olarak büyüebildikleri sıcaklıklar 15 °C civarındadır. Mezofiller normal ortam sıcaklığında (20-45 °C) büyüebilirler ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu gruba girerler. Termofiller ise 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilirler (Brock, 1985).

Dünya üzerinde yaşayan bütün bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmüştür (Madigan vd., 2000). Bu görüşün dayandığı nokta şu anda dünya üzerinde yaşayan termofilik bakterilerin mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmesidir. Bu görüşlerde göz önüne alınarak termofiller temelde ikiye ayrılırlar. Atasal termofiller (örneğin, *Thermotoga*, *Aquifex*), var oldukları günden bugüne kadar devamlı olarak termofilik olarak yaşamaktadırlar ve hiçbir şekilde mezofilik ortamlara adapte olamazlar. Sonradan termofilik olanlar (örneğin, *Bacillus* ve *Clostridium*), mezofiller ile devamlı ilişki halindedir ve bu grupta bulunan mezofilik türler değişerek tekrar termofilik özellik kazanabilirler. Bu türlerde termofilik ortamlara tekrar adaptasyon söz konusu olduğundan bunlar üzerinde, termofililiğin moleküler temelleri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Termofilik bakteri suşlarının optimum büyüyebilme sıcaklıklarının 55 °C'den 105 °C'nin üstüne kadar olan sıcaklıklara kadar değiştiği bilinmektedir. Bu şekilde çok yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik mikroorganizmalar aşırı termofiller veya çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadır ve bu organizmaların optimum büyüme sıcaklıkları 80 °C'nin üzerinde olduğu bilinmektedir. Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde vb. yerlerde bulunurlar.

45 °C'nin üstüne çıkıldığında mikrobiyal türlerin sayısı önemli bir şekilde düşer fakat bütün organizmaların yaşayabildikleri üst sıcaklık limitleri halen tam anlamıyla bilinmemektedir. Son zamanlarda birkaç tane mikroorganizmanın, sıcaklığı çok yüksek olan kaplıca sularında ve deniz diplerindeki sıcaklığı 100 °C'nin üzerinde olan alanlarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson ve Stetter, 1992). Denizlerin alt kısımlarında sıcak su alanlarının olduğu fakat bu alanların mikrobiyolojisi hakkında fazla bilginin olmadığı bilinmektedir. 115 °C'ye kadar yaşayabilen kültüre alınmış bakteriler bulunmaktadır. Ancak hidrotermal çevrelerde 135 °C'ye kadar yaşayabilen organizmaların olduğunu gösteren deliller bulunmaktadır. Bu sıcaklık sınırı hayatın olabileceği üst sıcaklık limitini göstermektedir. Çünkü bu sıcaklıkta amino asitler büyük oranda *L* formundan *D* formuna dönerler. 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan tür sayısı az olmasına rağmen, filogenetik olarak farklı çok sayıda kategorideki prokaryotların bu sıcaklıklarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson ve Stetter, 1992).

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından büyük faydalar sağlamaktadır (Brock,1986). Termofillerin biyoteknolojide kullanıldığı bazı alanlar şunlardır (Tablo 4): Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin mümkün olması, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi ve termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmasıdır. Biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardakinden çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdır ve bu yüzden bunlardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlüdürler (Brock, 1986).

Termofilik organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olarak kullanılan ekstrem şartlarda fonksiyonel olabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış

ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, ekstrasellüler-polimer-parçalayan enzimler (amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikozil transferazlar, selülozlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar), gıda, kimya, farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler aynı zamanda çok sayıdaki farklı deterjan ve çözücülere karşı da dirençlidir (Aguilar, 1996).

Tablo 4. Termofilik organizmalarından elde edilen bazı enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar

Enzimler ve biyoteknolojide kullanılan hücre içi bileşikler	Uygulamaları ve ürettikleri son ürünler
Amilazlar	Tatlandırıcılarda kullanılan glukoz,fruktoz
Ksilanazlar	Kağıt ağırtılması,
Proteazlar	Keratinden amino asitlerin üretimi, besin işlenmesi, fırıncılık, mayalanma ve deterjan endüstrilerinde
DNA Polimerazlar	Genetik mühendisliği
Katalaz	Deri, tekstil, kağıt, gıda, ilaç endüstrilerinde

### 1.8.1. Termofilliğin Moleküler Temelleri

Bütün organizmaların bünyelerindeki enzimler ve proteinler, yapılarını içerisinde yaşadıkları ortamın sıcaklığına göre adapte etmek zorundadır. Bu olay canlıların protein döngülerindeki hayat sürelerini ve yüksek sıcaklık yüzünden meydana gelebilecek olan bozulmalarını göz önüne alarak biyolojik aktivitesinin de çok yüksek seviyede olmasını belirler. Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem şartlarda örneğin yüksek sıcaklıklarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanır.

Bu organizmalar nasıl olup da yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmektedir? Canlılığın devam ettirilebildiği üst sıcaklık limiti nedir? Bu soruların cevapları halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak içinde yaşanılan ortam sıcaklığı arttıkça canlıda olması gereken bazı özellikler şu şekilde sıralanabilir:

1- Membran akıcılığının ve bütünlüğünün korunması: Ortam sıcaklığı yükseldikçe membranda bulunan lipoproteinlerin akıcılığı da artar. Akıcılığın dengelenmesi gereklidir. Termofillere bakıldığında membran lipidlerinin erime noktasının mezofillere göre daha

yüksek olduğu gözlenir. Böylece membran lipidlerinin akıcılığı optimum büyüme sıcaklığına eşitlenir. Ayrıca bazı organizmalar membran lipidlerinin karışımını da ortam sıcaklığına göre değiştirir (Kristjansson ve Stetter, 1992).

2- DNA yapısı: Normalde DNA'nın iki zinciri 65 °C'de birbirinden ayrılır. G-C içeriğinin artması, erime noktasını bir şekilde yükseltmesine rağmen, organizmanın büyüme sıcaklığı ile DNA'nın G+C içeriği arasında tam bir ilişki bulunmamaktadır. DNA'nın denatürasyona karşı sitoplazmanın iyonik gücü ve düşük su aktivitesi ile korunduğu düşünülmektedir. DNA'nın ısıya karşı kararlılığı ve bazlar arasındaki bağların korunması DNA'nın bazı ligand molekülleri ile elektrostatik etkileşimine olduğu kadar çevrede bulunan su moleküllerine karşı da hassastır. DNA'nın suda çözünmesinin boyutu, DNA'nın fosfat grupları ile katyonların etkileşimini ve baz çiftleşmesinin gücünü etkiler. Polietilen glikol gibi bazı yüksüz moleküller su aktivitesi gibi özellikleri değiştirebilir ve sonuçta bu durum, DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasının serbest enerjisini ve ısısını değiştirebilir (Spink ve Chaires, 1999). Çoğu organizmanın DNA'sı negatif süper sarmalıdır ve bu yapı onun daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Ancak arkebakteriler ve bazı potansiyel termofilik bakterilere bakıldığında onların DNA'larının pozitif süper sarmalı olduğu görülür. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinlerde DNA'ya kararlılık kazandırır (Kristjansson ve Stetter, 1992).

3- RNA Yapısı: Normalde sıcaklığın etkisiyle RNA'nın yumak şeklindeki yapısı da DNA'da olduğu gibi denatüre olabilir. Bununla birlikte, RNA'ların yapısı ve nükleotid sırasında meydana gelen bazı değişikliklerle yapıları kararlılık kazanır. Çoğu termofilik organizmanın RNA'larındaki G+C birleşmesi fazladır ve bunlarda G-U çiftleşmesi, yanlış eşleşmeler, çıkıntılar ve diğer bazı düzensizlikler görülmez. Bu gibi yapılar mezofillerin RNA'larına esneklik kazandırır. Termofillerin RNA'ları genellikle ilave dizilere sahip değildir ve kısadır. Bu şekildeki daha kısa diziler, çıkıntıların olma ihtimalini azaltır. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişimler RNA'ları kararlı hale getirebilirler. Termofilik bir bakteri üzerinde yapılan çalışmada, transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden, bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (Watanabe vd., 1976).

4- Protein Yapısı: Mezofilik organizmalara ait proteinlerin üç boyutlu doğal yapıları yüksek sıcaklıkta önemli derecede bozulur. Son zamanlara kadar proteinlerin yüksek sıcaklığa karşı kararlı hale gelmeleri üzerinde birçok biyofiziksel çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, proteinlerin ısıya karşı dirençli hale getirilmesinde 15

farklı fizikokimyasal faktörün etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu faktörlerden bazıları, hidrojen bağları, proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlenmeler, sarmal ikiz kutup kararlılığı ve tuz köprülerinin en iyi şekilde kullanımınıdır. Bu faktörler üzerinde birçok araştırmacı tarafından araştırmalar yapılmıştır (Grupta, 1995; Russel ve Taylor, 1995; Querol vd., 1996; Veille vd., 1996; Colacino ve Crichton, 1997; Vogt ve Argos, 1997; Vogt vd., 1997; Jaenicke ve Bohm, 1998; Scandurra vd., 1998). Das ve Gerstein (2000) yaptıkları bir çalışmada, 4 adet termofilik arkebakteri, 1 adet termofilik ökaryot, 1 adet termofilik öbakteri ve 6 adet mezofilik öbakteri üzerinde proteinlerin termal kararlılığını araştırdılar. Yapılan bu çalışma sonucunda termofilik organizmaların hem genomik seviyede, hem de  $\alpha$ -sarmal yapılarında mezofilik organizmalardan çok daha fazla yüklü alt birimlere sahip olduklarını tespit ettiler. Ayrıca Haney vd., (1999) yaptıkları bir çalışmada termofilik bir arkebakteri olan *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homologu olan proteinlerin sıralarını karşılaştırdılar. Yaptıkları karşılaştırma sonucunda, termofilik proteinlerin daha fazla sayıda alt birim içerdiği, alt birimlerdeki hidrofobiklikğin daha fazla olduğu, daha fazla yüklü amino asitlere (özellikle Glu, Arg ve Lys) ve daha az sayıda polar amino asitlere (Ser, Thr, Asn ve Gln) sahip olduğunu tespit ettiler. Bu araştırmacılar proteinlerin ısıya karşı dirençli hale gelebilmesi için hidrofobik etkileşimlerdeki, hidrojen, disülfür ve iyonik bağlardaki küçük değişmelerin meydana gelmesinin yeterli olduğunu önerdiler (Haney vd., 1999). Ayrıca yapılan bir çalışmada, kanamisin nükleotidiltransferaz genindeki tek bir nükleotidin değişmesinin, üretilen proteinde tek bir amino asidin değişmesine ve böylece bakterinin ısıya karşı olan dirençliliğinin 10 °C kadar artmasına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır (Matsumura vd., 1984).

5- Enzimatik Fonksiyonlar: Enzim fonksiyonları organizmanın büyüme sıcaklığı tarafından düzenlenir. Mezofilik organizmalara ait enzimler 20-40 °C arasında en iyi şekilde çalışır ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar. Buna karşı termofillerin enzimleri de organizmanın büyüebildiği sıcaklıkta en etkin şekilde çalışır ve denatürasyon bu sıcaklık derecesinin çok üzerinde meydana gelir. Termofilik enzimler mezofilik sıcaklıklarda çok yavaş çalışır ve bu sıcaklıklarda ve donma durumunda çok kararlı bir şekilde bulunurlar (Koffler, 1957; Amelunxen ve Lins, 1968).

6- Küçük Moleküller: Termofillerin sahip olması gereken diğer bir özellik ise, küçük moleküllerin kararlılığıdır. GTP translasyon, RNA sentezi ve diğer birçok işlem için gerekli olan bir moleküldür ve bu molekülün 100 °C'deki yarılanma ömrü birkaç saniyedir.

Ayrıca ATP, UTP, NAD ve FAD gibi birçok küçük molekül de ısıya karşı dirençli değildir. Termofilik bakterilerde bu sorunun üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulan moleküller kullanılacakları zaman sentezlenir.

### 1.9. Çalışmada Kullanılan Termofilik Bakterilerin Özellikleri

Çalışmada üzerinde araştırma yapılan 18 adet termofilik bakteri suşu Dülger (1997) ve Çanakçı (2003) tarafından Türkiye'nin değişik kaplıcalarından izole edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Termofilik suşların isimleri ve izole edildikleri yerler

Termofilik suşun adı	İzole edildiği yer
<i>Bacillus gonensis</i> A2 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Bacillus thermosphaericus</i> A3 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Anoxybacillus gonensis</i> A4 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Anoxybacillus gonensis</i> A5 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Anoxybacillus gonensis</i> A6 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Anoxybacillus gonensis</i> A7 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Anoxybacillus gonensis</i> A9 suşu	Ağrı / Diyadin
<i>Bacillus thermoleovarans</i> G1 suşu	Balıkesir / Gönen
<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 suşu	Balıkesir / Gönen
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> K1 suşu	Çanakkale / Kestanbol
<i>Anoxybacillus thermosphaericus</i> K3 suşu	Çanakkale / Kestanbol
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> K4 suşu	Çanakkale / Kestanbol
<i>Saccharococcus caldoxylolyticus</i> TK4 suşu	Çanakkale / Kestanbol
<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay2 suşu	Rize / Ayder
<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay5 suşu	Rize / Ayder
<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay8 suşu	Rize / Ayder
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> Ay9 suşu	Rize / Ayder
<i>Anoxybacillus gonensis</i> Ay13 suşu	Rize / Ayder

Çalışmada kullanılan bakterilerin izole edildikleri kaplıcalardan olan Diyadin (Ağrı İli) Kaplıcası'nın su sıcaklığının 60-70 °C arasında (Erişen vd., 1996), Gönen (Balıkesir

İli) Kaplıcası'nın su sıcaklığının 73 °C (Anonim, 1994), Kestanbol (Çanakkale İli) Kaplıcası'nın su sıcaklığının 73 °C (Erişen vd., 1996) ve Ayder (Rize İli) Kaplıcası'nın su sıcaklığının 57 °C (Anonim, 1986) olduğu belirtilmektedir.

Yapılan sistematik çalışmaları sonucunda; bu bakterilerden 11 tanesinin *Anoxybacillus gonensis* (A2, A4, A5, A6, A7, A9, G2, Ay2, Ay5, Ay8, Ay13 suşları), 2 tanesinin *Anoxybacillus kestanbolensis* (K1 ve K4 suşları), 2 tanesinin *Bacillus thermosphaericus* (A3 ve K3 suşları), diğerlerinin ise *Bacillus thermoleovarans* (G1 suşu), *Saccharococcus caldxylyolyticus* (TK4 suşu) olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 6'da gösterilmektedir. Genel olarak bakıldığında bu bakteriler orta derecede termofilik (40-70 °C) organizmalar olduğu görülmektedir (Dülger, 1997; Çanakçı, 2003).

Tablo 6. Diyardin (Ağrı), Kestanbol (Çanakale) ve Gönen (Balıkesir) kaplıcalarından elde edilen izolatların biyokimyasal özellikleri (Dülger, 1997; Çanakçı, 2003).

Bakteri No	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A9	K2	K3	K4	K5	TK4	G1	G2	Ay2	Ay5	Ay8	Ay9	Ay13
Gram Boyama	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Spor Boyama	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	h	+	+	+	+	+
Jelatin Hidrolizi	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	h	+	+	+	+	+
VP Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat Kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propiyonat Kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Nitratı indirgeme	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
İndol testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobik Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Glukoz fermentasyonu	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol fermentasyonu	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoz fermentasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Ksiloz fermentasyonu	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
% 2 NaCl'de büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
% 3 NaCl'de büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-



Tablo 6'nin devamı

Bakteri No	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A9	K2	K3	K4	K5	TK4	G1	G2	Ay2	Ay5	Ay8	Ay9	Ay13
% 4 NaCl'de büyüme	+	<sup>h</sup>	+	+	+	<sup>h</sup>	+	+	+	<sup>h</sup>	+	+	-	+	-	-	-	-	-
% 5 NaCl'de büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
% 7 NaCl'de büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 10 NaCl'de büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 °C'de Büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<sup>h</sup>	<sup>h</sup>	<sup>h</sup>	<sup>h</sup>	<sup>h</sup>
37 °C'de Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<sup>h</sup>	-	+	+	+	+	+
40 °C'de Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
70 °C'de Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75 °C'de Büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-

h: Zayıf büyüme, +: Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç, ND: Belirlenmedi, Rakamlar izolat numaralarını göstermektedir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Bu çalışmada besi ortamı olarak kullanılan, Tripton ve yeast extract (maya özütü) kimyasalları Lab M firmasından satın alınmıştır. Tampon hazırlamak için kullanılan dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum asetat, asetik asit, tris(hidroksimetil)amino metan (Tris), hidroklorik asit, metanol ve besi ortamında kullanılan agar-agar kimyasalları Merck A. G. (Darmstadt, Germany)' den sağlanmıştır. Substrat olarak kullanılan hidrojen peroksit ile katalaz aktivitesine etkisini incelemek üzere kullanılan sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ), sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , sodyum nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), sodyum molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), sodyum tiyosülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), sodyumokzalit ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ), sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sodyum ditiyonit, sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ), amonyum klorür ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), mangan klorür ( $\text{MnCl}_2$ ), bakır klorür ( $\text{CuCl}_2$ ), çinko klorür ( $\text{ZnCl}_2$ ), nikel klorür ( $\text{NiCl}_2$ ), kadmiyum klorür ( $\text{CdCl}_2$ ), kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ ), alüminyum klorür ( $\text{AlCl}_3$ ), krom klorür ( $\text{CrCl}_3$ ), kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ), etilendiamintetraasetik asit sodyum tuzu (EDTA), potasyum siyanür (KCN), merkaptoetanol, sodyum dodesilsülfat (SDS), triton X-100 (TX-100) deterjanı ve demir (III) klorür ayrıca protein tayininde ve elektroforezde kullanılan bovine serum albümin (BSA), potasyum ferrisiyanür [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ], bromofenol blue, N,N-bisakrilamid, coomassie brilliant blue-R 250, kimyasalları Sigma Chemical Co., St Louis (MO, USA)'dan satın alınmıştır. Ayrıca sakkaroz, akrilamid, amonyum persülfat, glisin, civa klorür ( $\text{HgCl}_2$ ) kimyasalları ise Fluka firmasından sağlanmıştır.

Santrifüleme işlemleri Sigma 2-16K marka ultrasantrifüj ile, spektroskopik ölçümler Unicam UV2-100 marka UV-Vis spektrofotometre cihazıyla yapılmıştır. Bakterilerin büyütülmesi ve sıcaklık deneylerinde sıcaklığı ayarlamak için Memert Marka sallayıcılı su banyosu kullanılmıştır. Ayrıca besi ortamı ve diğer çözeltilerin sterilizasyonu Tomy SS-325 marka otoklav cihazı ile yapılmıştır.

### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Termofilik Suşlar

Çalışmada, K.T.Ü. Biyoloji Bölümü'nde izole edilen (Dülger,1997; Çanakçı, 2003) *Bacillus gonensis* A2 suşu (A2), *Bacillus thermosphaericus* A3 suşu (A3), *Anoxybacillus gonensis* A4 suşu (A4), *Anoxybacillus gonensis* A5 suşu (A5), *Anoxybacillus gonensis* A6 suşu (A6), *Anoxybacillus gonensis* A7 suşu (A7), *Anoxybacillus gonensis* A9 suşu (A9), *Bacillus thermoleovarans* G1 suşu (G1), *Anoxybacillus gonensis* G2 suşu (G2), *Anoxybacillus kestanbolensis* K1 suşu (K1), *Anoxybacillus thermosphaericus* K3 suşu (K3), *Anoxybacillus kestanbolensis* K4 suşu (K4), *Saccharococcus caldoxylolyticus* TK4 suşu (TK4), *Anoxybacillus gonensis* Ay2 suşu (Ay2), *Anoxybacillus gonensis* Ay5 suşu (Ay5), *Anoxybacillus gonensis* Ay8 suşu (Ay8), *Anoxybacillus ayderensis* Ay9 suşu (Ay9), *Anoxybacillus gonensis* Ay13 suşu (Ay13) termofilik bakteri türleri kullanılmıştır.

### 2.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Lauria Bertani (LB) besi ortamı: 10,0 g tripton, 5,0 g yeast extract (maya özütü) ve 5 g NaCl 900 ml saf suda çözüldükten sonra pH'ı 7.5'a ayarlandı. Hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanan çözelti 121 °C'de 1,1 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında basınç altında 20 dakika otoklav edildi.

Lauria Bertani (LB)-agar besi ortamı: 10,0 g tripton, 5,0 g yeast extract (maya özütü), 5 g NaCl ile 15 g agar agar 900 ml saf suda çözüldükten sonra pH'ı 7,5'a ayarlandı. Hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanan çözelti 121 °C'de 1,1 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında 20 dakika otoklav edildi.

Özütleme (ekstraksiyon) çözeltisi: 10,0 g sakkarozun hacmi pH'ı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.

Lizozim çözeltisi: 10,0 mg lizozimin hacmi saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

0,1 N NaOH-%2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi: 0,4 g NaOH ile 2,0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> karışımının hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%1'lik CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi: 1,0 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O'un hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

0,1 N NaOH-%0,1 SDS çözeltisi: 0,4 g NaOH ile 0,1 g SDS karışımının hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%2 Sodyum-potasyum tartarat: 2,0 g Sodyum-potasyum tartaratın hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

50 mM Asetat tamponu (pH 4,0): 0,0623 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$ 'ta 0,2 M'lik asetik asit çözeltisinden 21,2 ml ilave edilerek hacmi 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

50 mM Asetat tamponu (pH 5,0): 0,2625 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$ 'ta 0,2 M'lik asetik asit çözeltisinden 9,0 ml ilave edilerek hacmi 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

50 mM Fosfat tamponu (pH 6,0): 0,6407 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün 25 ml'deki çözeltisi ile 0,0506 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'ün 25 ml'deki çözeltileri karıştırılarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

50 mM Fosfat tamponu (pH 7,0): 0,4216 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün 25 ml'deki çözeltisi ile 0,3310 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'ün 25 ml'deki çözeltileri karıştırılarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

50 mM Tris tamponu (pH 8,0): 0,6055 g Trizma bazı 80 ml saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'ı 8,0, 9,0 ve 10,0 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi: 303 ml %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Doğal jel boyama çözeltisi [% 2  $\text{FeCl}_3$ -%2  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]: 4,0 g  $\text{FeCl}_3$ 'in 25 ml'deki çözeltisi ile 4,0 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 'in 25 ml'deki çözeltileri karıştırılarak hazırlandı. Bu çözelti karışımı taze hazırlanmalıdır.

## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. Termofilik Bakterilerin Katalaz Kapasitesinin Belirlenmesi (Petri Testi)

Yukarıda belirtilen (bakınız 2.1.2) termofilik bakteriler Lauria Bertani (LB)-agar ortamında hazırlanmış (pH 7,5) besi ortamının bulunduğu petrilerde 55 °C'de 18 saat boyunca büyütüldü. Petrilerde büyüyen bakteriler üzerine 2' şer ml % 10'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  ilave edildi. 10 dakika sonra petriler üzerinde hava kabarcıklarının oluşup-oluşmadığı gözlemlendi. Kontrol olarak, bakteri ekilmemiş aynı şartlarda bekletilmiş LB-agar besi ortamı kullanıldı.

### 2.2.2. Termofilik Bakterilerin Sıvı Besi Ortamlarında Büyütülmesi

Bakteriler, LB sıvı besi ortamında (pH 7,5, 500 ml) 55 °C' de 12 saat boyunca büyütüldü. Kültürler 10 °C ve 8.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelekler

(yaklaşık yaş ağırlığı 1 g) 5'er ml özütlenme çözeltisinde (50 mM potasyum fosfat tamponunda, pH 7,0'de, hazırlanmış %10'luk sakkaroz çözeltisi) süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyonlar sıvı azot içinde 5 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığında tekrar çözününceye kadar bekletildi. Oda sıcaklığına gelen çözeltilere 0,25'er ml lizozim çözeltisi (10 mg/ml) ilave edildi. 30 dakika lizozimle inkübe edildikten sonra çözeltiler, 1 dakika sonifikasyona tabi tutuldu. Karışımlar 9.000 rpm' de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatant hücre içi katalaz kaynağı olarak -20 °C saklandı.

### 2.2.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı Lowry yöntemiyle yapıldı (Lowry vd., 1951). 10 µl kültür ekstraktı 490 µl 0,1 N NaOH, %0.1 sodyum dodesil sülfat içeren çözelti ile 500 µl ye seyreltilerek bazikleştirildi. Bu karışıma, eşdeğer oranlarda karıştırılmış %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ün 0,1 N NaOH içerisindeki çözeltisi (12,5 ml) ve %2 sodyum-potasyum tartaratın %1 lik CuSO<sub>4</sub>'daki çözeltisinden (0.25 ml) 1 ml ilave edildi. 5-10 dakika çözeltinin iyice karışması sağlandıktan sonra, 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş folin reaktifinden 100 µl ilave edildi ve 30 dakika olgunlaşmaya bırakılmasının ardından 650 nm deki absorbansları okundu. Aynı reaktiflerle hazırlanan sığır serum albumini, standart protein çözeltileri içinde elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla ekstraktların protein içerikleri tayin edildi.

### 2.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi. 3 ml'lik kuvarz küvet içinde 25 °C'de 2 ml 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi, 0,9 ml 50 mM fosfat (pH 7,0) tamponu ve 0,1 ml enzim çözeltisi karışımının 240 nm'de ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Hidebrandt ve Roots, 1975) absorbansındaki azalma  $\pm 0,001$  hassasiyetle kaydedildi (Hatchikian vd., 1972; Hazell vd., 1991; Thompson vd., 2003).

Bir ünite enzim, 1 dakikada 1 ml'de 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in bozunması için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlendi. Özgün aktivite, mg protein başına aktivite olarak belirlendi (Aebi, 1984; Claiborne vd., 1979).

Tüm aktivite çalışmaları üçer tekrarlı olarak yapıldı ve ortalamaları üzerinden hesaplamaları gerçekleştirildi.

### 2.2.5. Doğal Elektroforez

Katalaz aktivitesinin ve moleküler ağırlığının belirlenmesi için %10'luk poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanıldı. Protein standardı ve kontrol olarak sığır katalazı (250 kDa) ile sığır serum albümin (66 kDa) kullanıldı. Termofilik suşlardan elde edilen protein özütlerinden uygun miktarlarda (35 mg protein içerecek şekilde) alındı. Bu özütlere eşit hacimlerde 1 x muamele tamponu (50 mM Tris-HCl pH 6,8, %0,1 bromofenol blue, %10 gliserol) ilave edildi ve Laemmli (1970) tarafından tanımlanan 0,75 mm kalınlığındaki poliakrilamid jeline yüklendi. Proteinlerin jelde yürütüldüğü süre boyunca, kuyucuk başına 2 mA akım uygulandı ve jelin ısınmasını engellemek için buz banyosunda yürütme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen Jel 3 kez 10'ar dakika saf suda bekletildikten sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinde (10 µL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mL'ye saf su ile seyreltildi) 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolar dolmaz jelden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Doğal boyama için taze hazırlanmış %2'lik FeCl<sub>3</sub>, %2' lik K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub> çözeltilerin karışımı kullanıldı. Jelde yeşil rengin görüldüğü an, jel saf su ile yıkandı. Jelde boyanmayan yerler katalaz aktivitesi olarak belirlendi (Woodbury vd., 1971; Wayne ve Diaz, 1986).

Ayrıca aynı şartlarda yürütülen bir başka doğal jel, Coomassie brilliant blue (%0.125 Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2 saat boyandı. Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra, yıkama-II (%7 metanol, %5 asetik asit) çözeltisine aktarılarak bantların belirlenmesi sağlandı.

### 2.2.6. Termofilik Katalazların Spektroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi

Termofilik katalazların spektroskopik özelliklerinin belirlenmesi için doğal ve indirgenmiş hallerinin 350-600 nm arasındaki absorpsanları tarandı. Enzim özütlerindeki katalazların (ortalama 0,5 mg protein), 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal hallerinin ve 100 mM NaOH, 100 mM piridin, 2 mM sodyum ditiyonattan oluşan çözelti karışımındaki indirgenmiş halleri ile 10 mM KCN çözeltisindeki hallerinin spektroskopik karakterleri 350-600 nm arası taranarak belirlendi.

### 2.2.7. Termofilik Suşlardan Elde Edilen Katalazların Kinetiğinin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan termofilik suşlardan elde edilen katalazların,  $H_2O_2$  substratına karşı davranışlarını ve ilgisini ortaya koyabilmek için optimize edilmiş şartlarda,  $H_2O_2$  substratının konsantrasyonu 1–100 mM arasında değiştirilerek, katalaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Michaelis-Menten eşitliği esas alınarak değişen substrat konsantrasyonu değerlerine karşı hiperbolik grafik (Michaelis-Menten), bu değerlerin terslerinin alınmasıyla elde edilen lineer grafik (Lineweaver-Burk grafiği) ve Eadie-Hofstee grafikleri çizilerek, enzimin substrat ile doyumunda ulaşılan maksimum reaksiyon hızı ( $V_{maks}$ ) ve Michaelis sabiti ( $K_m$ ) değerleri ile beraber, dönüşüm sayısı ( $k_{kat}$ ) ve substrat spesifite oranları ( $k_{kat}/K_m$ ) bu eğrilerden elde edilen veriler yardımıyla hesaplandı. Lineer ve lineer olmayan eğriler, MS Excel sürüm 11.0 kullanılarak elde edildi ve irdelendi.

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

### 2.2.8. pH ve Sıcaklığın Katalaz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

En yüksek katalaz aktivitesi gösteren 10 termofilik kültürlerde pH ve sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisine bakıldı.

Katalaz aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek için, pH 4,0-10,0 arasında çalışıldı. pH 4,0-5,0 arası için 50 mM asetat, pH 6,0-7,0 arası için 50 mM fosfat ve pH 8,0-10,0 arası için 50 mM Tris-HCl tamponları kullanıldı. Katalazın 20 mM  $H_2O_2$  substratı varlığında ve oda sıcaklığında değişik tamponlardaki aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişik pH'lardaki aktiviteler, en yüksek aktiviteyi gösteren pH'daki aktiviteye oranlanarak, bağıl aktivite olarak hesaplandı.

Sıcaklığın katalaz aktivitesi üzerindeki etkisi, en yüksek aktivitenin belirlendiği pH'larda sıcaklık 20-80 °C arasında değiştirilerek belirlendi. İstenilen sıcaklık  $\pm 0,1$  °C hassasiyetle termostatlı su banyosu ile ayarlandı. Kuvarz küvet içindeki tampon substrat karışımı istenilen sıcaklığa gelinceye kadar su banyosunda bekletildikten sonra, aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak yapıldı. Muhtemel sıcaklık kaybını önlemek için

mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde, enzim çözeltisi substratı içeren karışıma pipetlenerek aktivite ölçümü yapıldı. Değişik sıcaklıklardaki aktiviteler, en yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklıktaki aktiviteye oranlanarak bağlı aktivite hesaplandı.

### 2.2.9. pH ve Isıl Kararlılığın Belirlenmesi

En yüksek özgün aktivite gösteren 10 kültürden elde edilen katalazlar, +20 °C'de 4,0-10,0 arasındaki pH'larda 24 saat boyunca bekletildi. Bu enzimler, değişik pH'lardaki tamponlara katıldı ve hemen ardından ilk aktiviteleri ölçüldü. Bekleme süresi sonunda, oda sıcaklığında aktiviteleri ölçüldü ve ilk aktiviteye oranlanarak kalan aktivite hesaplandı.

Bu 10 termofilik kültürden elde edilen katalaz özütleri, 20-80 °C ( $\pm 0,5$ ) arasındaki sıcaklıklarda 15, 30 ve 60 dakika boyunca bekletildikten sonra, oda sıcaklığında 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında aktiviteleri 240 nm'de ölçüldü. Bulunan aktiviteler ısıtılmadan önceki aktivitelerine oranlanarak kalan aktiviteleri hesaplandı. Ayrıca bu termofilik bakterilerden elde edilen katalazların, 20-80 °C arasındaki sıcaklıklardaki aktivitelerinden yararlanarak  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  ve  $\Delta G^\ddagger$  değerleri belirlendi.

#### 2.2.9.1. $\Delta H$ , $\Delta S$ ve $\Delta G$ Değerlerinin Hesaplanması

##### 2.2.9.1.1. Hız Sabitinin Hesaplanması

$$k = - \frac{1}{\text{zaman(saniye)}} \ln (\Delta t / \Delta o) \quad (19)$$

$k$  = Hız sabiti ( $s^{-1}$ )

$\Delta t$  = Kalan aktivite (ısıtma işleminden sonraki enzim aktivitesi)

$\Delta o$  = Isıtma işleminden önceki enzim aktivitesi

##### 2.2.9.1.2. Aktivasyon Enerjisinin ( $E_a$ ) Hesaplanması

$$\ln k = C - E_a/RT \quad (20)$$



20. eşitlik yardımıyla  $E_a$  bulunur.

$k$  = hız sabiti ( $s^{-1}$ )

$E_a$  = aktivasyon enerjisi ( $J mol^{-1}$ )

$R$  =  $8,3145 J mol^{-1} K^{-1}$

$T$  = Kelvin sıcaklık ( $^{\circ}K$ )

Bu eşitliği  $y = mX + n$  şeklinde düşünüldüğü takdirde  $\ln k = (-E_a/R) 1/T + C$  olur. Şayet  $\ln k$ ,  $y$  eksenini;  $1/T$ ,  $X$  eksenini oluşturacak şekilde grafik çizildiğinde eğim  $-E_a/R$  olacaktır. Bu doğrunun eğiminden  $E_a$  değeri hesaplanır.

### 2.2.9.1.3. Serbest Enerjinin ( $\Delta G$ ) Hesaplanması

$$\Delta G^{\#} = RT \ln (kT/Kh) \quad (21)$$

$\Delta G^{\#}$  = Gibbs serbest enerji değişimi ( $J mol^{-1}$ )

$R$  =  $8,3145 J mol^{-1} K^{-1}$

$T$  = Kelvin sıcaklık ( $^{\circ}K$ )

$K$  = Hız sabiti

### 2.2.9.1.4. Entalpi ( $\Delta H$ ) Değişiminin Hesaplanması

$$\Delta H^{\#} = E_a - RT \quad (22)$$

$\Delta H^{\#}$  = Entalpi değişimi ( $J mol^{-1}$ )

### 2.2.9.1.5. Entropi ( $\Delta S$ ) Değişiminin Hesaplanması

$$\Delta S^{\#} = (\Delta H^{\#} - \Delta G^{\#})/T \quad (23)$$

$\Delta S^{\#}$  = Entropi değişimi ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )

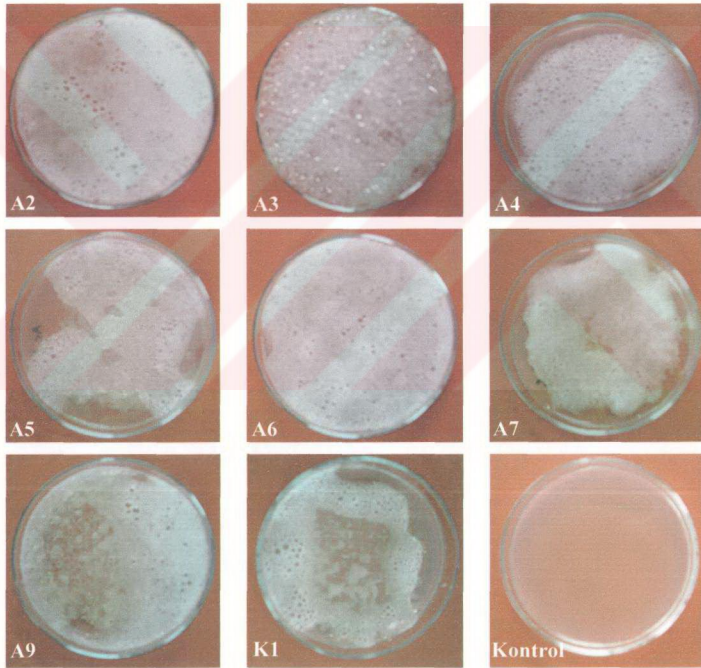
### 2.2.10. Değişik İyon ve Deterjanların Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Termofilik bakterilerden elde edilen katalazların, anyon olarak; 10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM CH<sub>3</sub>COONa, 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0,5-10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,5-10 mM NaNO<sub>3</sub>, 0,5 mM NaNO<sub>2</sub>, 0,5 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,5 mM Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 mM sodyum ditiyonit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), 10 mM NaCl ve 0,1-0,5 mM NaN<sub>3</sub>, kation olarak; 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CuCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM NiCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CdCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CoCl<sub>2</sub>, 0,5-10 mM AlCl<sub>3</sub>, 0,5-10 mM CrCl<sub>3</sub>, 0,5-10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1-0,5 mM HgCl<sub>2</sub>, 0,5-10 mM EDTA, 0,1-0,5 mM KCN, 0,5 mM merkaptoetanol ve 0,1 mM FeCl<sub>3</sub> ve deterjan olarak; 0,5 mM SDS ile %0,1 TX-100 varlığında aktiviteleri ölçüldü. Ölçülen aktiviteler, başlangıçtaki aktivitelerine oranlanarak yüzde oran olarak inhibisyon veya aktivasyon etkileri belirlendi. Aktivite ölçümleri 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında pH 7,0'de oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

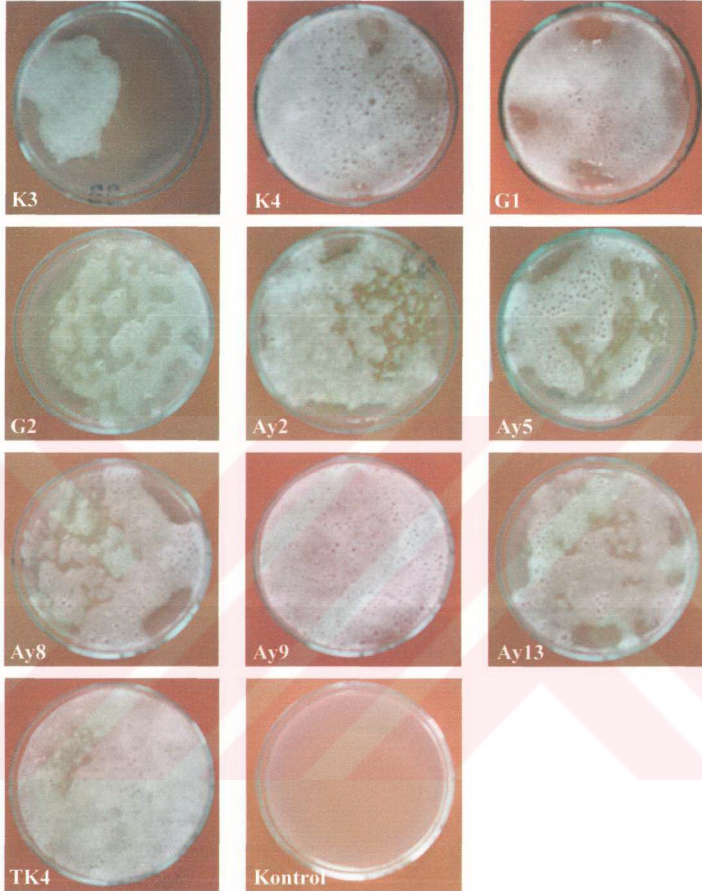
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Termofilik Bakterilerin Katalaz Kapasitesi

Termofilik suşlardaki katalaz kapasitesinin belirlenmesi için, petriler içerisindeki LB-agar ortamında (pH 7,5) 55 °C'de büyütülen termofilik suşlar üzerine % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Termofilik suşların bulunduğu bütün petriler içerisinde 30 dakika sonra hava kabarcıklarının oluştuğu gözlenirken, kontrolde hiç hava kabarcığı görülmedi (Şekil 7, 8).



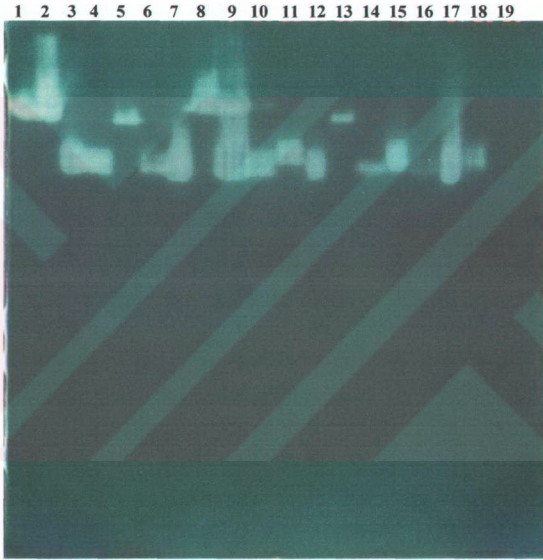
Şekil 7. Termofilik suşlardaki katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonuçları (A2- *B. gonensis* A2 suşu; A3- *B. thermosphaericus* A3 suşu; A4- *A. gonensis* A4 suşu; A5- *A. gonensis* A5 suşu; A6- *A. gonensis* A6 suşu; A7- *A. gonensis* A7 suşu; A9- *A. gonensis* A9 suşu; K1- *A. kestanbolensis* K1 suşu)



Şekil 8. Termofilik suşlardaki katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonuçları (K3- *A. thermosphaericus* K3 suşu; K4- *A. kestanbolensis* K4 suşu; G1- *B. thermoleovarans* G1 suşu; G2- *A. gonensis* G2 suşu; Ay2- *A. gonensis* Ay2 suşu; Ay5- *A. gonensis* Ay5 suşu; Ay8- *A. gonensis* Ay8 suşu; Ay9- *A. ayderensis* Ay9 suşu; Ay13- *A. gonensis* Ay13 suşu; TK4- *S. caldxylyolyticus* TK4 suşu)

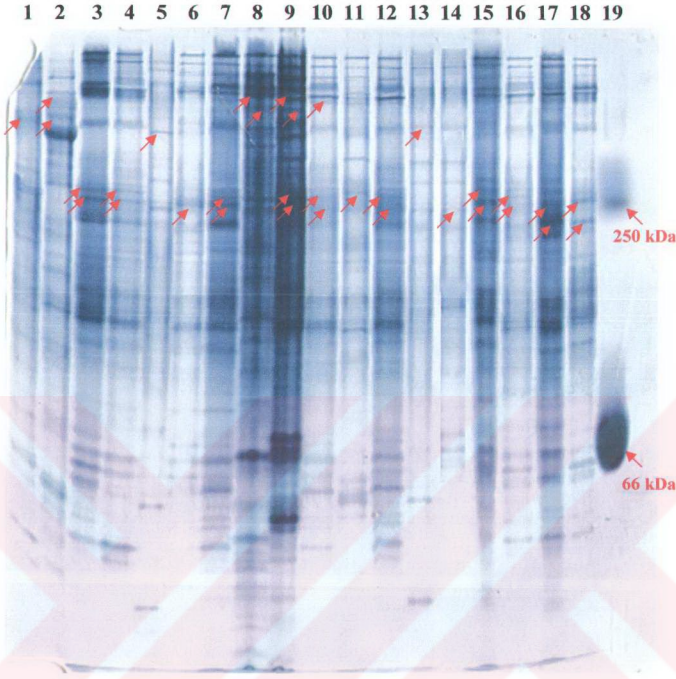
### 3.2. Doğal Elektroforez

Termofilik suşlardan elde edilen özütler aynı elektroforez düzeneği üzerinde hazırlanmış iki ayrı %10'luk PAGE jeli yüklenerek ayrıldılar. Elde edilen jellerden biri doğal boyamaya tabi tutulurken, diğeri Coomassie Brilliant Blue R-250 çözeltisi ile boyamaya tabi tutuldu. Yapılan doğal boyama sonucunda, tüm suşlardan elde edilen özütlerin katalaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 9). Ayrıca kontrol olarak yüklenen BSA proteinin kolonunda herhangi bir aktivite gözlenmemiştir (19 nolu sütun).



Şekil 9. Termofilik suşlardan elde edilen özütlerdeki katalaz aktivitesi için yapılan doğal elektroforez jeli (1-A2; 2-A3; 3-A4; 4-A5; 5-A6; 6-A7; 7-A9; 8-TK4; 9-G1; 10-G2; 11-K1; 12-K3; 13-K4; 14-Ay2; 15-Ay5; 16-Ay8; 17-Ay9; 18-Ay13; 19-BSA)

Coomassie Brilliant Blue R-250 çözeltisi ile boyanan jelden elde edilen protein bantları, doğal boyama sonucu aktivite gösteren bantlarla karşılaştırılarak suş özütlerindeki katalaz proteinlerinin yerleri belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Termofilik suşlardan elde edilen özütlerin doğal protein elektroforezi (1-A2; 2-A3; 3-A4; 4-A5; 5-A6; 6-A7; 7-A9; 8-TK4; 9-G1; 10-G2; 11-K1; 12-K3; 13-K4; 14-Ay2; 15-Ay5; 16-Ay8; 17-Ay9; 18-Ay13; 19- standart)

Rf değerleri hesaplanan katalaz ve izoenzimlerinin, yaklaşık molekül ağırlıkları, standart olarak kullanılan sığır karaciğeri katalazı (250 kDa) ve BSA (66 kDa) proteinin molekül ağırlıkları kullanılarak hesaplandı (Tablo 7). A6, A7, K1, K4, Ay2 suşlarında birer, A2, A3, A4, A5, A9, TK4, K3, Ay5, Ay8, Ay9, Ay13 suşlarında ikişer, G2 ve G1 suşlarında üç tane katalaz aktivitesi gösteren protein bantı gözlenmiştir (Şekil 10). Yaklaşık olarak, A2 katalazının 490, A3 katalazının 490 ile 640, A4 ve A5 katalazlarının 230 ile 250, A6 katalazının 430, A7 katalazının 220, A9 katalazının 230 ile 218, TK4 katalazının 640 ile 530, K1 katalazının 230, K3 katalazının 230 ile 220, K4 katalazının 450, Ay2 katalazının 220, Ay5 katalazının 230 ile 220, Ay8 katalazının 230 ile 210, Ay9 ve Ay 13 katalazlarının ise 220 ile 200 kDa molekül ağırlıklarına sahip oldukları

hesaplanmıştır. Ayrıca G1 ile G2 suşlarının özütlerinde 640, 230, 220 kDa molekül ağırlıklarına sahip bantlar gözlenirken, G1 suşunun bu bantlara ilaveten yaklaşık 530 kDa molekül ağırlığına sahip bir katalaz protein bandına daha sahip olduğu gözlenmiştir.

Tablo 7. Termofilik katalazlara ait Rf değerleri ve molekül ağırlıkları

Termofilik suş	Rf değeri	Molekül ağırlığı (kDa)
A2	0.14	490
A3	0.098	640
	0.14	490
A4	0.24	250
	0.26	230
A5	0.24	250
	0.26	230
A6	0.17	430
A7	0.27	220
A9	0.26	230
	0.27	220
TK4	0.098	640
	0.13	530
G1	0.098	640
	0.13	530
	0.26	230
	0.27	220
G2	0.098	640
	0.26	230
	0.27	220
K1	0.26	230
K3	0.26	230
	0.27	220
K4	0.16	450
Ay2	0.27	220
Ay5	0.26	230
	0.27	220
Ay8	0.26	230
	0.28	210
Ay9	0.27	220
	0.30	200
Ay13	0.27	220
	0.30	200

### 3.3. Termofilik Suşlardaki Protein Miktarı ve Katalaz Aktivitesi

Termofilik kültürlerden elde edilen özütlerdeki suda çözünür protein miktarlarının 1,74-5,62 mg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 8). Bu özütlerdeki en düşük katalaz aktivitesi 22,9 U/ml olmak üzere G2 ve A7 suşlarında, en yüksek katalaz aktivitesi ise 1227,6 U/ml ile A3 suşunda ölçülmüştür. Özgün aktivitelere bakıldığında, en yüksek aktivitenin 64610,5 U/mg protein ile A3 suşunda, en düşük aktivitenin ise 40,7 U/mg protein ile G2 suşunda olduğu belirlenmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Termofilik suşlardan elde edilen ekstraktların suda çözünür protein miktarları ve katalaz aktiviteleeri

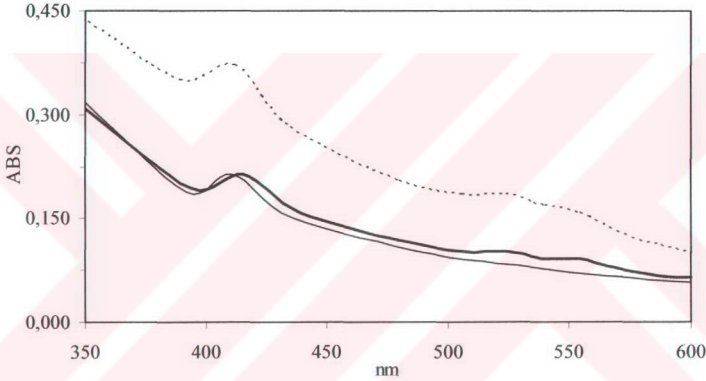
Termofilik Bakteri Suşu	Toplam suda çözünür protein miktarı (mg/ml) $\pm 0,01$	Aktivite için alınan protein miktarı (mg)	$\epsilon$ değeri	Aktivite (U) $\pm 10,8$	Özgün aktivite (U/mg protein) $\pm 17,3$
A3	1,86	0,019	43,6	1227,6	64610,5
Ay9	2,42	0,242	43,6	1089,2	4500,8
TK4	3,85	0,385	43,6	1182,3	3070,9
A9	3,26	0,326	43,6	941,6	2888,3
K1	4,09	0,409	43,6	597,0	1459,6
A4	4,01	0,401	43,6	539,5	1345,4
K4	1,74	0,174	43,6	195,1	1121,3
A5	3,14	0,314	43,6	343,8	1094,9
A6	3,76	0,376	43,6	344,4	916,0
A2	2,01	0,201	43,6	172,4	857,7
Ay13	3,24	0,324	43,6	126,2	389,5
G1	4,06	0,406	43,6	149,2	367,5
Ay2	3,15	0,315	43,6	103,0	327,0
K3	4,59	0,459	43,6	126,1	274,7
Ay5	2,64	0,264	43,6	57,4	217,4
Ay8	2,82	0,282	43,6	57,4	203,5
A7	1,99	0,199	43,6	22,9	115,1
G2	5,62	0,562	43,6	22,9	40,7

Optimum pH, optimum sıcaklık, ısıl kararlılık, pH kararlılığı ve kinetik parametrelerin belirlenmesi, iyon ve deterjanların katalaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi ile piridin hemokromejen analizi çalışmaları, en yüksek özgün aktiviteyi gösteren 10 suşdan (A3, Ay9, TK4, A9, K1, A4, K4, A5, A6, A2) elde edilen katalazlar için yapılmıştır.



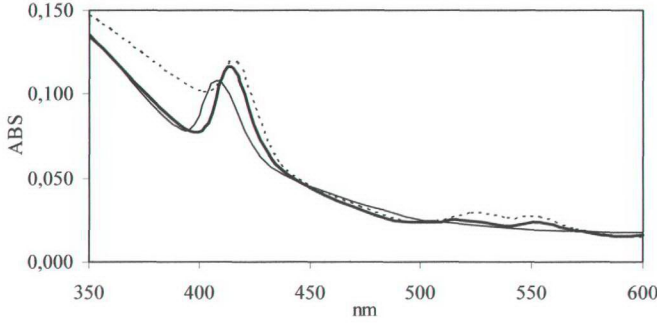
### 3.4. Termofilik Katalazların Spektroskopik Özellikleri

Termofilik katalazların doğal hallerinin, alkali piridin ditiyonit ile indirgenmiş hallerinin ve KCN ile muamele edilmiş hallerinin absorpsanları 350-600 nm arasında tarandı. Bu tarama sonucunda; A3 katalazının doğal hali yalnızca 411 nm'de Soret ( $\gamma$ ) pikini verirken, pridin hemokromejen analizinde 415 nm'de Soret, 524nm'de  $\beta$ -bandı ve 554nm'de  $\alpha$ -bandı piklerini verdiği ve KCN ile Soret pikini 412 nm'de,  $\beta$ -bandı pikini 524 nm'de,  $\alpha$ -bandı pikini ise 554 nm'de verdiği gözlenmiştir (Şekil 11).



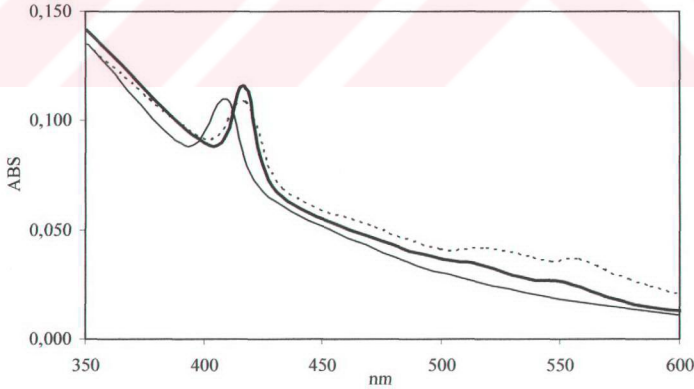
Şekil 11. A3 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( — 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, — 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

Ay9 katalazının doğal hali 409 nm'de Soret ( $\gamma$ ) pikini verirken, pridin hemokromejen analizinde 414, 515 ve 553 nm'lerde pik verdiği ve KCN ile muamele edildikten sonra 412, 522 ve 553 nm'lerde absorpsan gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 12).



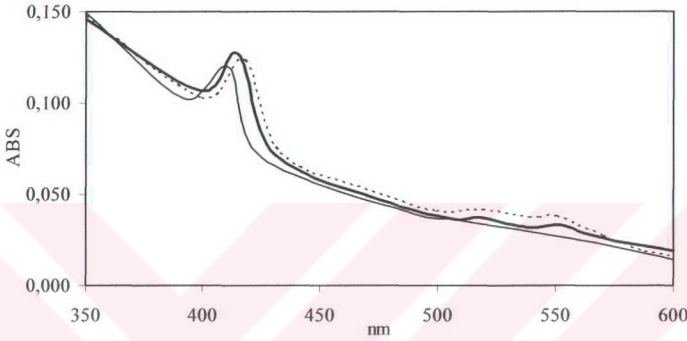
Şekil 12. Ay9 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

TK4 katalazının doğal hali 410 nm'de absorpsiyon piki gösterirken, piridin hemokromejen analizinde 417, 514 ve 552 nm'lerde absorpsiyon piki verdiği ve KCN ile muamele edildiğinde 417, 519 ve 558 nm'lerde absorpsiyon piki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. TK4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

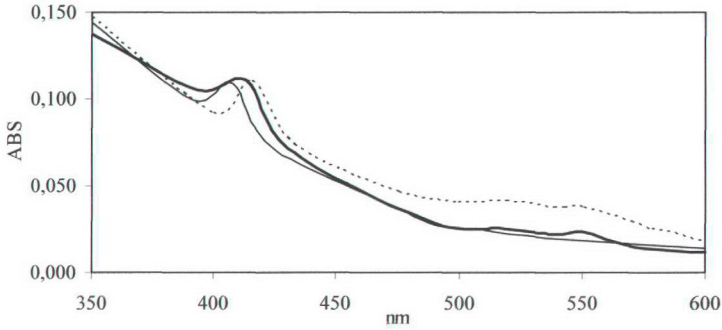
A9 katalazının doğal hali 411 nm'de Soret ( $\gamma$ ) pikini verirken, pridin hemokromejen analizinde 415, 518 ve 552 nm'lerde pik verdiği ve KCN ile muamele edildikten sonra 417, 519 ve 550 nm'lerde absorpsiyon gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 14).



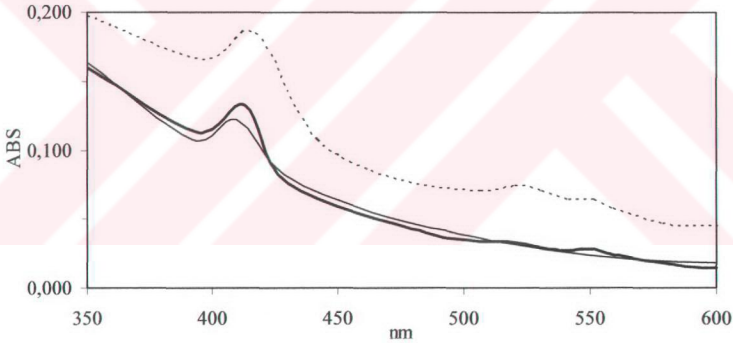
Şekil 14. A9 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

K1 katalazının doğal hali 408 nm'de absorpsiyon piki gösterirken, pridin hemokromejen analizinde 413, 516 ve 550 nm'lerde absorpsiyon piki verdiği belirlenmiştir. Ayrıca KCN ile muamele edildiğinde Soret bandı pikinin 416 nm'ye kaydığı  $\beta$  ve  $\alpha$  bandı piklerini 519 ve 550 nm'lerde gösterdikleri bulunmuştur (Şekil 15).

A4 katalazının doğal hali 409 nm'de absorpsiyon piki gösterirken, pridin hemokromejen analizinde 413, 517 ve 551 nm'lerde absorpsiyon piki gösterdiği ve KCN ile muamele edildiğinde 417, 520 ve 551 nm'lerde absorpsiyon piki verdikleri belirlenmiştir (Şekil 16).

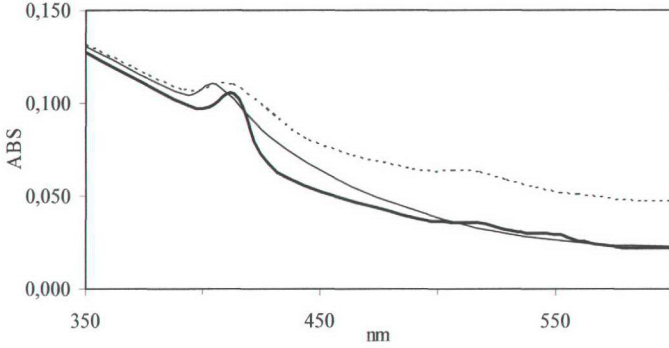


Şekil 15. K1 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)



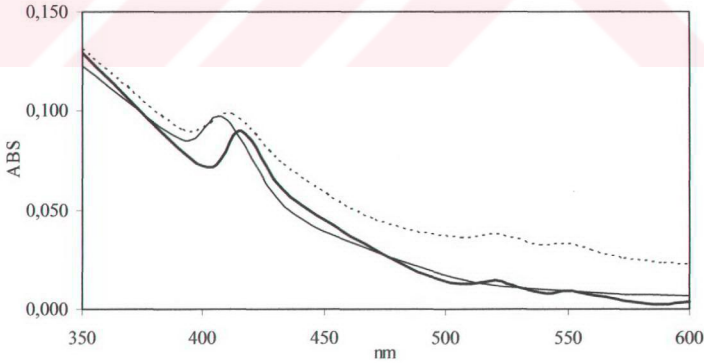
Şekil 16. A4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

K4 katalazının doğal hali 406 nm'de absorpsiyon piki gösterirken, piridin hemokromejen analizinde 413, 517 ve 552 nm'lerde absorpsiyon piki verdiği belirlenmiştir. KCN ile muamele edildikten sonra, Soret bandı pikini 413 nm'de,  $\beta$  ve  $\alpha$  bandı piklerini 518 ile 559 nm'lerde gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 17).



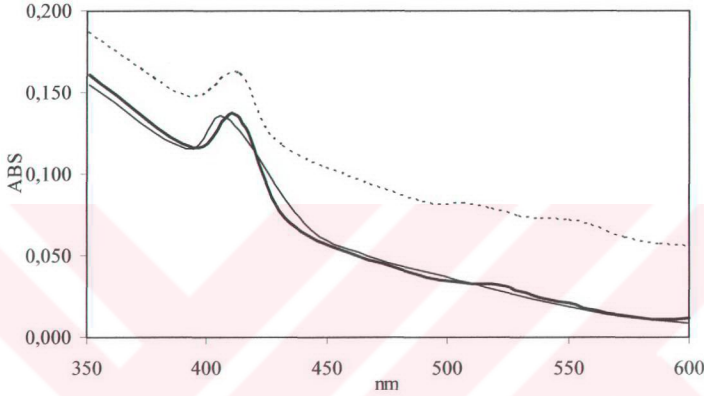
Şekil 17. K4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

A5 katalazının doğal hali 408 nm'de absorpsiyon piksi gösterirken, piridin hemokromejen analizinde 416, 520 ve 550 nm'lerde pik gösterdiği ve KCN ile muamele edildiğinde 412, 518 ve 550 nm'lerde absorpsiyon piksi gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 18).



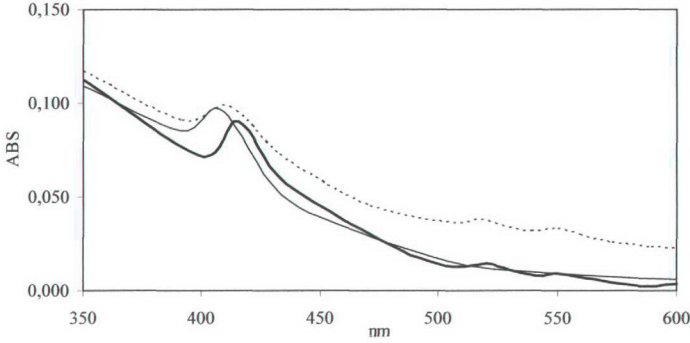
Şekil 18. A5 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

A6 katalazının doğal hali 408 nm'de Soret piki verirken, piridin ditiyonit ile indirgenmesi sonucunda 413, 521 ve 550 nm'lerde pik verdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, KCN ile muamele edildikten sonra 413, 518 ve 550 nm'lerde absorpsiyon gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. A6 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

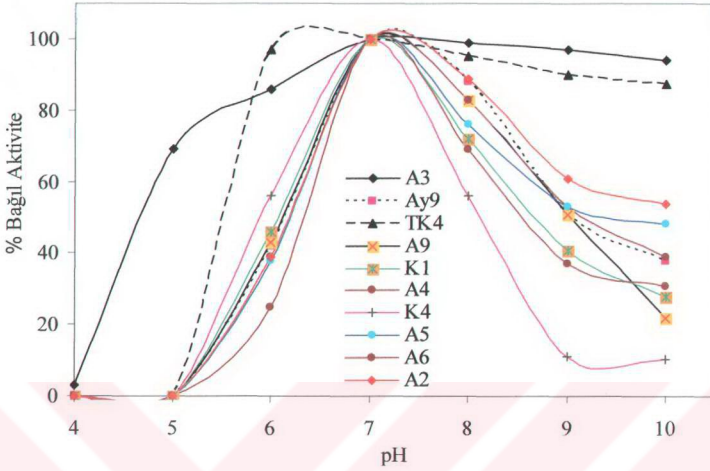
Son olarak, A2 katalazının doğal hali 408 nm'de absorpsiyon piki gösterirken, piridin hemokromejen analizi sonucunda 416, 520 ile 550 nm'lerde absorpsiyon piki verdiği ve KCN ile muamele edildiğinde Soret bandı pikininin 412 nm'ye kaydığı  $\beta$  ve  $\alpha$  bandı piklerini 518 ve 550 nm'lerde gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. A2 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu ( \_\_\_\_ 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, \_\_\_\_\_ 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, ..... 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

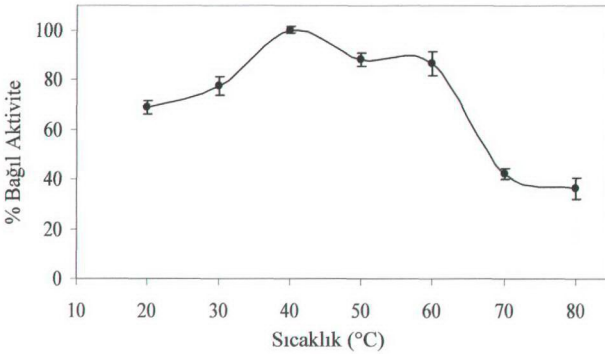
### 3.5. pH ve Sıcaklığın Termofil Bakterilerdeki Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Termofilik kültürlerden elde edilen katalazların hepsinin pH 7,0'de en yüksek aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 21). A3 suşundan elde edilen katalazın pH 7,0' de en yüksek aktiviteyi (%100) gösterdiği ve pH 8,0'de %99, pH 9,0'da %97, pH 10'da %94 oranında ilk aktiviteyi koruduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde TK4 suşundan elde edilen katalazın da pH 6,0'da %97, pH 7,0'de %100, pH 8,0'de %95, pH 9,0'da %90 ve pH 10'da %88 oranında ilk aktiviteyi koruduğu belirlenmiştir. Diğer suşlardan elde edilen katalazlarda pH 8,0'de Ay 9'un %88, A9'un %83, K1'in %72, A4'ün %83, K4'ün %56, A5'in %76, A6'nın %69 ve A2'in %89 oranında ilk aktiviteyi koruduğu bulunmuştur. A3 suşundan elde edilen katalazın pH 4,0'de %3 ve pH 5,0'de %69 oranında aktivitesini koruduğu görülürken, diğer bütün suşlardan elde edilen katalazların ise bu pH değerlerinde aktivite göstermedikleri tespit edilmiştir.



Şekil 21. Termofilik suşlardan elde edilen katalazların aktivite-pH değişimi

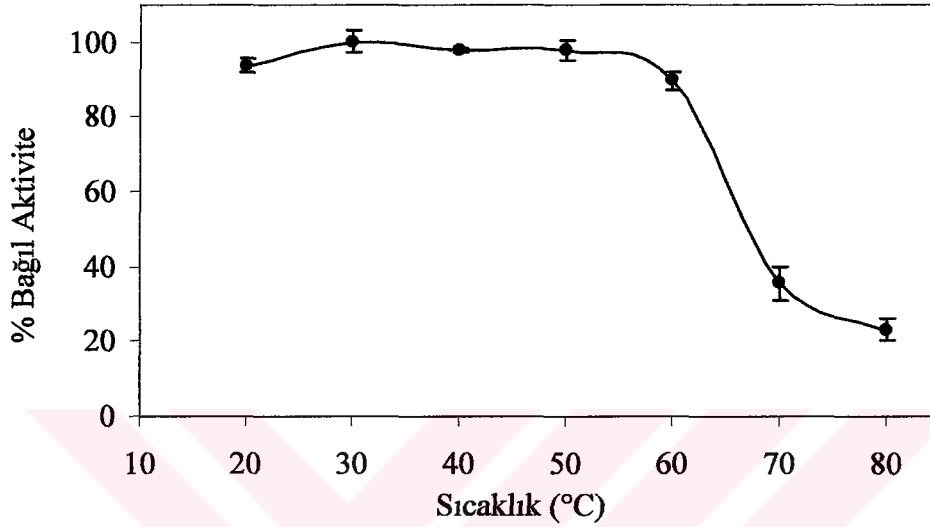
Termofilik bakterilerden elde edilen katalaz aktiviteleri 20–80 °C arasındaki sıcaklıklarda ölçülmüştür. A3 suşundan elde edilen katalaz 40 °C'de en yüksek aktiviteyi gösterirken, 30 °C'de %77, 50–60 °C'lerde %88, 70 °C'de %42 ve 80 °C'de ise %36 oranında aktiviteyi koruduğu belirlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. A3 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi



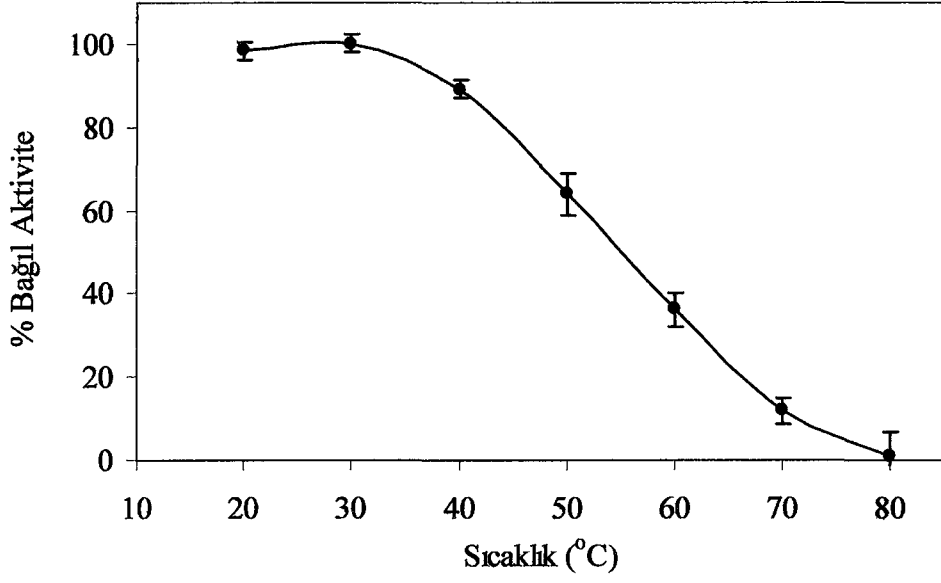
Ay9 suşundan elde edilen katalazın 20–60 °C gibi geniş bir aralıkta aktivitesini koruduğu (%90–100) ve en yüksek aktiviteyi 30 °C’de gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 23). Ayrıca Ay9 katalazının, 70 ve 80 °C’lerde sırasıyla %35 ile %23 oranlarında aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



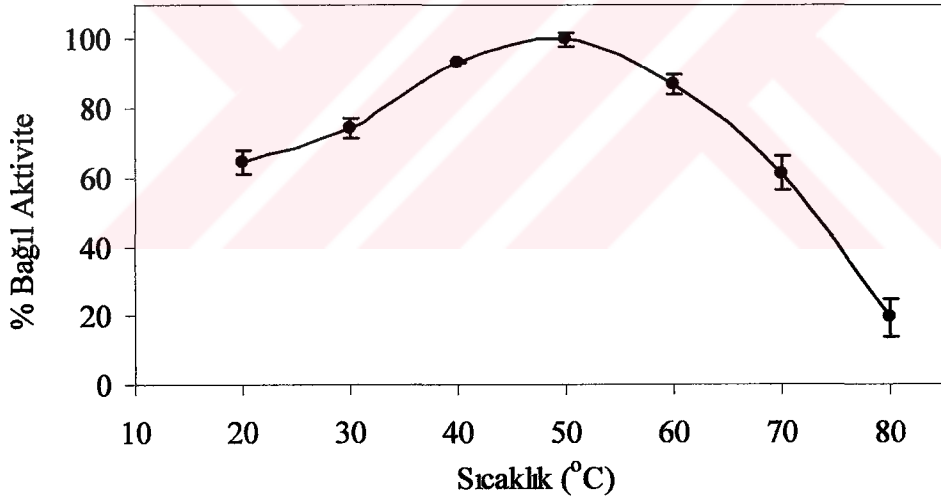
Şekil 23. Ay9 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

TK4 suşundan elde edilen katalazın en yüksek aktiviteyi 30 °C’de gösterdiği ve 20 °C’de %94, 40 °C’de %89 oranında aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin % 64’ün altına düştüğü ve 80 °C’de ise katalaz aktivitesinin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Şekil 24).

A9 suşundan elde edilen katalazın 50 °C’de en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca 40 °C’de %94 ve 60 °C’de %87 oranında aktivite gösterirken, 70 °C’de % 61 oranında aktivite gösterdiği, 80 °C’de ise bu aktivitenin %19’a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 25).

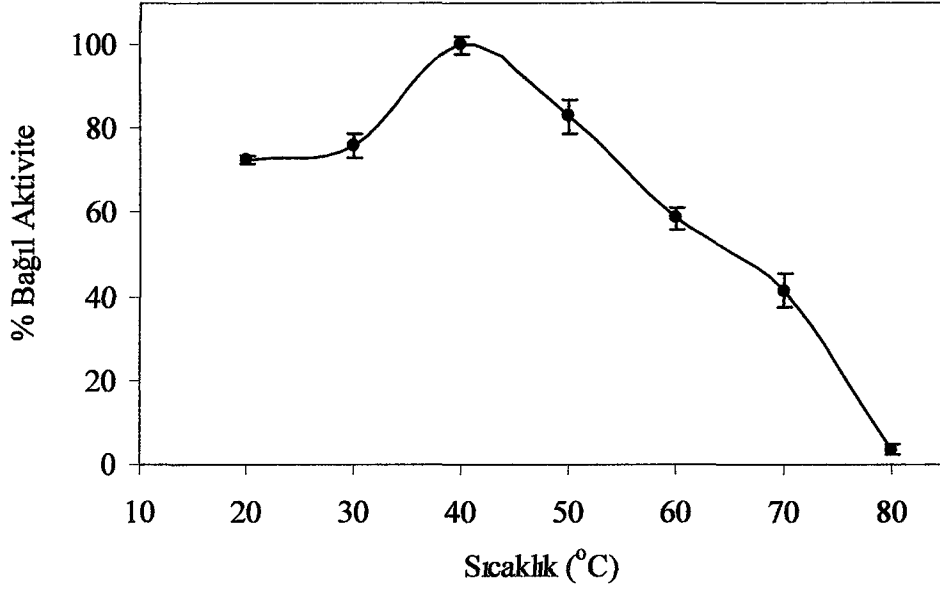


Şekil 24. TK4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi



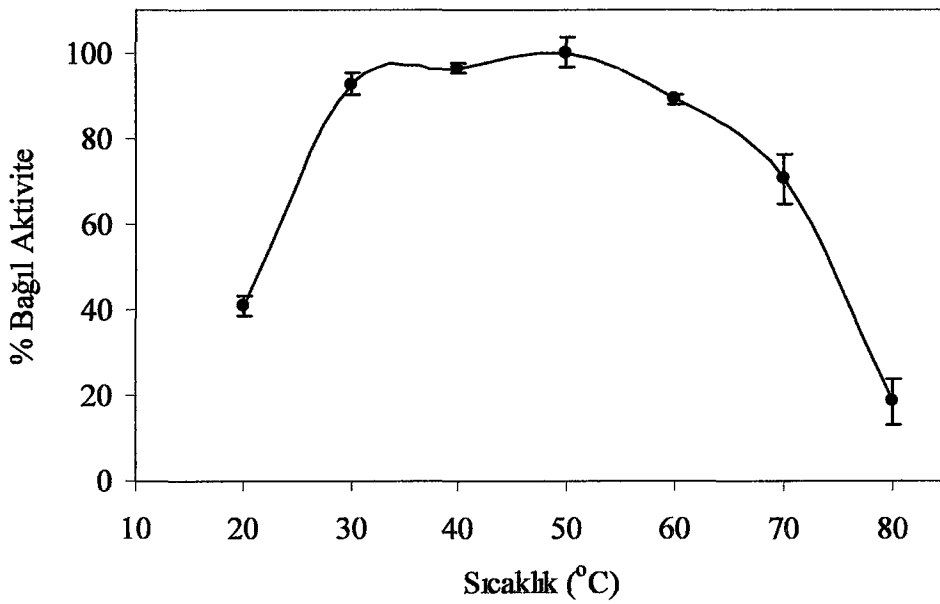
Şekil 25. A9 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

K1 suşundan elde edilen katalazın 20 °C'de %72, 30 °C'de %76, 50 °C'de %83 oranında aktivite gösterdiği belirlenirken, 40 °C'de en yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin % 60'ın altına düştüğü ve 80 °C'de ise, aktivitenin hemen hemen kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 26).



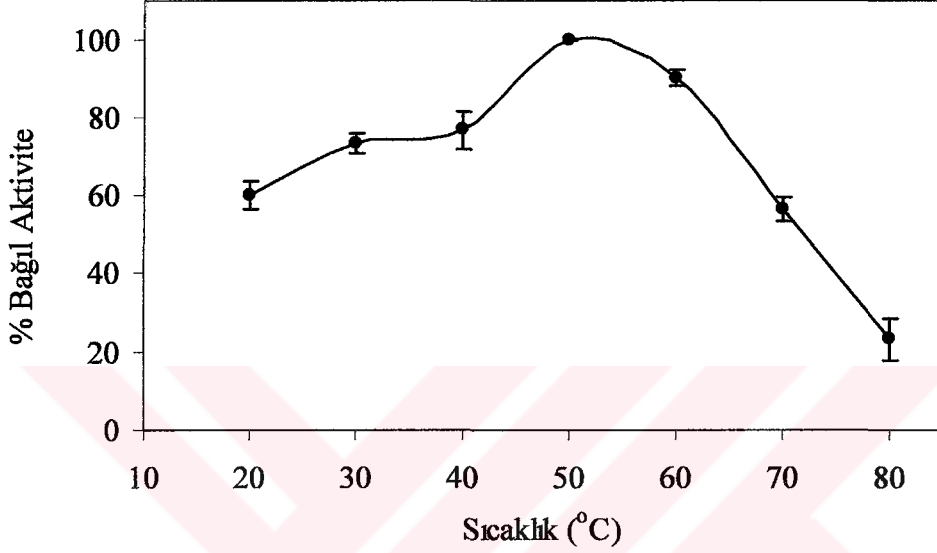
Şekil 26. K1 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

A4 suşundan elde edilen katalazın 30 ile 60 °C arasında yüksek aktivite (%90–100 arasında) gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 27). A4 katalazının en yüksek aktiviteyi 50 °C’de gösterdiği, 70 °C’de % 70 oranında aktiviteyi koruduğu ve 80 °C’de % 20 oranında aktivite gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 27. A4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

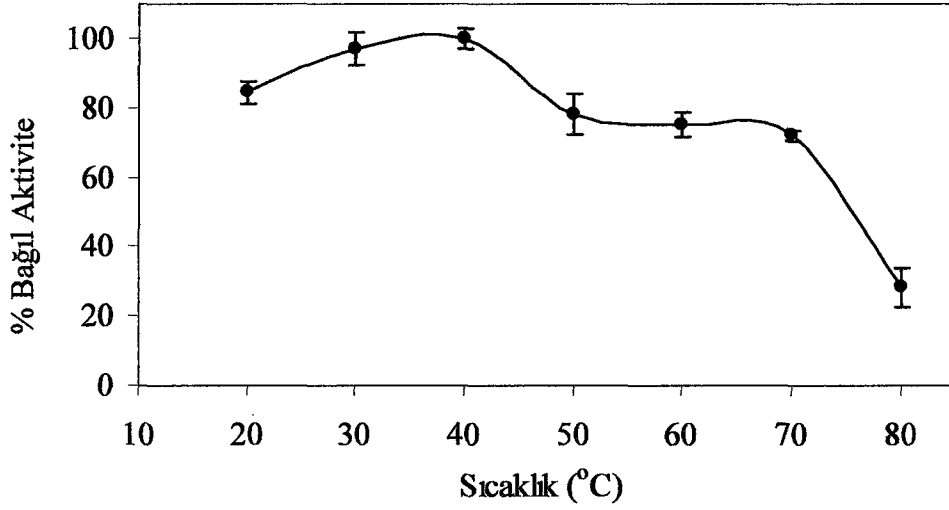
K4 suşundan elde edilen katalazın %100 oranındaki aktiviteyi, 50 °C’de gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu suştan elde edilen katalazın 20 °C’de %60, 30 °C’de %73, 40 °C’de %77, 60 °C’de %90, 70 °C’de %57 ve 80 °C’de %23 oranında aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 28).



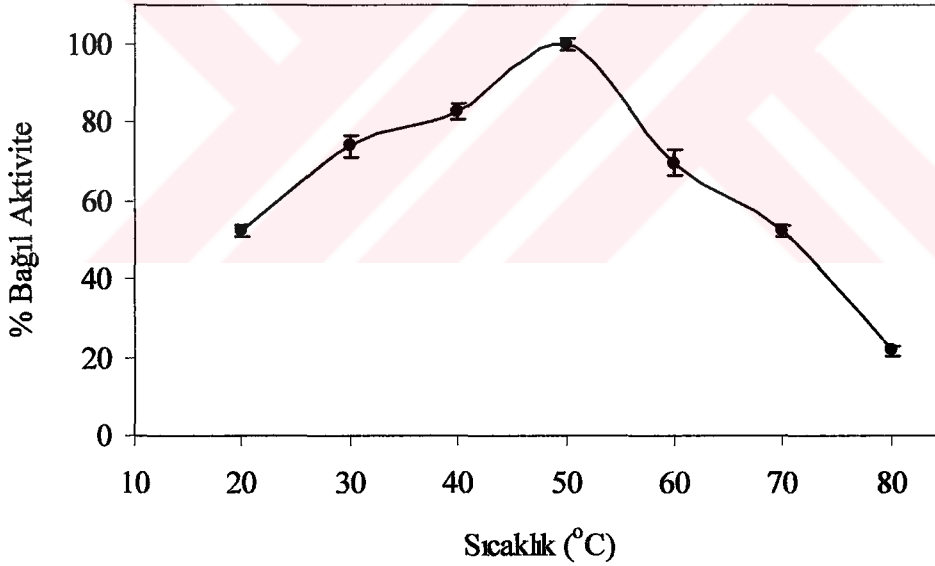
Şekil 28. K4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

A5 suşundan elde edilen katalazın en yüksek aktiviteyi 40 °C’de gösterdiği ve 20 °C’de %84, 30 °C’de %97 oranında aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Yine bu katalaz 50 °C’de %78, 60 °C’de %75, 70 °C’de %72 oranında aktivite gösterirken, 80 °C’de ise sadece % 28 oranında aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 29).

A6 suşundan elde edilen katalazın en yüksek aktiviteyi 50 °C’de gösterdiği tespit edilmiştir. A6 katalazının 20°C’de %52, 30 °C’de %74, 40 °C’de %83, 60 °C’de %70, 70 °C’de % 52 oranlarında aktiviteyi koruduğu ve 80 °C’de aktivitenin % 22 oranına düştüğü belirlenmiştir (Şekil 30).

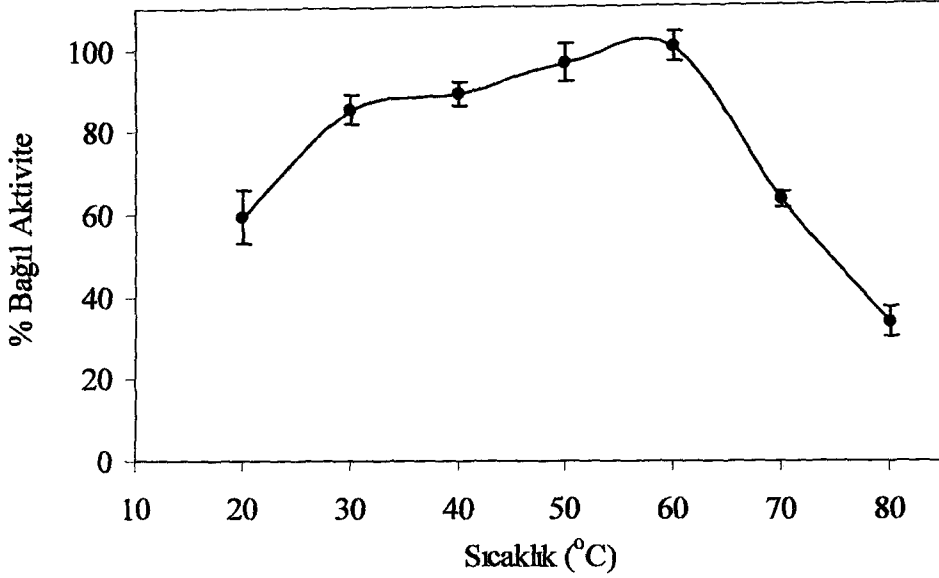


Şekil 29. A5 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi



Şekil 30. A6 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

A2 suşundan elde edilen katalazın ise, en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 60 °C olarak belirlenmiş olup, 50 °C'de de %96 oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu suştan elde edilen katalazın 20 °C'de %59, 30 °C'de %85, 40 °C'de %89, 70 °C'de %63 ve 80 °C'de %33 oranında aktiviteyi koruduğu saptanmıştır (Şekil 31).

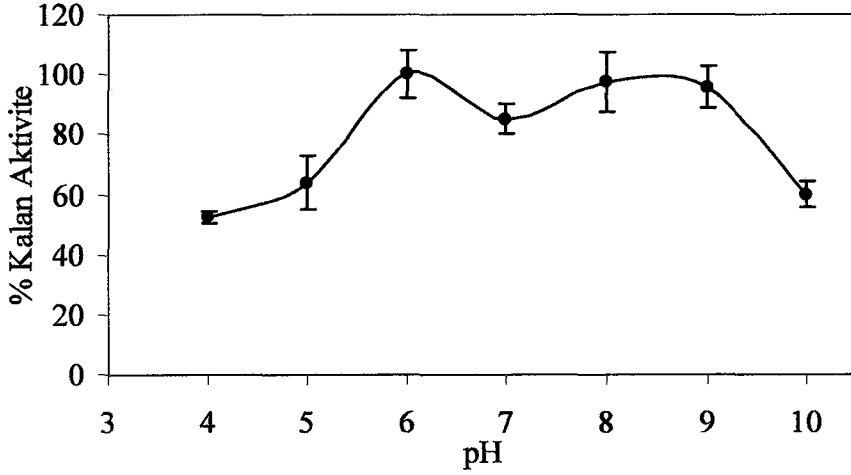


Şekil 31. A2 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla ilişkisi

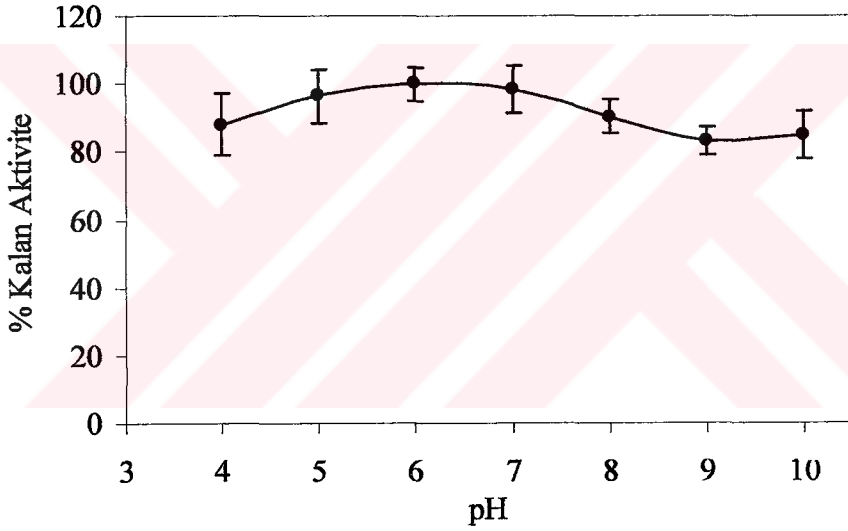
### 3.6. Termofilik Katalazların pH Kararlılıkları

Termofilik suşlardan elde edilen katalazların pH 4,0-10,0 arasında 24 saat bekletildikten sonra ölçülen aktiviteleri, ilk aktivitelerine oranlanarak kalan aktiviteleri yüzde olarak hesaplanmıştır. A3 suşundan elde edilen katalazın 24 saat bekletilme sonrası pH 6,0'da en kararlı olduğu ve pH 7,0-9,0 arasında da ilk aktivitesini büyük bir oranda (%85-98) koruduğu belirlenmiştir (Şekil 32). A3 katalazının pH 10,0'da ise, ilk aktivitesini %40 oranda kaybettiği görülmüştür.

Ay9 suşundan elde edilen katalazın tüm pH değerlerinde büyük oranda ilk aktiviteyi koruduğu belirlenmiştir. Ay9 katalazı en yüksek oranda ilk aktiviteyi pH 6,0'da korurken bunu sırasıyla, pH 7,0 (%98), pH 5,0 (%96), pH 8,0 (%90), pH 4,0 (%87), pH 10,0 (%85) ve pH 9,0'un (%84) izlediği görülmüştür (Şekil 33).

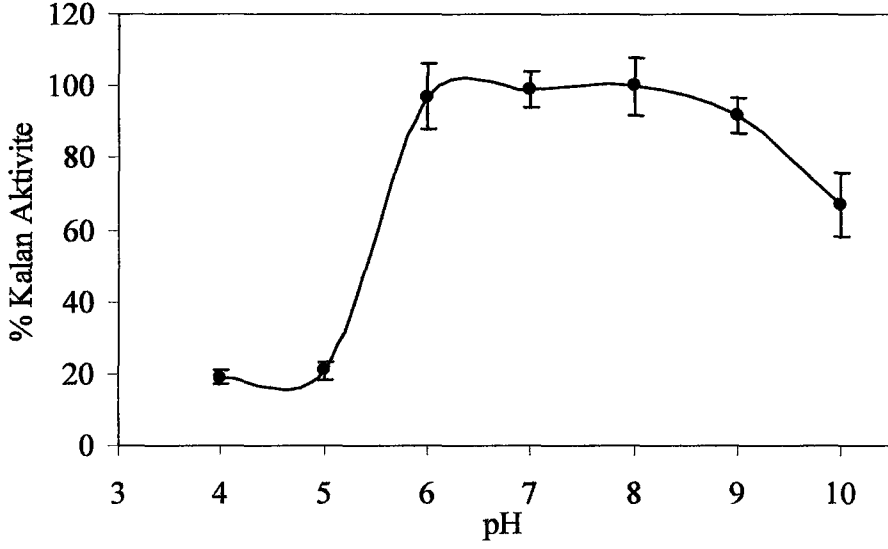


Şekil 32. A3 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği



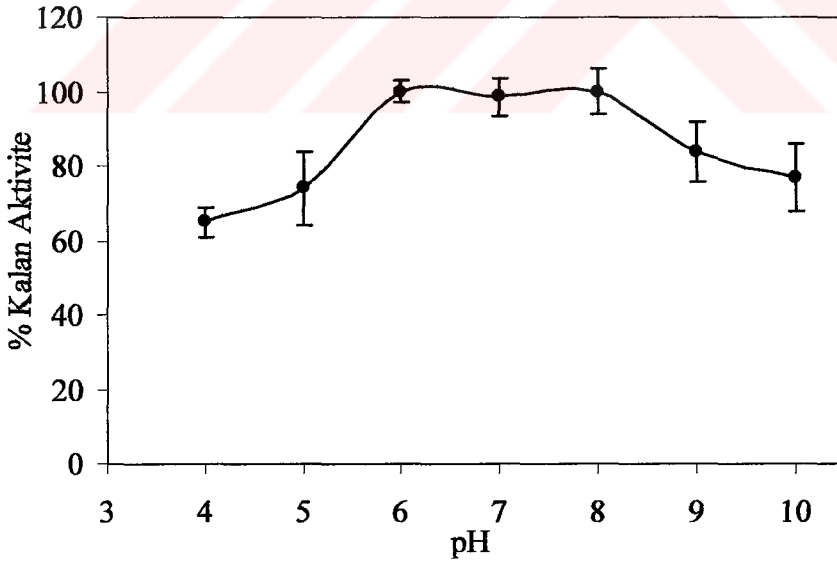
Şekil 33. Ay9 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

TK4 suşundan elde edilen katalazın pH 6,0-9,0 arasında kararlı kaldığı tespit edilmiştir. pH 8,0'de en kararlı olan TK4 katalazı pH 7,0'de %99, pH 6,0'da %97, pH 9,0'da %92 oranlarında kararlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca pH 4,0 ve pH 5,0'de aktivitesini büyük bir oranda kaybettiği, pH 10,0'da ise ilk aktivitesini %67 oranında koruduğu gözlenmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. TK4 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

A9 suşundan elde edilen katalazın pH 6,0-8,0 arasında kararlı olduğu tespit edilmiş ve pH 9,0'da %84, pH 10,0'da %77, pH 5,0'de %74 ve pH 4,0'de %65 oranlarında ilk aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 35).

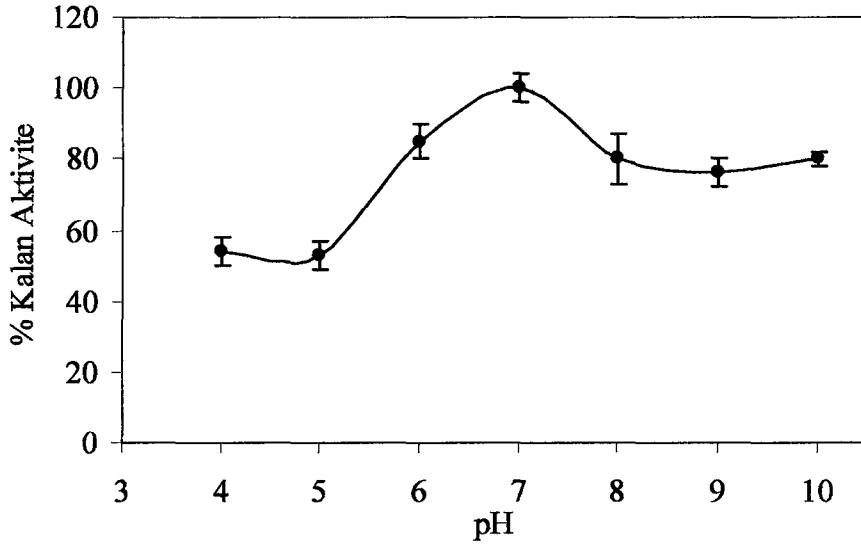


Şekil 35. A9 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

K1 suşundan elde edilen katalazın pH 7,0'de kararlı olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında pH 6,0'da ilk aktivitesini %85 oranında, pH 8,0 ve pH 10,0'da %80, pH 9,0'da

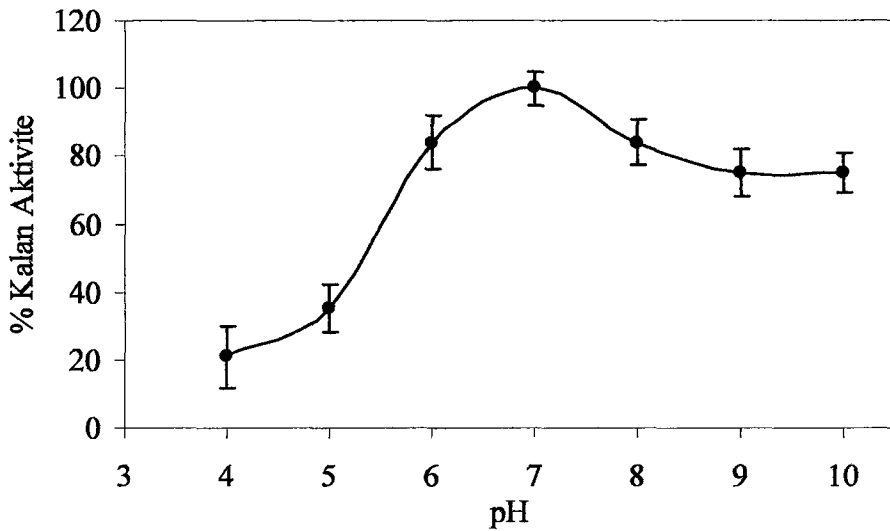


%76 oranlarında korurken, pH 4,0 ve 5,0'de ise bu oranın %55'in altına düştüğü görülmüştür (Şekil 36).



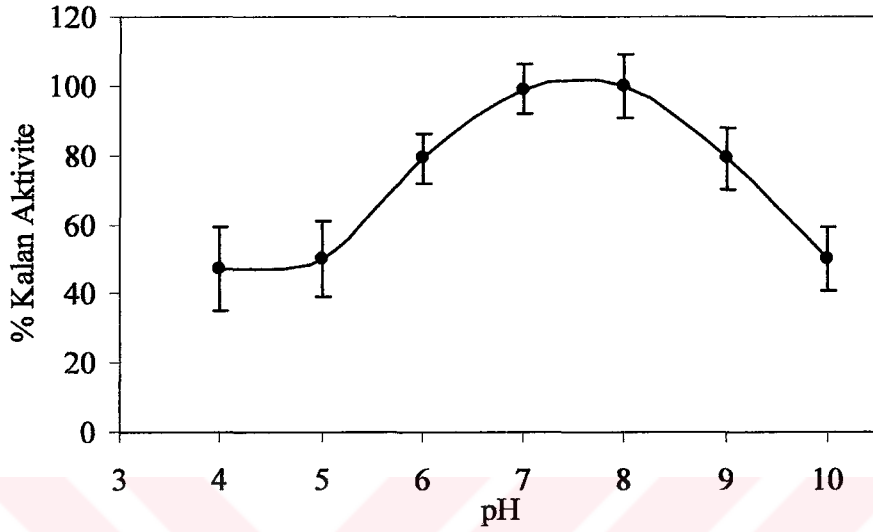
Şekil 36. K1 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

A4 suşundan elde edilen katalazın pH 7,0 'de en kararlı olduğu, pH 6,0 ve 8,0'de aktivitesini büyük bir oranda (%84) koruduğu gözlenmiştir (Şekil 37). Yüksek pH'lar da ilk aktivitesini %75 oranında muhafaza ederken, düşük pH'larda ilk aktivitesini ortalama %70 oranında kaybettiği gözlenmiştir.



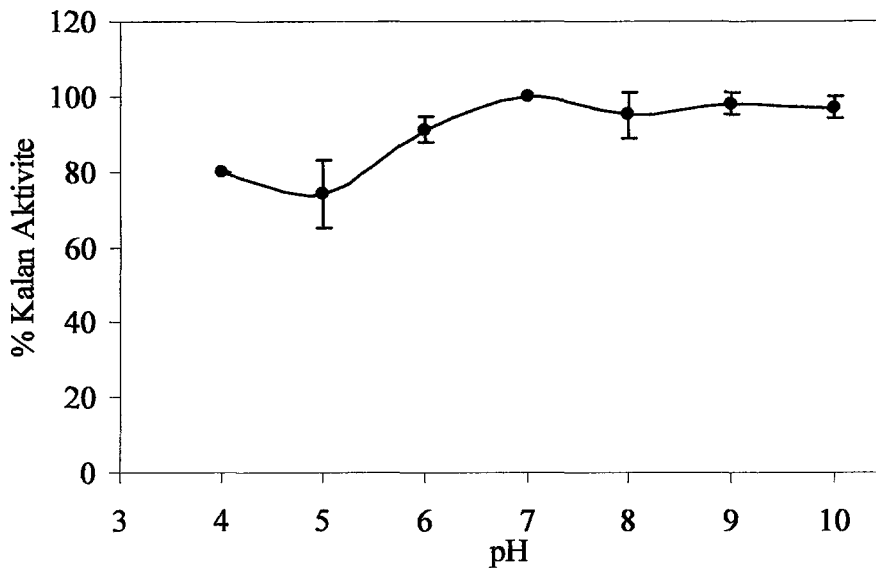
Şekil 37. A4 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

K4 suşundan elde edilen katalazın, pH 7,0-8,0 arasında kararlı kaldığı, pH 6,0 ve 9,0'da aktivitesini %79 oranında koruduğu belirlenmiştir. Diğer pH değerlerinde K4 katalazının ilk aktivitesinin % 50'sini kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 38).



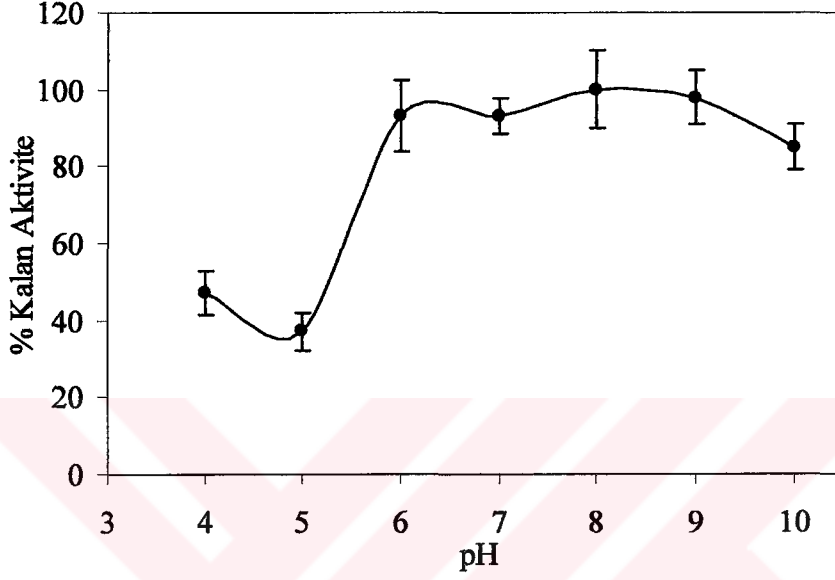
Şekil 38. K4 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

A5 suşundan elde edilen katalazın 6,0–10,0 arasındaki pH değerlerinde büyük bir oranda ( %91–100) kararlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 39). A5 katalazının, düşük pH değerlerinde ise ilk aktivitesini %74–80 oranlarında koruyabildiği görülmüştür.



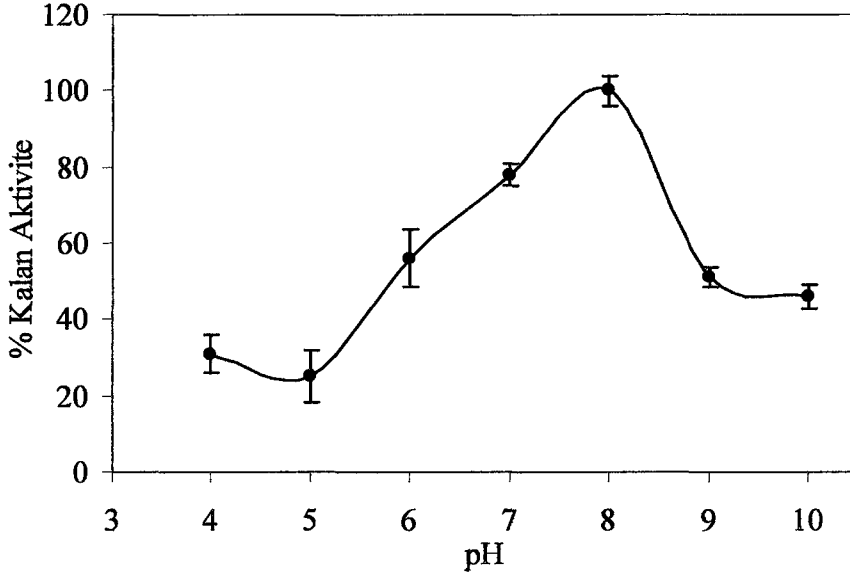
Şekil 39. A5 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

A6 suşundan elde edilen katalazın pH 6,0'ın üzerindeki değerlerinde büyük oranda kararlılığını korurken, düşük pH değerlerinde ise ilk aktivitesini büyük oranda kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 40). A6 katalazının, pH 6,0 ile pH 7,0 değerlerinde %93 oranında, pH 9,0'da %98 ve pH 10,0'da %85 oranlarında kararlı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 40. A6 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

A2 katalazı ise 24 saat bekletme süresi sonunda pH 4,0'de %31, pH 5,0'de %25, pH 6,0'da %56, pH 7,0'de %78, pH 8,0'de %100, pH 9,0'da %51, pH 10,0'da %46 oranlarında ilk aktiviteyi koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 41). Bu verilerden de anlaşıldığı gibi, A2 katalazının pH 8,0'de kararlı iken, pH 7,0'de kısmen kararlı olduğu ve diğer pH değerlerinde ise oldukça kararsız olduğu görülmüştür.

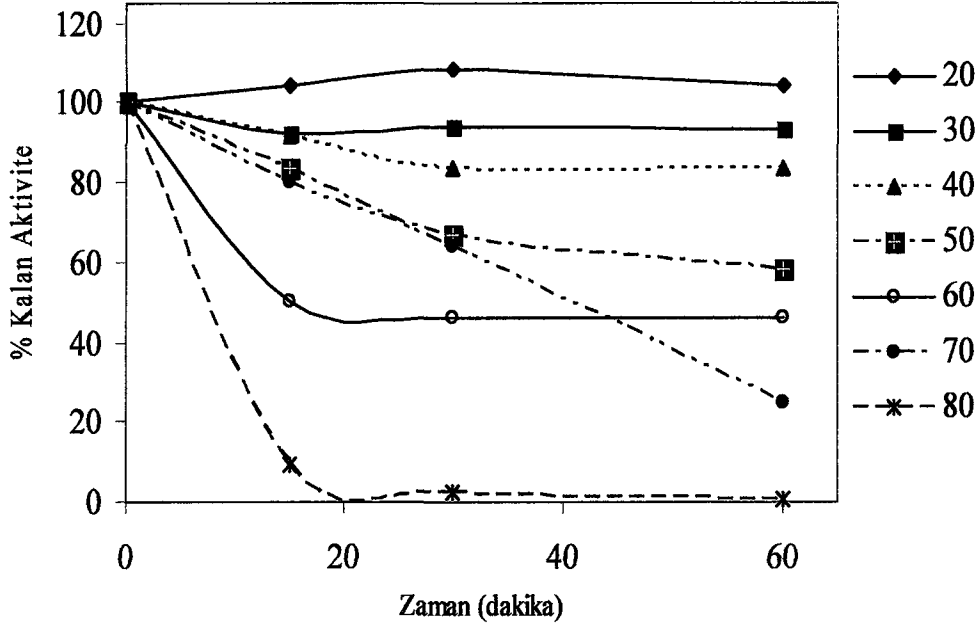


Şekil 41. A2 suşundan elde edilen katalazın pH kararlılık grafiği

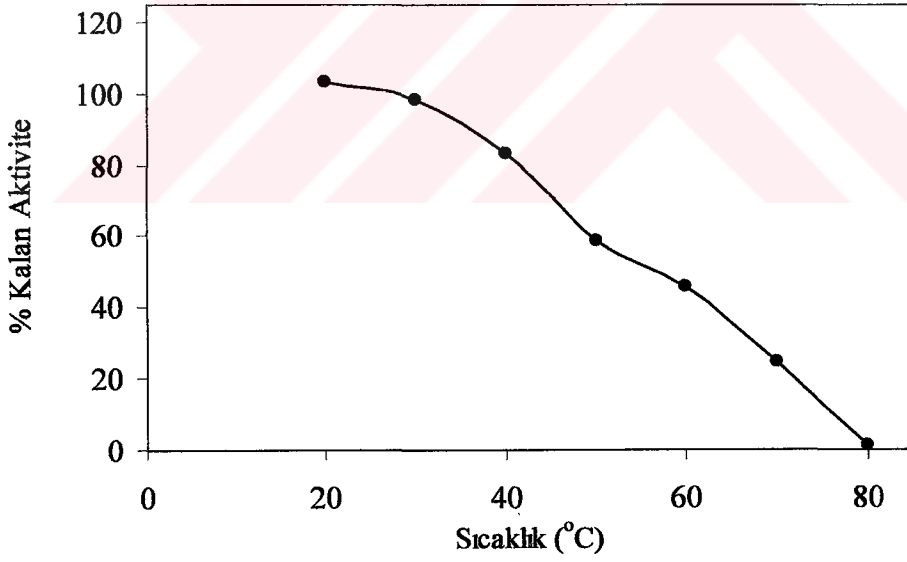
### 3.7. Termofilik Katalazların Isıl Kararlılıkları

Termofilik suşlardan elde edilen katalazların, 20–80 °C arasındaki sıcaklıklarda 15, 30 ve 60 dakikalık inkübasyon süreleri sonucunda bulunan aktiviteleri, ısıtılmadan önceki aktivitelerine oranlanarak kalan aktiviteleri hesaplanmıştır.

A3 suşundan elde edilen katalazın 20 ile 40 °C arasında ısıl kararlılık gösterdiği, 80 °C'de ise aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 42). A3 katalazının ilk aktivitesini 15 dakika bekletme süresi sonunda 20 °C'de %104, 30 ile 40 °C'de %92, 50 °C'de %84, 70 °C'de %80 oranlarında koruduğu saptanmıştır. 20 °C'de ilk aktivitenin 30 dakika sonunda %108'ini, 60 dakika sonunda %104'ünü koruduğu tespit edilmiştir. 30 °C'de 30 ile 60 dakika bekletme süreleri sonunda %2 oranında, 40 °C'de ise 30 ile 60 dakika sonunda %16 oranında aktivitede bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. 60 °C'de aktivitenin 15 dakika bekletme sonrasında %50, 30 ve 60 dakika sonunda ise %46 oranında korunduğu gözlenmiştir. 80 °C'de 15 dakika bekletme süresi sonunda %9 oranında korunan aktivitenin, 60 dakika sonunda tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 43). Ayrıca A3 katalazının aktivasyon enerjisi ( $E_a$ )  $70207 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden de 30 °C'ye kadar kararlı olduğu, 40 °C'de kısmen kararlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 9).



Şekil 42. A3 katalazının termal kararlılık grafiği

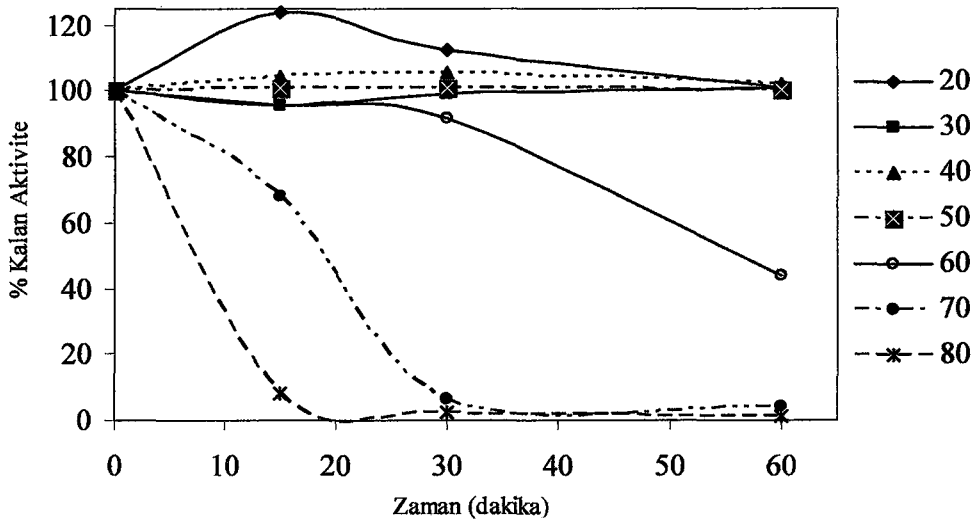


Şekil 43. A3 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

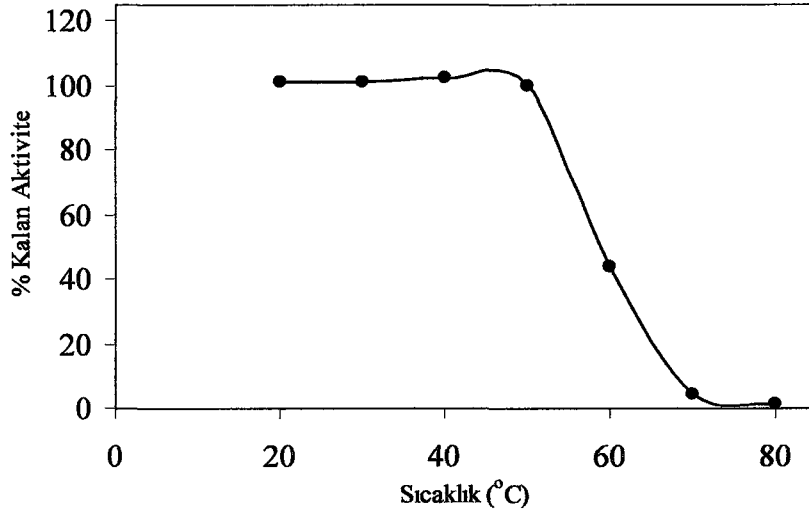
Tablo 9. A3 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ (s <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\#$ (J mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\#$ (J mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\#$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
293	1,3	300775	67771	-795
303	1,9	312081	67688	-806
313	5,0	325014	67605	-822
323	15,0	338401	67521	-838
333	21,6	349972	67438	-848
343	38,0	362177	67355	-860
353	132,0	376475	67272	-876

Ay9 suşundan elde edilen katalazın 20-60 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında kararlı kaldığı, 70 ve 80 °C’lerde 60 dakika bekleme süreleri sonunda aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 44-45). Ayrıca 60 °C’de 15 dakika bekleme süresi sonunda ilk aktivitesini %96, 30 dakika sonunda %92 oranında korurken, 60 dakika bekleme süresi sonunda bu oranın % 44’e düştüğü belirlenmiştir. Yine aynı şekilde 70 °C’de ilk 15 dakikada %68 oranında korunan aktivitenin, 60 dakika sonunda %96 oranında azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca Ay9 katalazının  $E_a$  değeri 140598 J mol<sup>-1</sup> olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden de 50 °C’ye kadar kararlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).



Şekil 44. Ay9 katalazının termal kararlılık grafiği

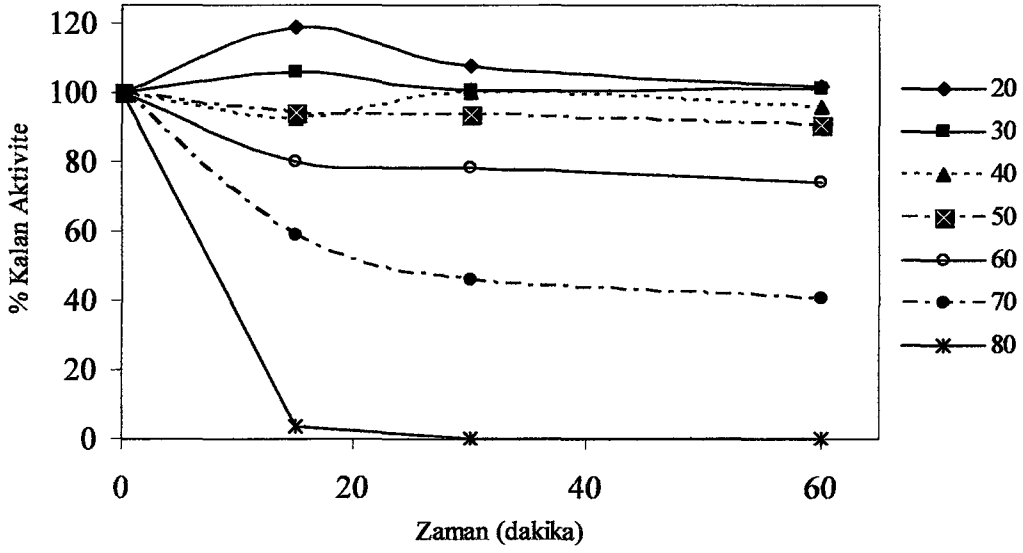


Şekil 45. Ay9 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

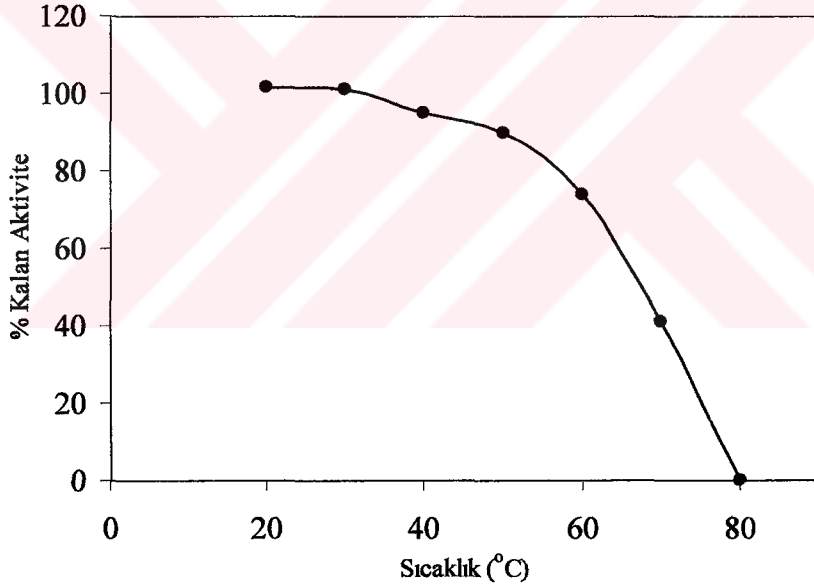
Tablo 10. Ay9 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )
293	0,69	299232	81926	-742
303	0,69	309529	81843	-751
313	0,69	319829	81760	-761
323	0,69	330132	81677	-769
333	22,8	350122	81594	-806
343	88,0	364572	81510	-825
353	127,0	376362	81427	-836

TK4 katalazının 20 ile 30 °C'lerde kararlı kaldığı ve 40 ile 50 °C'lerde ise aktivitenin büyük bir kısmının (%91-96 oranlarında) korunduğu saptanmıştır (Şekil 46). 60 dakika bekleme süresi sonunda 20 ile 30 °C sıcaklıklarda %101, 40 °C'de %96, 50 °C'de %91, 60 °C'de %74 oranlarında aktivite gösterdiği, 70 °C'de %41 oranında korunan aktivitenin 80 °C'de tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 47).



Şekil 46. TK4 katalazının termal kararlılık grafiği



Şekil 47. TK4 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

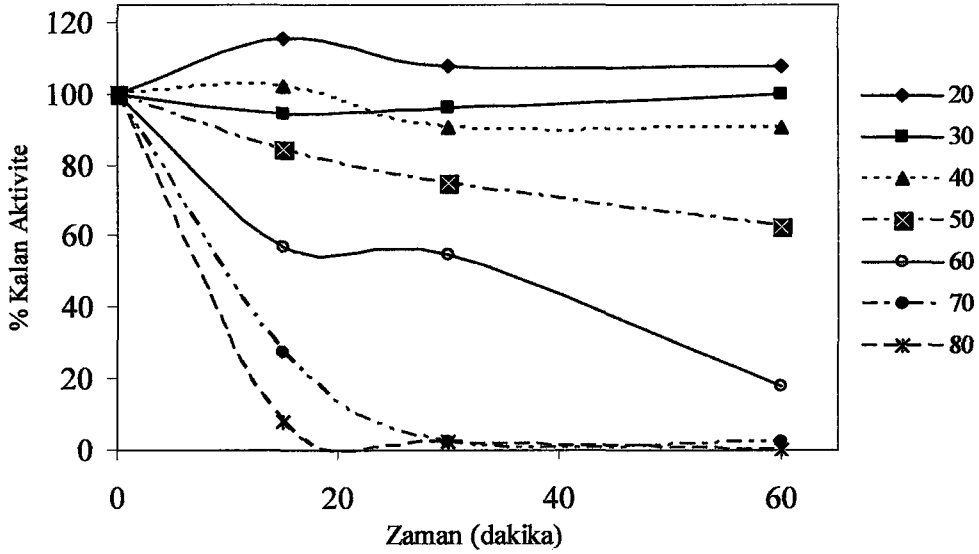
Ayrıca TK4 katalazının  $E_a$  değeri  $108190 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar kararlı olduğu tespit edilmiştir.  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda  $\Delta S^\ddagger$  değerinin aniden arttığı ve enzimin denatüre olmaya başladığı belirlenmiştir (Tablo 11).



Tablo 11. TK4 katalazına ait termodinamik parametreler

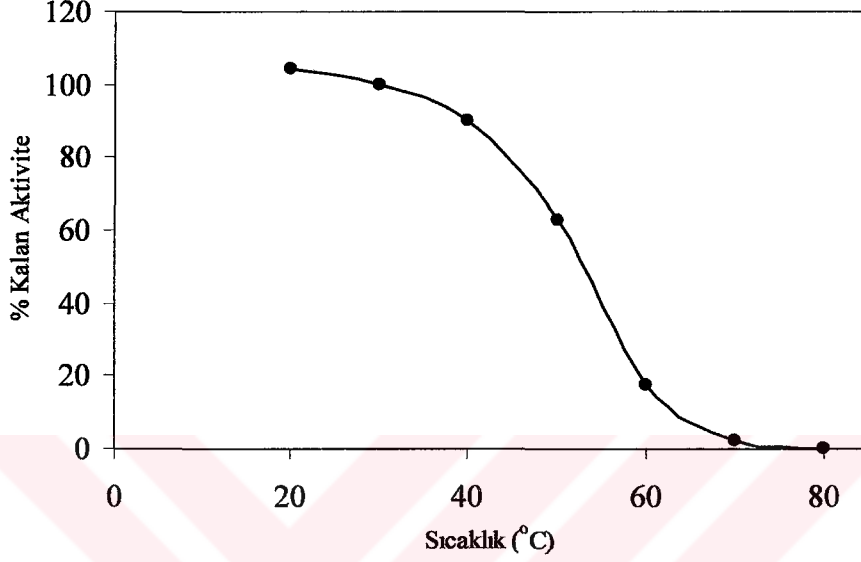
Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )
293	4,6	303854	105754	-676
303	1,6	311648	105671	-680
313	1,4	321708	105588	-691
323	2,9	334006	105505	-707
333	8,4	347344	105421	-727
343	24,7	360949	105338	-745
353	184,0	377450	105255	-771

A9 suşundan elde edilen katalazın 20 °C’de kararlı olduğu, aynı zamanda 30 ve 40 °C’lerde aktivitesinin büyük bir kısmını muhafaza ettiği gözlenmiştir (Şekil 48). 40 °C’de ilk 15 dakikada başlangıç aktivitesini tamamen koruduğu, 60 dakika sonunda aktivitesinin %10’unu kaybettiği gözlenmiştir. 50 °C’de ilk 15 dakika sonunda ilk aktivitenin %84’ünü gösterirken, bu oranın 30 dakika sonunda %75’e, 60 dakika sonunda ise %63’e inmiş olduğu belirlenmiştir.



Şekil 48. A9 katalazının termal kararlılık grafiği

A9 katalazı, 60 °C’de 15 dakika bekletme süresi sonunda ilk aktivitenin % 57’sini, 30 dakika sonunda %55’ini, 60 dakika sonunda ise %18’ini gösterdiği tespit edilmiştir. 70 °C’de 60 dakika bekletme süresi sonunda aktivite %2 oranında korunurken, 80 °C’de aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmüştür (Şekil 49).



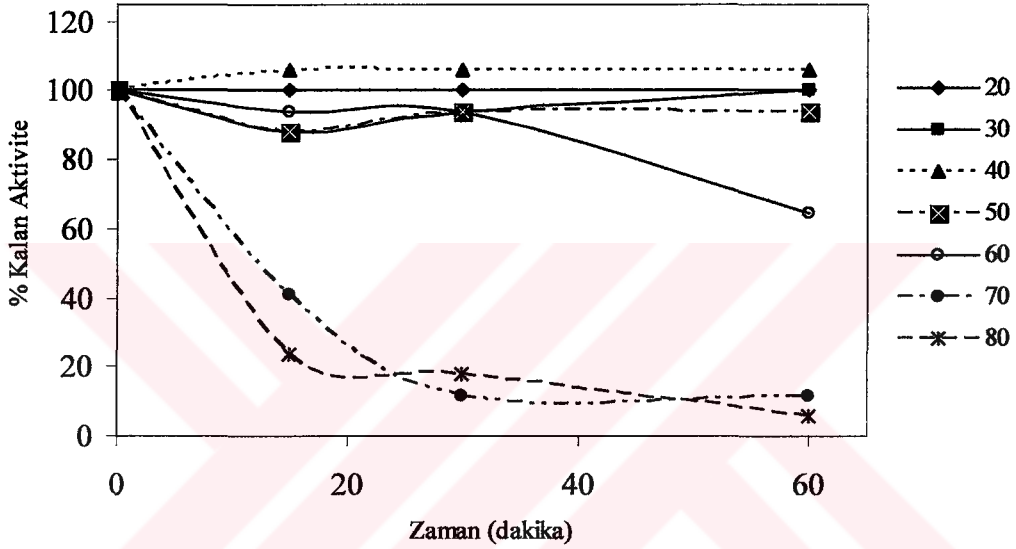
Şekil 49. A9 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

A9 katalazının  $E_a$  değeri  $100284 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca A9 katalazına ait termodinamik verilerin de 30 °C’ye kadar kararlı olduğu, 40 °C’de kısmen kararlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 12).

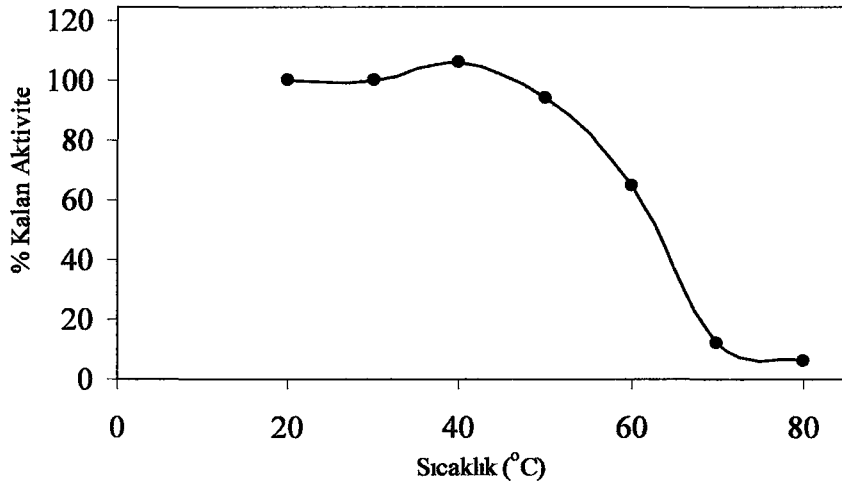
Tablo 12. A9 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $J \text{ mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $J \text{ mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $J \text{ mol}^{-1} K^{-1}$ )
293	2,3	302165	97848	-697
303	2,3	312563	97764	-709
313	2,9	323584	97681	-722
323	12,8	337975	97598	-744
333	48,2	352194	97515	-765
343	108,0	365156	97432	-781
353	230,0	378105	97349	-795

K1 suşundan elde edilen katalazın 20 ile 40 °C'lerde oldukça kararlı olduğu, 30, 50 ve 60 °C'lerde aktivitesini büyük bir oranda koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 50). K1 katalazı 50 ile 60 °C sıcaklıklarda ilk 30 dakika aktivitesini %94 oranında korurken, 60 dakika sonunda 50 °C'de bu oranın sabit kaldığı 60 °C'de ise bu oranın %65'e düştüğü belirlenmiştir. İlk aktivitenin 70 ve 80 °C sıcaklıklarda ilk 15 dakikada sırasıyla %41'i ile %24'ü korunurken, 60 dakika sonunda bu oranların %12 ve %6'ya düştüğü görülmüştür (Şekil 51).



Şekil 50. K1 katalazının termal kararlılık grafiği



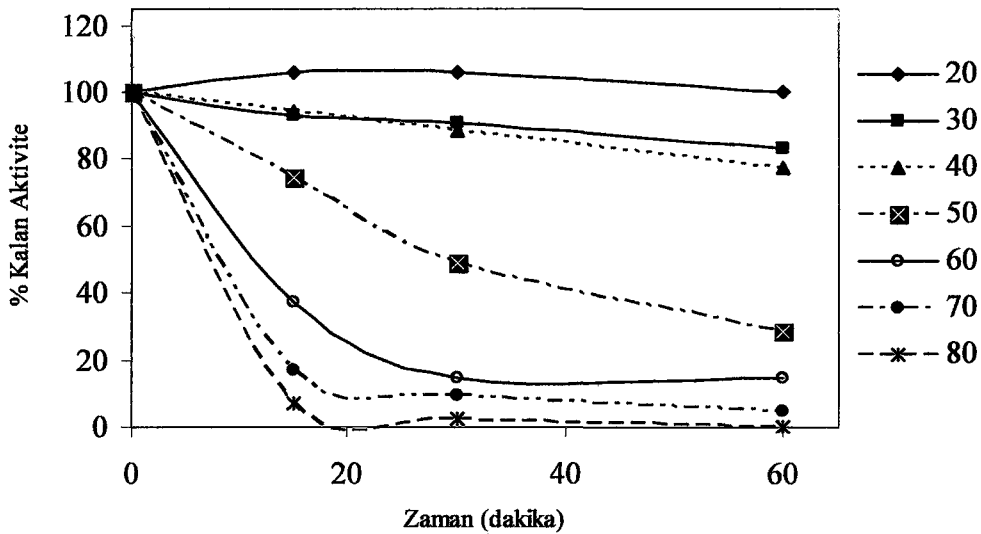
Şekil 51. K1 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

Ayrıca K1 katalazının  $E_a$  değeri  $124677 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar kararlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'in üzerinde ise  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$  ve  $\Delta S^\ddagger$  değerlerindeki ani artışlar katalazın denatüre olduğunu göstermektedir.

Tablo 13. K1 katalazına ait termodinamik parametreler

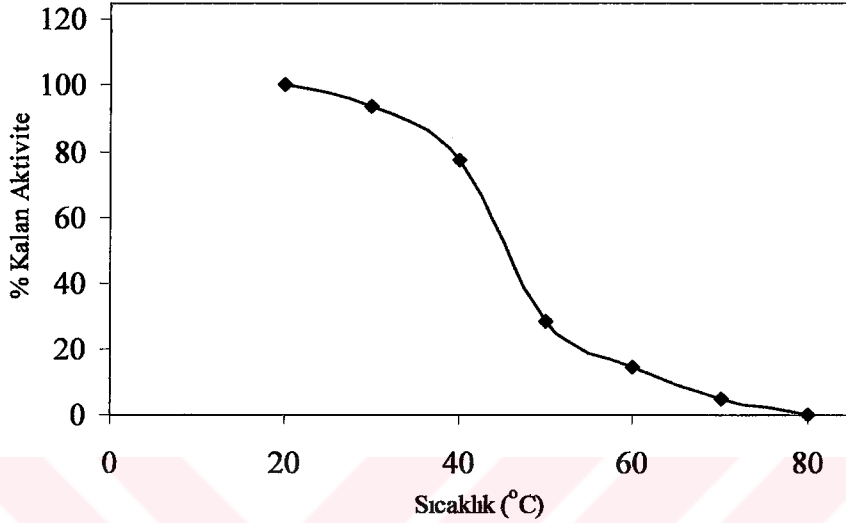
Sıcaklık ( $^\circ\text{K}$ )	$k \times 10^{-5}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta G^\ddagger$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\ddagger$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\ddagger$ ( $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )
293	2,9	302747	122241	-616
303	2,9	313164	122158	-630
313	2,9	323584	122074	-644
323	1,7	332554	121991	-652
333	11,9	348321	121908	-680
343	58,0	363383	121825	-704
353	78,0	374931	121742	-717

A4 suşundan elde edilen katalazın  $20\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıklar arasında ilk 30 dakika boyunca oldukça kararlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 52).



Şekil 52. A4 katalazının termal kararlılık grafiği

A4 katalazının, 60 dakika bekletme süresi sonunda ilk katalaz aktivitesini 20 °C'de %100, 30 °C'de %84, 40 °C'de %77, 50 °C'de %27, 60 °C'de %14, 70 °C'de %5 oranında koruduğu ve 80 °C'de aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 53).



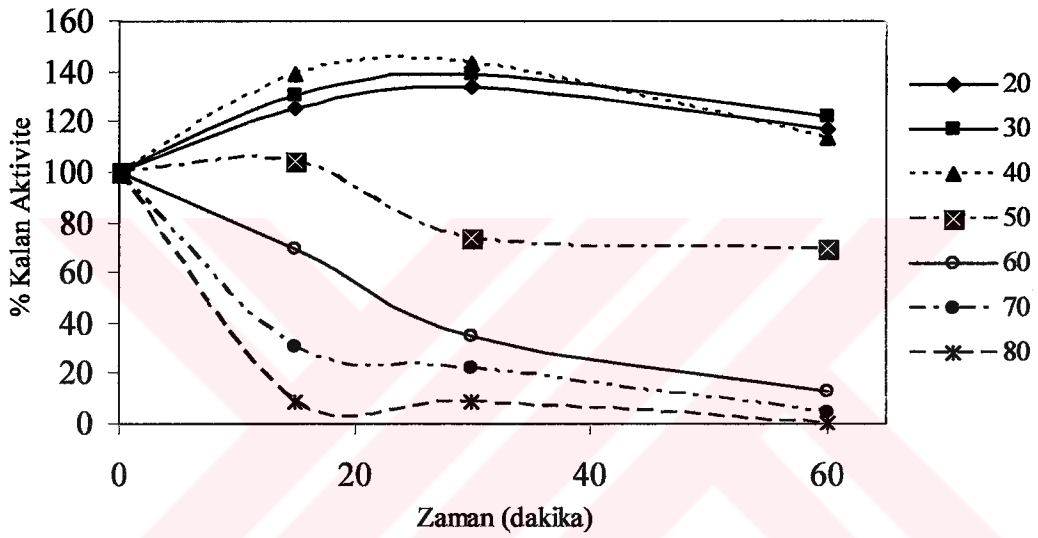
Şekil 53. A4 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

A4 katalazının  $E_a$  değeri  $76823 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca A4 katalazından elde edilen termodinamik veriler A4 katalazının 30 °C'ye kadar kararlı olduğunu göstermektedir (Tablo 14).

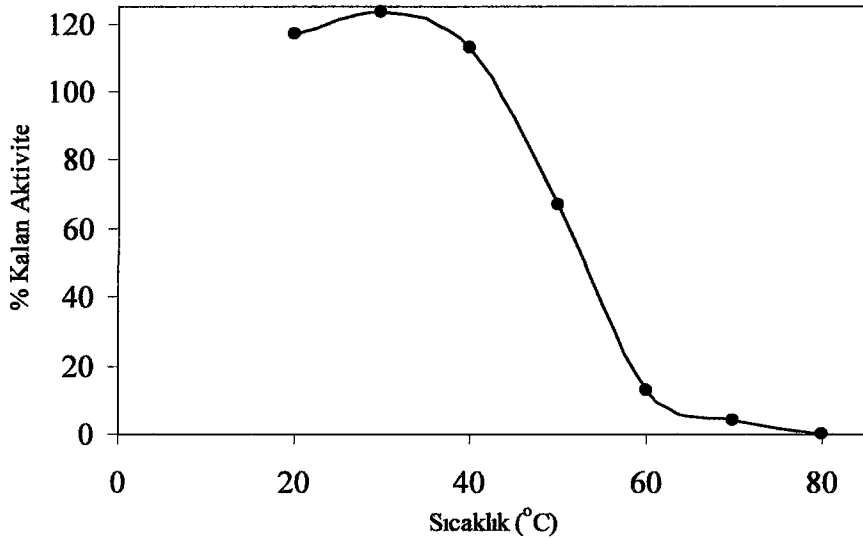
Tablo 14. A4 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )
293	2,3	302165	74387	-777
303	1,9	312108	74304	-785
313	7,2	325932	74221	-804
323	34,7	340654	74138	-825
333	54,0	352509	74054	-836
343	84,3	364449	73971	-847
353	160,0	377040	73888	-859

K4 suşundan elde edilen katalazın 50 °C'ye kadar kararlı olduğu, yalnızca 50 °C'de 30 dakikadan sonra aktivitesinin yaklaşık %30'unu kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 54). K4 katalazının 60 dakika bekleme periyodundan sonra 40 °C'ye kadar aktivitesini muhafaza ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, bu bekleme süresi sonunda 50 °C'de % 30 oranında azalan aktivitenin, 60 °C ve üstündeki sıcaklıklarda %15 oranının altına düştüğü ve 80 °C'de ise tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 55). Ayrıca K4 katalazının aktivasyon enerjisi 78616 J mol<sup>-1</sup> olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden de 40 °C'ye kadar kararlı olduğu, 50 °C'den sonra ise enzimin denatüre olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15).



Şekil 54. K4 katalazının termal kararlılık grafiği

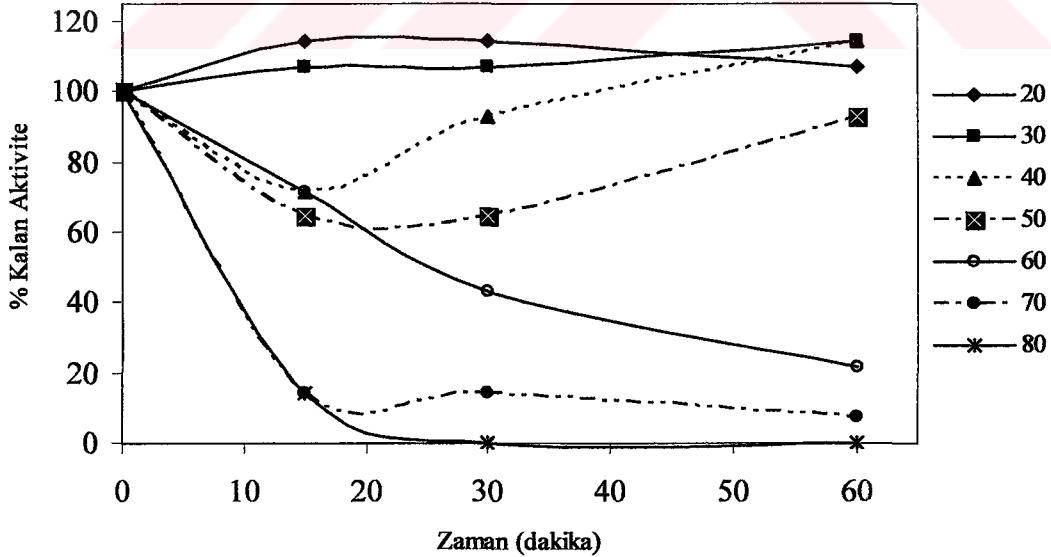


Şekil 55. K4 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

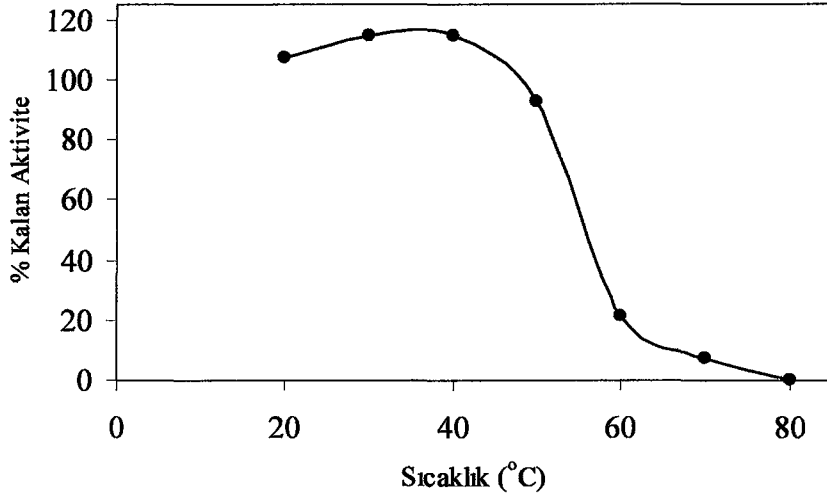
Tablo 15. K4 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $J mol^{-1}K^{-1}$ )
293	2,3	302165	76180	-771
303	2,3	312563	76097	-780
313	13,8	327626	76014	-804
323	11,0	337568	75931	-810
333	56,0	352610	75848	-831
343	87,0	364539	75765	-842
353	161,0	377058	75682	-854

A5 suşundan elde edilen katalazın 20-40 °C sıcaklıkları arasında kararlı olduğu, fakat, 50 °C'de ilk 30 dakikaya kadar %64 oranında olan aktivitenin 60 dakika sonunda %93'lere vardığı gözlenmiştir (Şekil 56). 60 dakika sonunda 60°C'de %22 oranında korunan aktivitenin 70 °C'de %7'ye düştüğü, 80 °C'de ise tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Şekil 57).



Şekil 56. A5 katalazının termal kararlılık grafiği



Şekil 57. A5 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

A5 katalazı için  $E_a$  değeri  $77991 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden de ısıl olarak  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar kararlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 16).  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'den sonra  $\Delta G^\#$  ve  $\Delta S^\#$  değerlerindeki ani artışlar katalazın denatüre oluşunu göstermektedir.

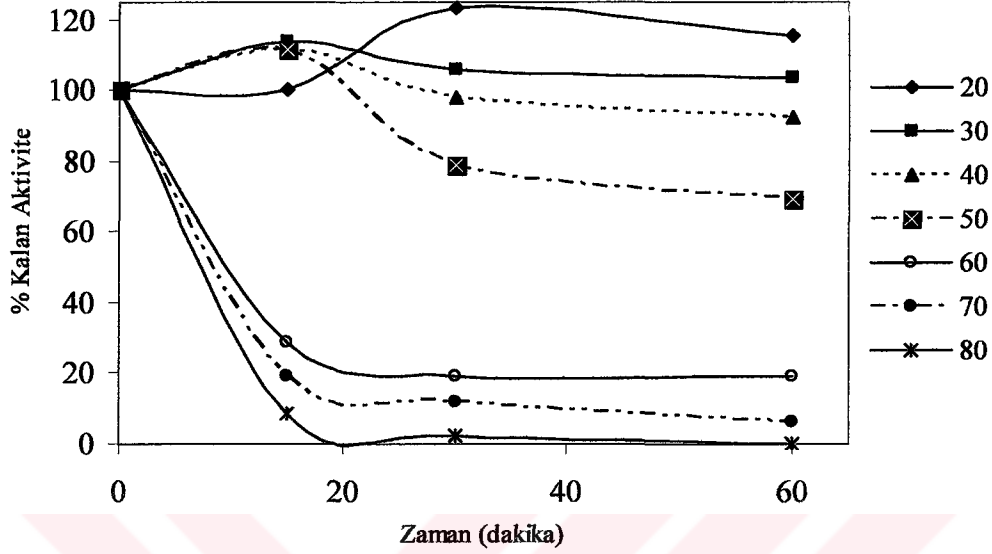
Tablo 16. A5 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )
293	2,3	302165	75555	-773
303	2,3	312562	75472	-782
313	4,6	324766	75389	-797
323	2,0	333043	75306	-798
333	42,8	351865	75222	-831
343	73,4	364055	75139	-842
353	161,0	377058	75056	-855

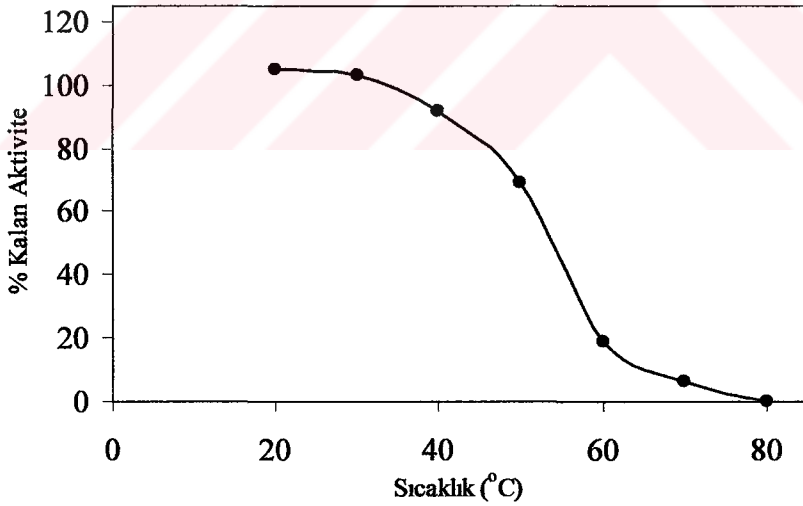
A6 suşundan elde edilen katalazın  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir. A6 katalazının  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ilk 15 dakika sonunda % 112 oranında kararlı olduğu, 30 dakika sonunda bu oranın %79'a, 60 dakika sonunda ise %69'a düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 58). 60 dakika bekleme süresi sonunda A6 katalazının ilk aktivitesini 40



°C'ye kadar büyük bir oranda koruduğu, 50 °C'den sonra bu oranın düştüğü ve 80 °C'de tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 59).



Şekil 58. A6 katalazının termal kararlılık grafiği



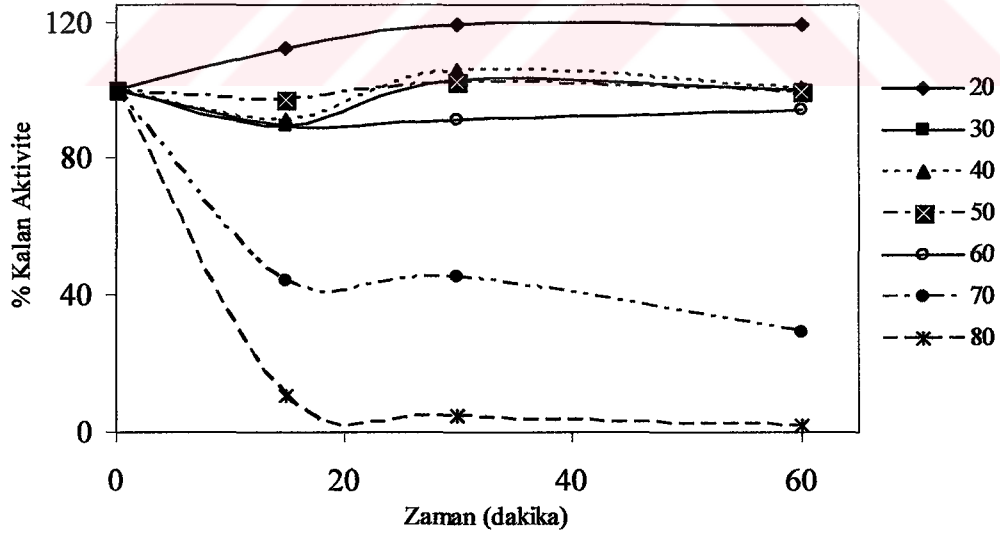
Şekil 59. A6 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

A6 katalazının termodinamik verilerinden de 30 °C'ye kadar kararlı, 40 derecede kısmen kararlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca aktivasyon enerjisi  $99602 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanan katalazın 50 °C'den sonra denatüre olmaya başladığı tespit edilmiştir (Tablo 17).

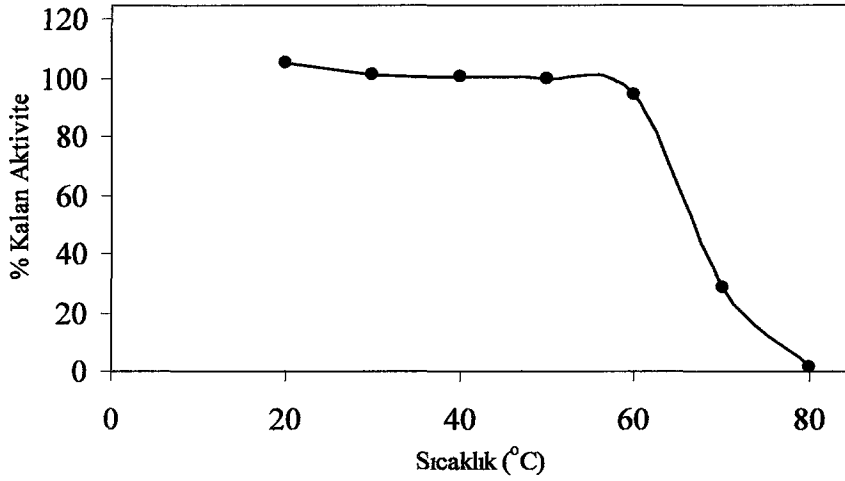
Tablo 17. A6 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $J mol^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ )
293	4,6	303859	97166	-705
303	2,3	312563	97083	-711
313	2,3	322974	96999	-722
323	10,3	337392	96916	-745
333	46,1	352071	96833	-766
343	78,2	364235	96750	-780
353	184,0	377450	96667	-795

A2 suşundan elde edilen katalazın ise, 50 °C'ye kadar ısıl kararlık gösterdiği, bunun yanında 60 °C'de ilk aktivitesini büyük bir oranda (%95) koruduğu gözlenmiştir (Şekil 60). 60 dakika bekleme süresi sonunda, 60 °C'ye kadar büyük oranda saklanan aktivitenin 70 °C'de %29 oranına düştüğü ve 80 °C'de hemen hemen kaybolduğu tespit edilmiştir (Şekil 61).



Şekil 60. A2 katalazının termal kararlılık grafiği



Şekil 61. A2 katalazının 60. dakikadaki termal kararlılık grafiği

A2 katalazı için  $E_a$  değeri  $227529 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplanmış olup, termodinamik verilerden ısıl olarak  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar kararlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 18).  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ise kısmen kararlı olan katalazın,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'den sonra denatüre olmaya başladığı belirlenmiştir.

Tablo 18. A2 katalazına ait termodinamik parametreler

Sıcaklık (°K)	$k \times 10^{-5}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )
293	6,9	304842	225093	-272
303	1,6	311664	225010	-286
313	2,3	322963	224927	-313
323	1,1	331409	224844	-330
333	1,6	342766	224761	-354
343	34,6	361910	224678	-400
353	116,0	376096	224594	-429

### 3.8. Termofilik Suşlardan Elde Edilen Katalazların Kinetiği

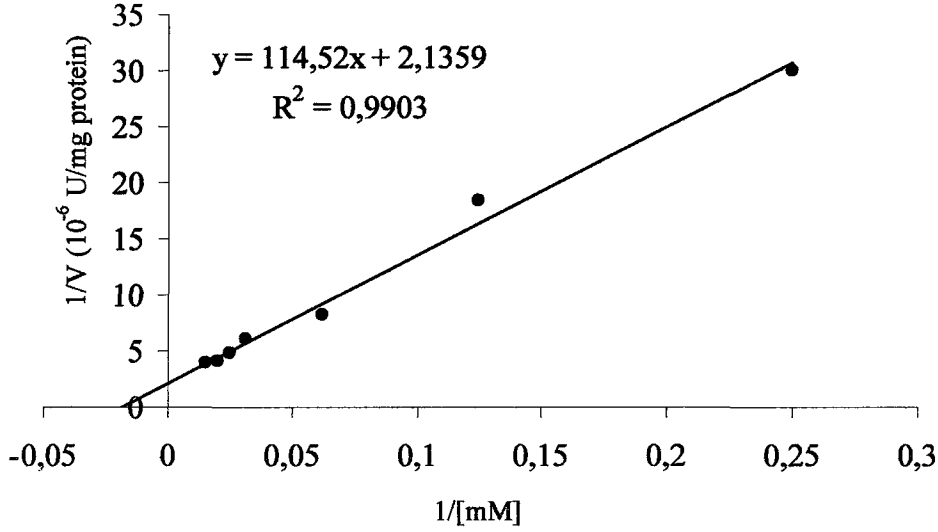
Enzim kinetiği çalışmalarında, termofilik suşlardan elde edilen katalazların optimize edilmiş deneme ortamında ulaşabileceği maksimum hız ( $V_{\text{maks}}$ ) değerleri ve her bir suşun katalazının  $\text{H}_2\text{O}_2$  substratına ilgisini gösteren Michaelis sabiti ( $K_m$ ) değerleri, Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek tespit edilmiştir (Tablo 19). Ayrıca değişen substrat

konsantrasyonlarına karşılık okunan hız ( $V$ ) ve buna karşılık gelen  $V_{maks}$  değerleri kullanılarak elde edilen  $V/(V_{maks}-V)$  oranları Hill eşitliği gereğince grafiğe geçirilerek, substratının katalaz üzerindeki substrat-bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativitenin olup olmadığı da belirlenmiştir.

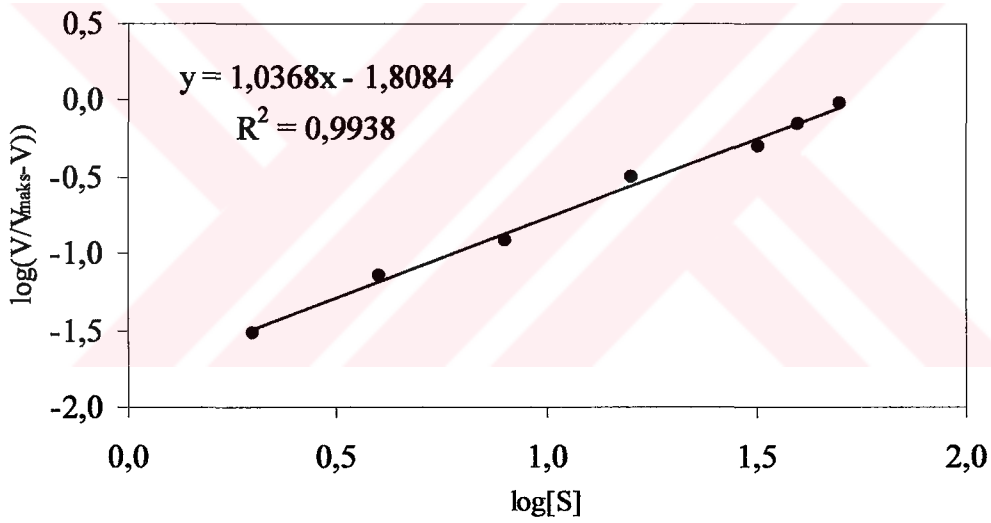
Tablo 19. Termofilik katalazlara ait bazı kinetik veriler

	$V_{maks}$ (U/mg protein)	$K_m$ (mM)	$V_{maks}/K_m$ (dk <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
A3	468186,7	53,6	8,74
Ay9	11457,3	24,5	0,47
TK4	16228,7	26,6	0,61
A9	10778,1	21,7	0,50
K1	6202,3	44,8	0,14
A4	4762,0	21,6	0,22
K4	6346,0	31,8	0,20
A5	10492,0	33,8	0,31
A6	3306,0	32,5	0,10
A2	5841,8	31,2	0,19

A3 suşundan elde edilen katalazın  $H_2O_2$  substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $468186,7 \pm 1200$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $53,6 \pm 1,7$  mM olarak belirlenmiştir (Şekil 62). Ayrıca Hill eğrisinden elde edilen Hill sabitinin ( $h$ ) değerinin 1'e yakın çıkması, A3 katalazının birden fazla substrat bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat enzimin kooperatif davranmadığını göstermektedir (Şekil 63).

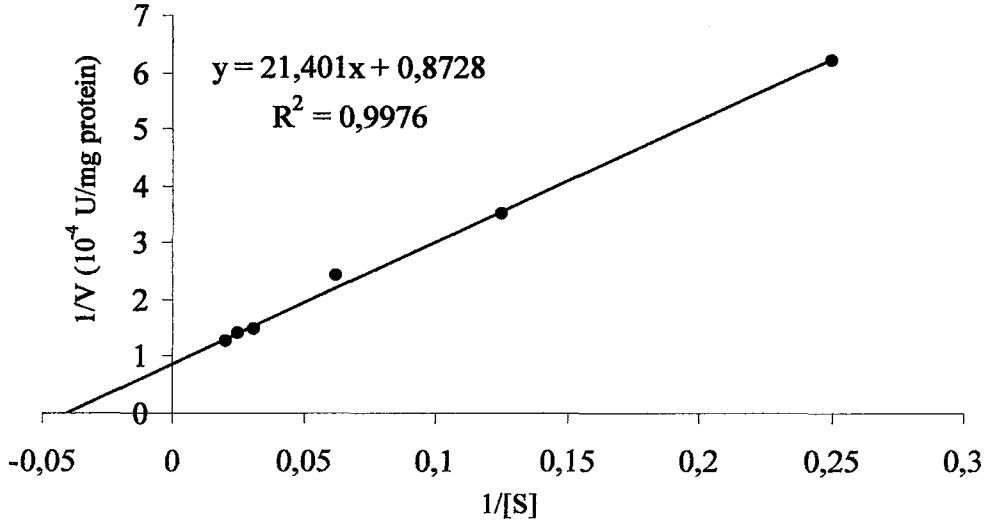


Şekil 62. A3 katalazının  $H_2O_2$  varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

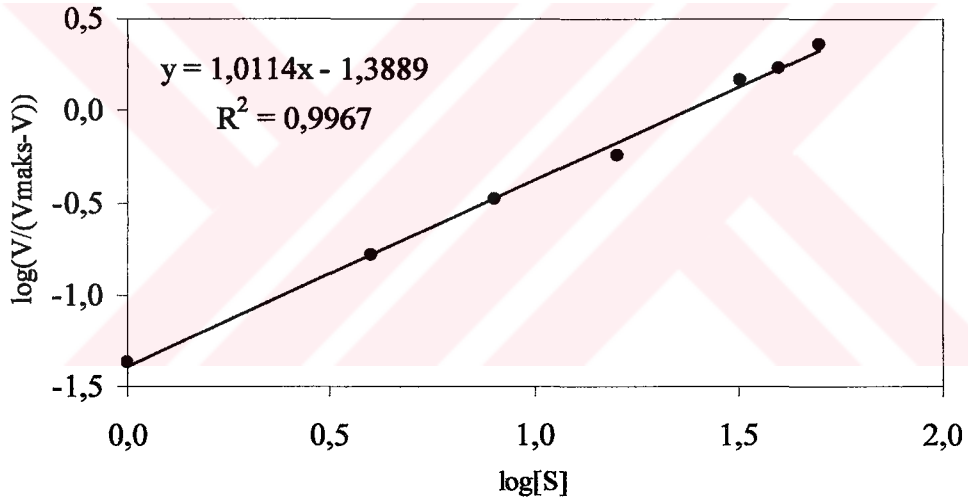


Şekil 63. A3 katalazının  $H_2O_2$  varlığında elde edilen Hill grafiği

Ay9 suşundan elde edilen katalazın  $H_2O_2$  substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $11457,3 \pm 487$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $24,5 \pm 1,2$  mM olarak tespit edilmiştir. (Şekil 64). Ay 9 katalazının  $H_2O_2$  substratının varlığında elde edilen Hill eğrisinin eğiminin dolayısıyla  $h$  değerinin 1'e yakın çıkmasıyla birden fazla bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığını belirtmektedir (Şekil 65).

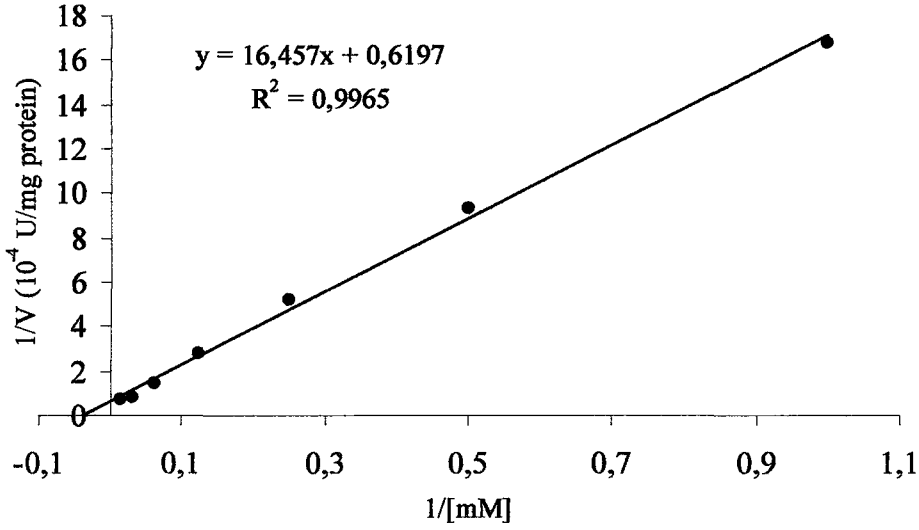


Şekil 64. Ay9 katalazının  $H_2O_2$  varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

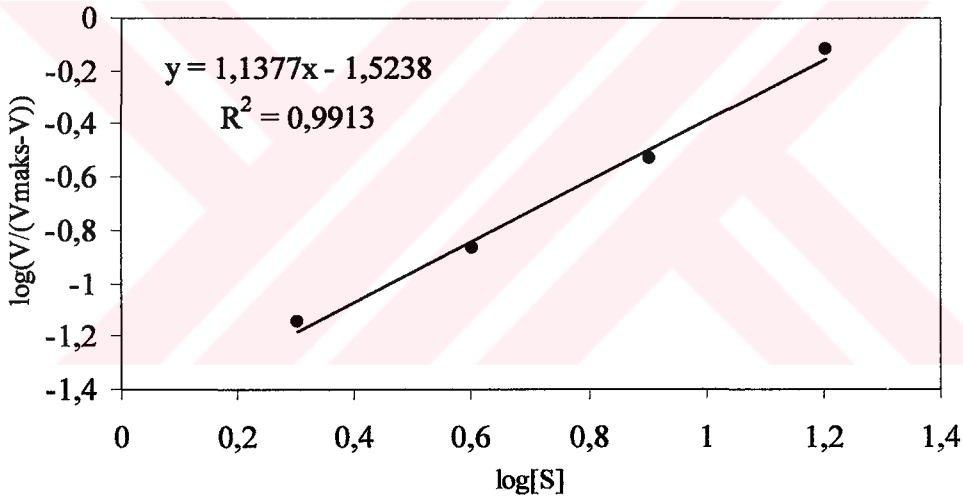


Şekil 65. Ay9 katalazının  $H_2O_2$  varlığında elde edilen Hill grafiği

TK4 suşundan elde edilen katalazın  $H_2O_2$  substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $16228,7 \pm 950$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $26,6 \pm 1,6$  mM olarak belirlenmiştir (Şekil 66). Ayrıca Hill grafiğinden elde edilen  $h$  değerinin 1'e yakın çıkması birden fazla substratının bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Şekil 67).

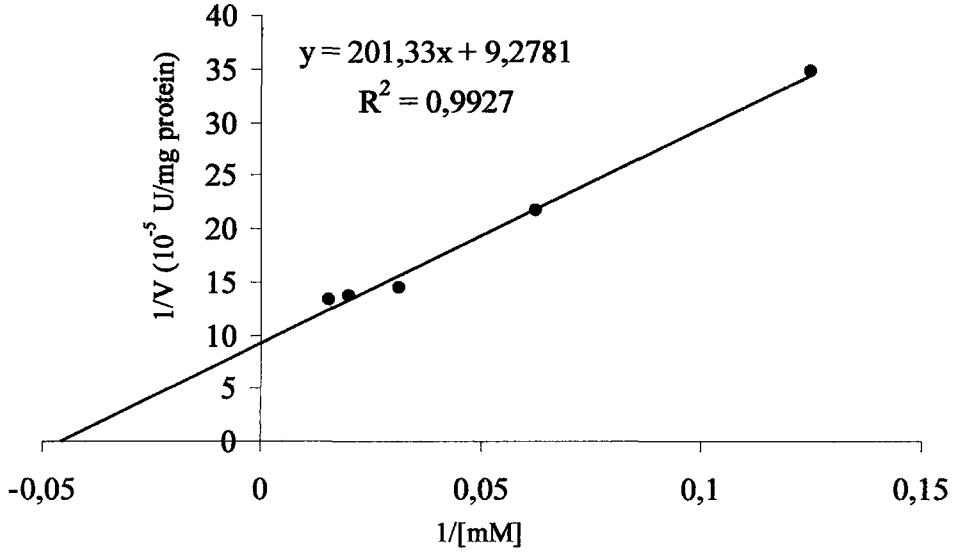


Şekil 66. TK4 katalazının  $H_2O_2$  varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

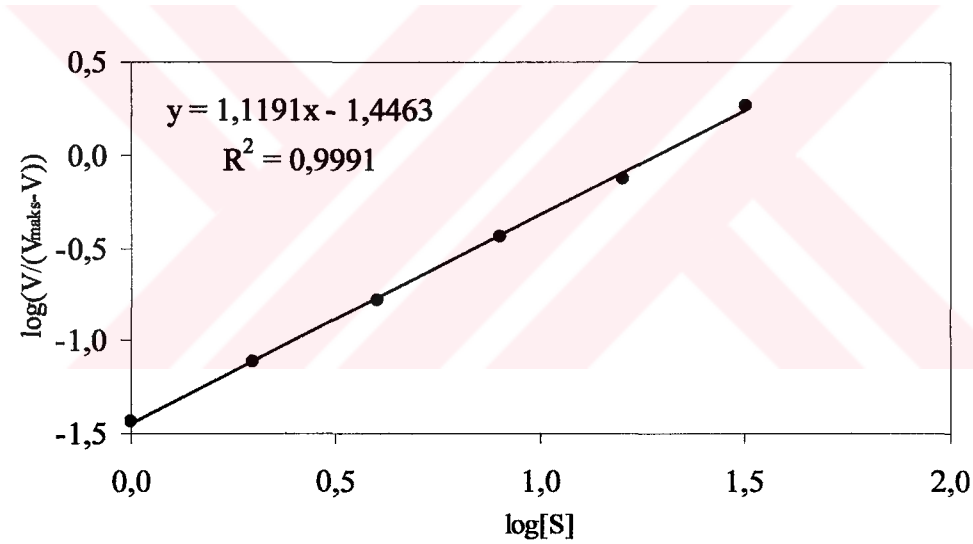


Şekil 67. TK4 katalazının  $H_2O_2$  varlığında elde edilen Hill grafiği

A9 suşundan elde edilen katalazın  $H_2O_2$  substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $10778,1 \pm 451$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $21,7 \pm 1,3$  mM olarak belirlenmiştir (Şekil 68). Hill grafiğinden elde edilen  $h$  değerinin 1'e yakın çıkması birden fazla substratının bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Şekil 69).



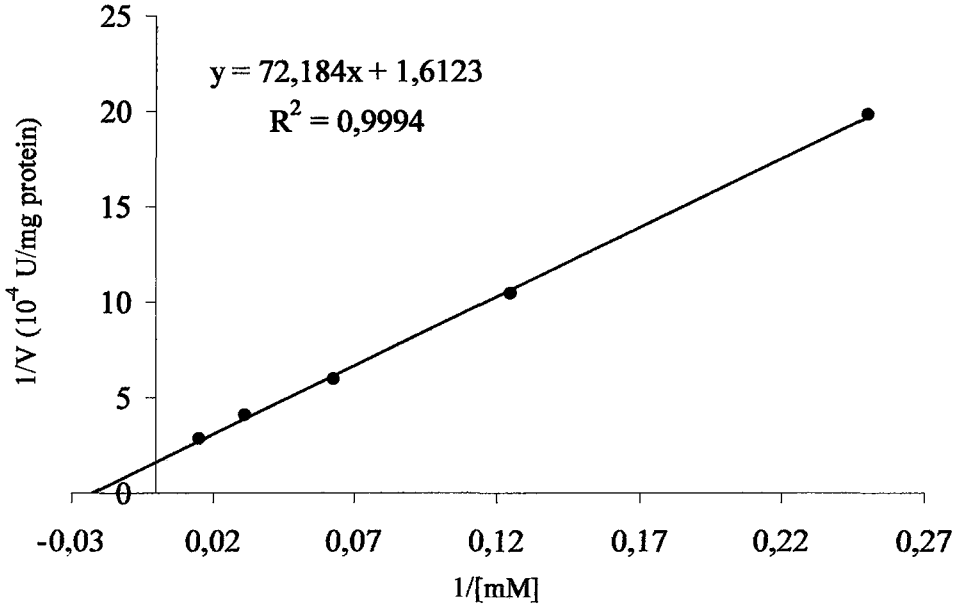
Şekil 68. A9 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği



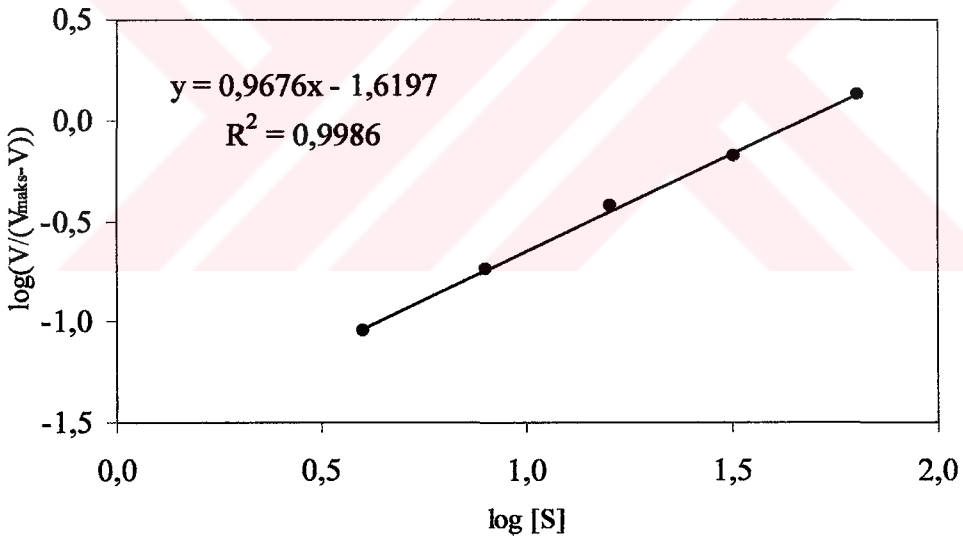
Şekil 69. A9 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği

K1 suşundan elde edilen katalazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V<sub>maks</sub> değeri 6202,3±158 U/mg protein ve K<sub>m</sub> değeri 44,8±1,3 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 70). Hill grafiğinden elde edilen *h* değerinin 1'e yakın çıkması birden fazla substratının bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Şekil 71).



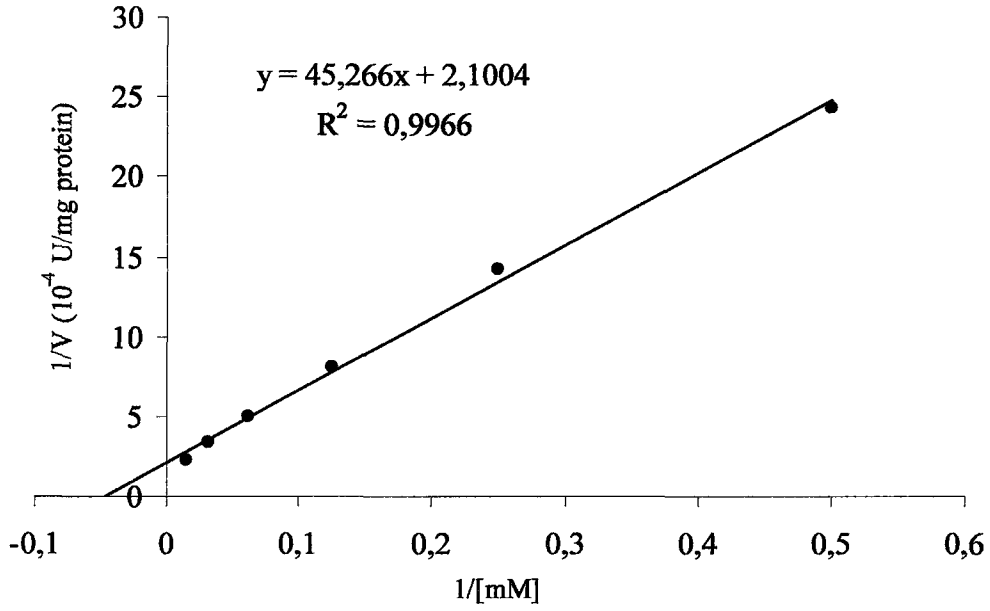


Şekil 70. K1 katalazının  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

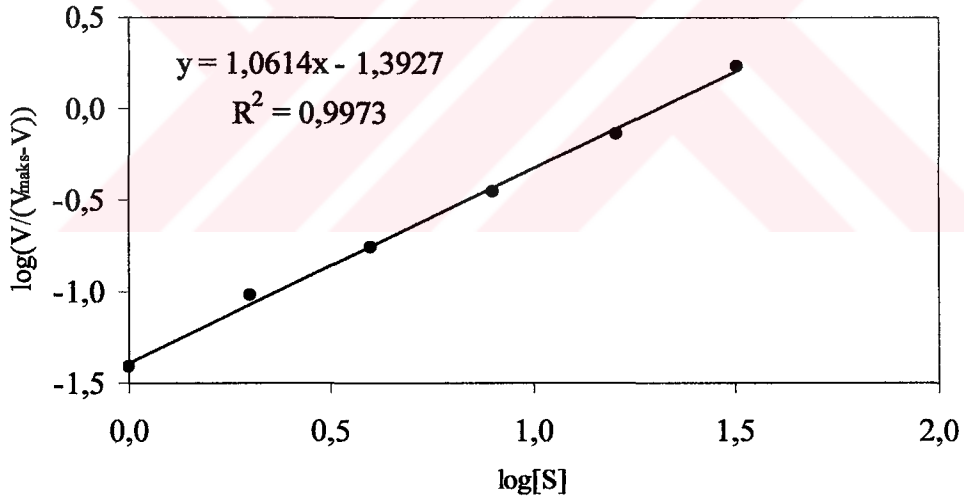


Şekil 71. K1 katalazının  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında elde edilen Hill grafiği

A4 suşundan elde edilen katalazın  $\text{H}_2\text{O}_2$  substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $4762,0 \pm 341$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $21,6 \pm 1,1$  mM olarak belirlenmiştir (Şekil 72). Ayrıca Hill grafiğinden elde edilen  $h$  değerinin 1'e yakın çıkması birden fazla substratının bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Şekil 73).

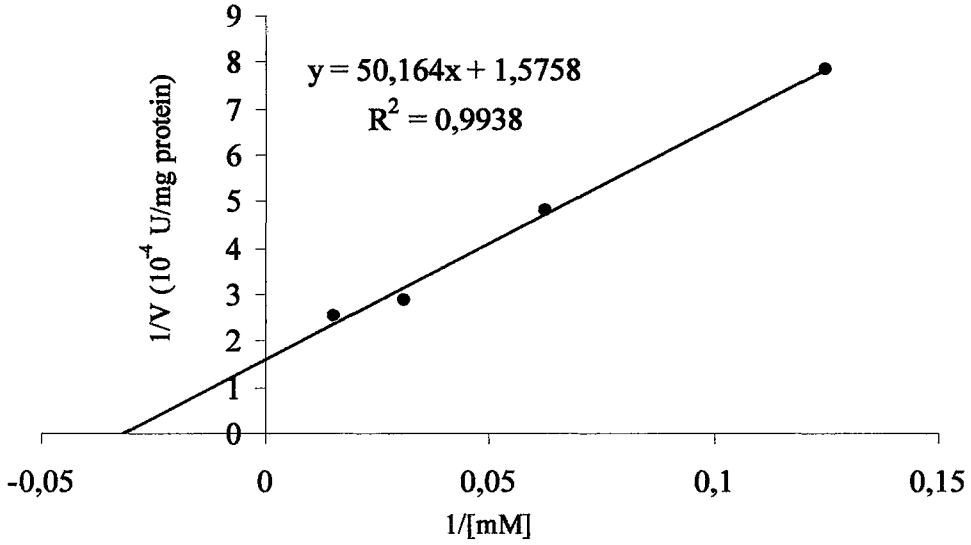


Şekil 72. A4 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

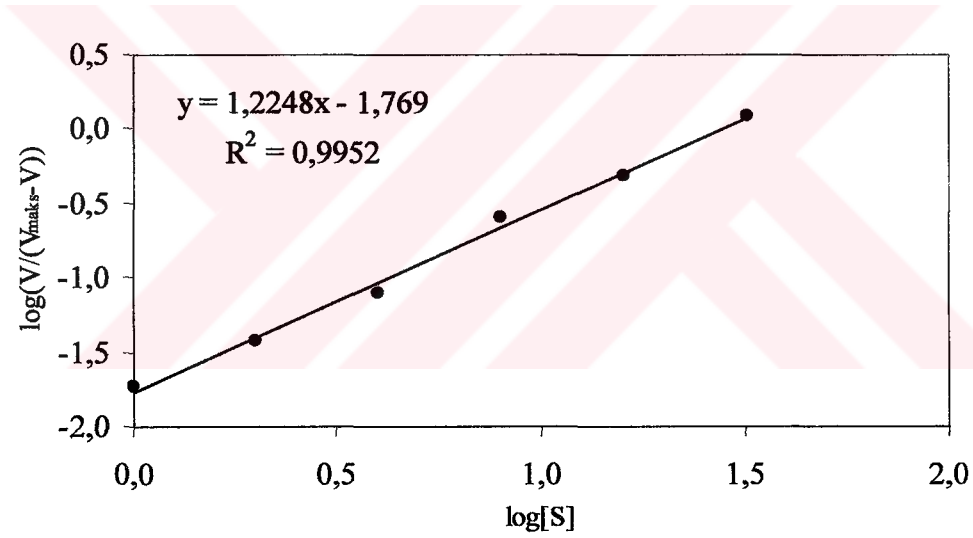


Şekil 73. A4 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği

K4 suşundan elde edilen katalazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $6346 \pm 268$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $31,8 \pm 1,4$  mM olarak tespit edilmiştir (Şekil 74). K4 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratının varlığında elde edilen Hill eğrisinin eğiminin dolayısıyla  $h$  değerinin 1'e yakın çıkmasıyla birden fazla bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığı görülmüştür (Şekil 75).

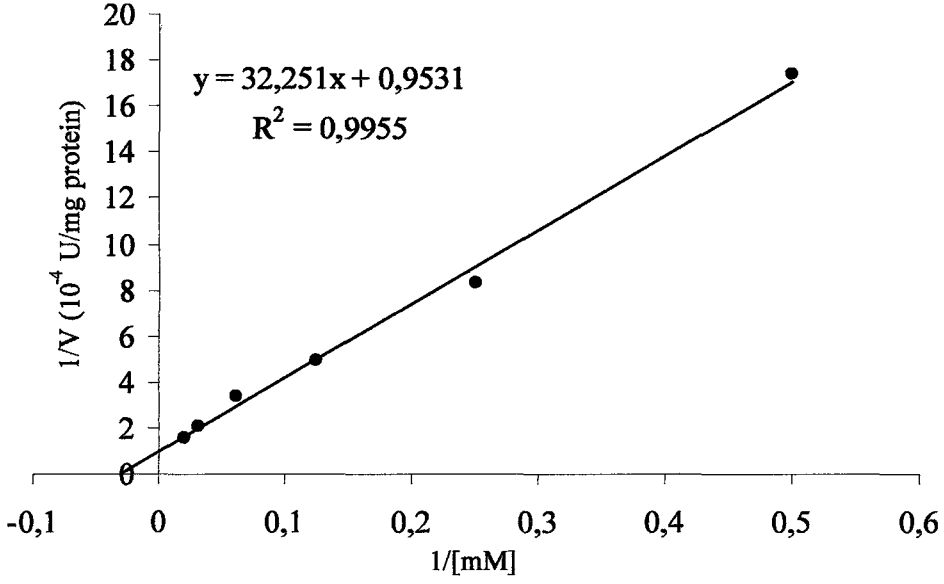


Şekil 74. K4 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

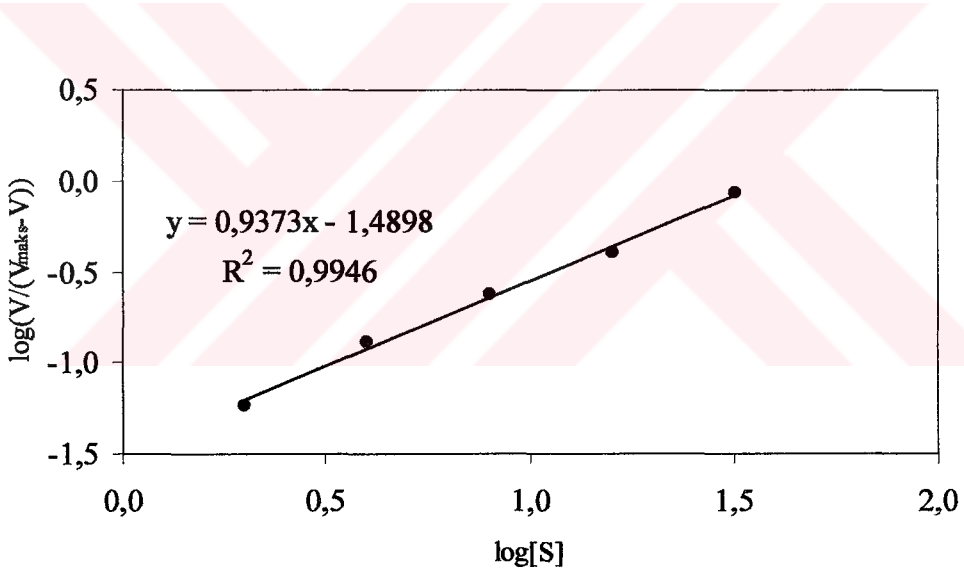


Şekil 75. K4 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği

A5 suşundan elde edilen katalazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V<sub>maks</sub> değeri 10492,1±309 U/mg protein ve K<sub>m</sub> değeri 33,8±1,4 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 76). A5 katalazı için Hill grafiğinden elde edilen *h* değerinin 1'e yakın çıkmasıyla birden fazla bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığı görülmüştür (Şekil 77).

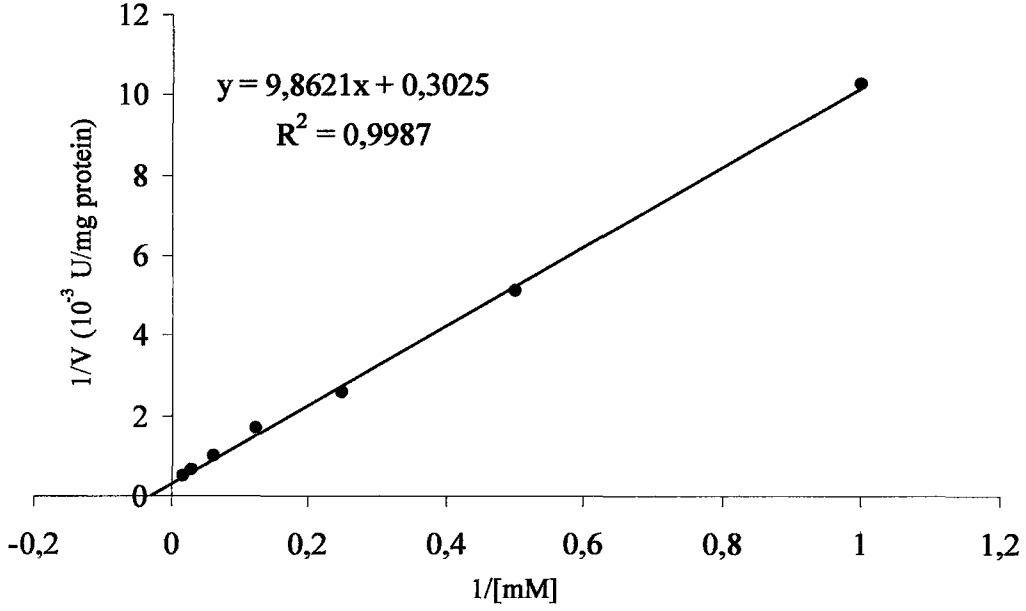


Şekil 76. A5 katalazının  $H_2O_2$  varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

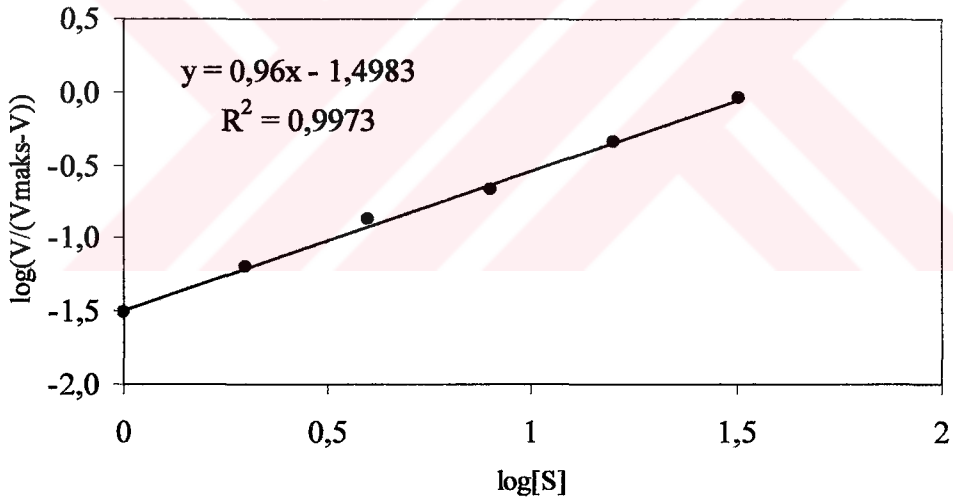


Şekil 77. A5 katalazının  $H_2O_2$  varlığında elde edilen Hill grafiği

A6 suşundan elde edilen katalazın  $H_2O_2$  substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $3306,0 \pm 74$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $32,5 \pm 1,5$  mM olarak tespit edilmiştir (Şekil 78). Ayrıca A6 katalazının Hill grafiğinden elde edilen  $h$  değerinin 1'e yakın çıkması birden fazla substratının bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığı göstermektedir (Şekil 79).

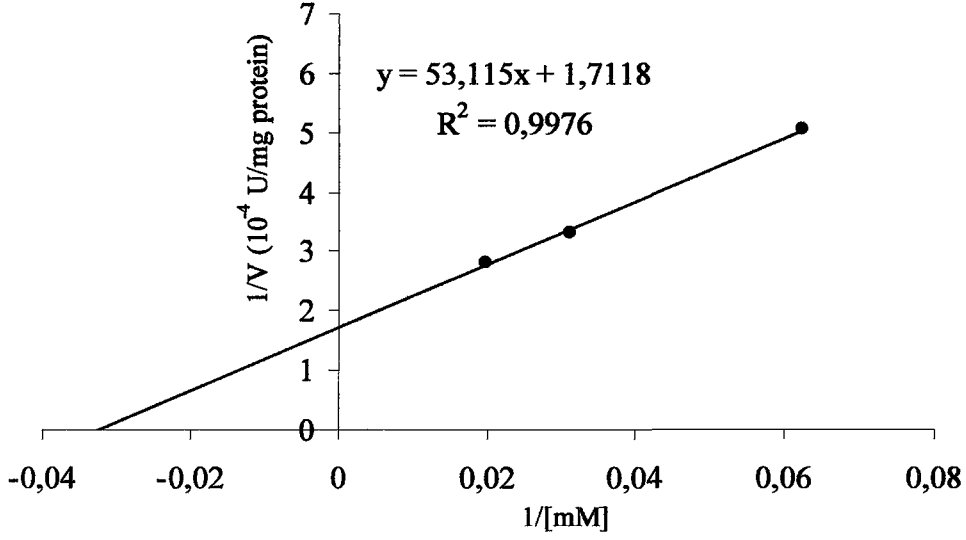


Şekil 78. A6 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

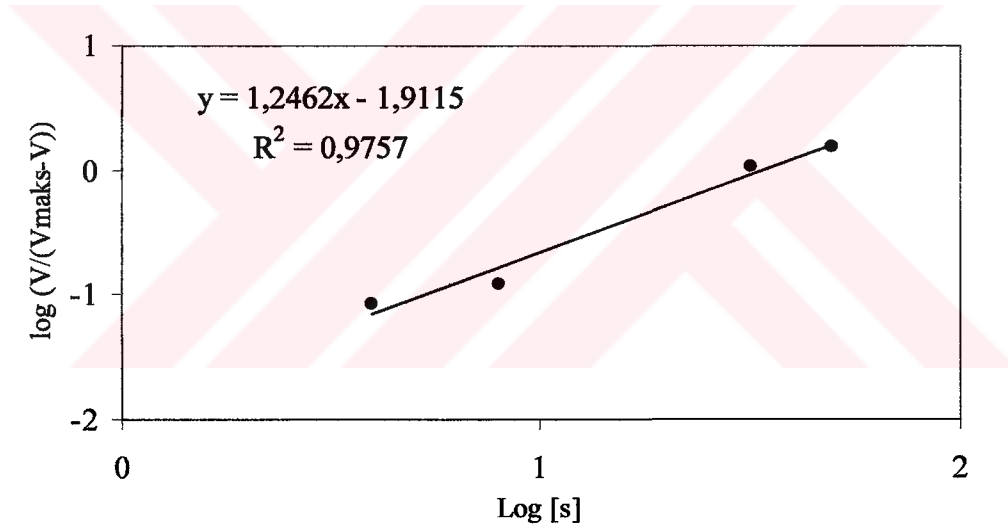


Şekil 79. A6 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği

En son olarak, A2 suşundan elde edilen katalazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $5841,8 \pm 202$  U/mg protein ve  $K_m$  değeri  $31,2 \pm 1,6$  mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 80). Ayrıca A2 katalazının da Hill grafiğinden elde edilen Hill sabitinin ( $h$ ) değerinin 1'e yakın çıkması birden fazla substratının bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Şekil 81).



Şekil 80. A2 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 81. A2 katalazının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında elde edilen Hill grafiği

### 3.9. Bazı İyon ve Deterjanların Termofilik Katalazların Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bazı katyonların termofilik katalazların aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için, 0,1–10 mM arasındaki konsantrasyonlarda metallerin klor tuzları kullanılmıştır (Tablo 20). A3 katalazını 0,5 mM Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> ve Co<sup>+2</sup> katyonlarının aktive ettiği, 0,5 mM Al<sup>+3</sup> katyonun aktivitesini değiştirmediği, diğer katyonların ise inhibe ettikleri

belirlenmiştir. Ay9 ve TK4 katalazlarının kullanılan tüm katyonlarla inhibe olduğu gözlenmiştir. 0,5 mM  $Hg^{+2}$  katyonu varlığında çalışmada kullanılan tüm katalazların aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. A9 suşundan elde edilen katalazın 10 mM  $NH_4^+$  katyonu varlığında aktive olduğu, 0,5 mM  $Ca^{2+}$  ve  $Cr^{3+}$  katyonları varlığında aktivitesini koruduğu, diğer katyonlar varlığında inhibe olduğu tespit edilmiştir. A4 katalazının, 10 mM  $NH_4^+$ , 0,5 mM  $Mn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  ve 0,5-10 mM  $Cr^{3+}$  iyonlarının varlığında aktivitesinin arttığı, 10 mM NaCl tuzu konsantrasyonunda ilk aktiviteyi gösterdiği gözlenmiştir. K1 katalazının  $NH_4^+$  ile  $Cr^{3+}$  katyonlarıyla aktive olduğu, 0,5 mM  $Ca^{2+}$  katyonu varlığında aktivitesini koruduğu, diğer katyonlar varlığında inhibe olduğu belirlenmiştir. K4 katalazının 0,5 mM  $Ni^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ile  $Cr^{3+}$  ve 0.1 mM  $Fe^{3+}$  katyonları varlığında aktivitesinin arttığı, 0,5 mM  $Al^{3+}$  varlığında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. A5 katalazının, 10 mM  $NH_4^+$ , 0.5 mM  $Ca^{2+}$  ve 0,1 mM  $Fe^{3+}$  katyonları aktivitesini artırırken,  $Mn^{2+}$  katyonunun aktivitesini değiştirmedeği fakat diğer katyonların aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. A6 katalazının  $Mn^{2+}$  katyonu varlığında aktivitesinin arttığı, diğer katyonlar varlığında ise aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. A2 katalazının ise, 0,5 mM  $Ca^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  katyonları varlığında aktive olduğu, 10 mM NaCl ile 0,5 mM  $AlCl_3$  tuzlarının varlığında aktivitesini muhafaza ettiği, diğer katyonların varlığında inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Bazı anyonların termofilik katalazların aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için, 0,1–10 mM arasındaki konsantrasyonlarda sodyum tuzları kullanılmıştır (Tablo 21).  $CO_3^{-2}$  anyonunun A3, TK4, K4, A6 ve A2 katalazlarının aktivitesini arttırdığı, diğer suşların katalazlarını inhibe ettiği gözlenmiştir.  $HCO_3^-$  anyonunun A3, A9, K1, A4 ve A5 katalazlarını aktive ederken, Ay9 katalazının aktivitesini koruduğu, diğer katalazların ise aktivitesinin büyük oranda azalttığı tespit edilmiştir. Sodyum asetatın (NaAce) A9 ve K1 katalazlarının,  $SO_4^{2-}$  anyonunun ise A9, K1, A4, K4, A5 katalazlarının aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir.  $C_2O_4^{-2}$  anyonunun TK4, K1 ve A4 katalazlarının aktivitesini değiştirmezken, A9 ile K4 katalazlarının aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Termofilik katalazların, bu anyonların haricinde  $Na_2SO_3$ ,  $Na_2S_2O_3$ ,  $Na_2S_2O_5$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $NaNO_2$ , NaDT (sodyum ditiyonit),  $NaN_3$  tuzu anyonlarının varlığında inhibe oldukları tespit edilmiştir. Özellikle hem grubu içeren enzimlerin bir inhibitörü olan 0,5 mM  $NaN_3$  ve KCN varlığında, tüm katalazların aktivitelerini tamamen kaybettikleri gözlenmiştir.

Tablo 20. Termofilik katalazların aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisi

(mM)	Katyon	A3	Ay9	TK4	A9	K1	A4	K4	A5	A6	A2
% Bağıl Aktivite*											
10,0	NH <sub>4</sub> Cl	85,6	93,3	88,7	113,3	105,9	118,9	73,3	107,3	68,2	73,7
10,0	NaCl	70,2	91,9	67,9	98,3	17,6	100,0	83,3	103,7	40,9	100,0
0,5	MnCl <sub>2</sub>	144,4	66,7	89,6	96,7	11,8	118,9	80,0	100,0	109,1	78,9
0,5	CuCl <sub>2</sub>	20,5	19,3	36,8	8,3	17,6	24,3	60,0	28,0	9,1	42,1
0,5	ZnCl <sub>2</sub>	149,0	28,1	69,8	10,0	11,8	2,7	33,3	36,6	31,8	52,6
0,5	NiCl <sub>2</sub>	47,7	77,0	68,9	76,7	50,0	81,1	113,3	85,4	86,4	68,4
0,5	CdCl <sub>2</sub>	137,7	63,7	37,7	56,7	8,8	2,7	13,3	36,5	9,1	98,2
0,5	CoCl <sub>2</sub>	105,3	22,2	76,4	38,3	52,9	18,9	83,3	82,9	9,3	115,6
0,5	CaCl <sub>2</sub>	99,3	88,2	94,7	100,0	100,0	94,6	106,7	104,9	81,8	104,8
3,0	CaCl <sub>2</sub>	33,4	19,3	26,8	21,7	31,6	27,0	3,3	25,4	14,7	79,3
0,5	AlCl <sub>3</sub>	100,0	84,4	79,8	86,7	5,9	129,7	100,0	96,3	72,7	100,0
10,0	AlCl <sub>3</sub>	21,2	11,9	2,2	13,3	5,1	2,7	26,7	22,0	4,5	9,6
0,5	CrCl <sub>3</sub>	98,9	47,4	75,5	100,0	223,7	202,7	166,7	93,9	81,8	78,9
10,0	CrCl <sub>3</sub>	50,3	1,3	2,2	50,0	2,6	145,9	6,7	1,2	13,6	1,8
0,1	FeCl <sub>3</sub>	35,8	81,5	80,3	90,0	92,1	95,2	110,0	108,5	69,2	84,1

\* Katyon ihtiva etmeyen reaksiyon karışımındaki katalaz aktivitesi %100 olacak şekil hesaplanmıştır.

Tablo 21. Termofilik katalazların aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisi

(mM)	Anyon	A3	Ay9	TK4	A9	K1	A4	K4	A5	A6	A2
% Bağıl Aktivite*											
10,0	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	106,6	13,8	115,2	19,6	27,8	18,9	158,1	16,1	107,0	125,6
10,0	NaHCO <sub>3</sub>	104,0	100,0	21,2	107,1	108,3	105,4	3,2	104,6	19,4	3,4
10,0	NaAce	21,2	95,4	51,5	101,8	105,6	97,3	64,5	97,7	88,2	1,8
10,0	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	4,0	63,1	19,7	73,2	55,6	32,4	22,6	1,1	21,2	20,5
10,0	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	41,7	96,9	94,6	112,5	116,7	129,7	109,7	105,7	98,1	92,3
0,5	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	24,5	86,2	87,5	96,4	94,4	97,3	80,6	87,4	80,2	59,0
0,5	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	89,2	97,9	92,2	99,1	33,3	81,1	87,1	79,3	86,9	25,6
0,5	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	27,2	89,2	100,0	107,2	100,0	100,0	112,9	95,4	98,8	74,4
0,5	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	31,1	84,6	87,5	89,3	80,6	81,1	41,9	35,6	49,4	51,3
10,0	NaNO <sub>3</sub>	30,2	69,2	57,1	89,3	88,9	89,2	58,1	97,7	58,5	30,8
0,5	NaNO <sub>2</sub>	49,6	68,9	32,1	85,7	75,0	78,4	64,5	65,5	60,0	23,1
0,5	NaDT	88,9	86,2	52,9	85,7	91,7	86,5	6,5	86,2	82,3	12,8

\* Anyon ihtiva etmeyen reaksiyon karışımındaki katalaz aktivitesi %100 olacak şekil hesaplanmıştır.



0,5 mM Merkaptoetanol (MKE) varlığında K4 katalazı ilk aktivitesini %10, TK4 katalazı %13,1 ve A2 katalazı %3.5 oranlarında kaybederken, diğer suşların katalazlarının ise ilk aktivitelerini büyük oranda kaybettikleri tespit edilmiştir. A9, A4 ve A2 katalazlarının 0,5 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) varlığında aktive oldukları, K1 katalazının aktivitesini koruduğu, diğer katalazların inhibe oldukları belirlenmiştir. Ayrıca bir katalaz inhibitörü olan 3- amino-1,2,4 triazol (3-ATA) ile enzimin 1 saat inkübasyonundan sonra, tüm katalazların inhibe oldukları tespit edilmiştir (Tablo 22).

0.5 mM sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanı varlığında tüm suşlardan elde edilen katalazların büyük oranda aktive oldukları gözlenmiştir. %0,1 TX-100 deterjanı varlığında ise Ay9, TK4, K1, A6 ve A2 katalazlarının aktivitelerinin azaldığı, diğer suş katalazlarının aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Termofilik katalazların aktivitesi üzerine bazı iyon ve deterjanların etkisi

(mM)	Bileşik	A3	Ay9	TK4	A9	K1	A4	K4	A5	A6	A2
		% Bağlı Aktivite*									
0,5	MKE	46,0	34,1	86,9	31,7	28,9	27,0	90,0	31,7	27,3	96,5
0,5	EDTA	41,7	90,4	85,3	105,0	100,0	113,5	93,3	102,4	45,5	107,0
50	3-ATA	80,5	80,3	95,7	87,8	85,7	82,5	90,8	88,9	82,9	90,6
100	3-ATA	65,8	71,2	93,2	71,4	71,1	70,0	25,4	77,8	74,0	88,1
0,5	SDS	110,9	106,7	127,9	121,7	105,3	119,0	120,0	159,8	200,0	122,0
% 0,1	TX-100	103,5	96,3	93,4	135,0	84,2	114,3	123,3	118,3	92,3	97,4

\* Bileşik ihtiva etmeyen reaksiyon karışımındaki katalaz aktivitesi %100 olacak şekil hesaplanmıştır.

#### 4. TARTIŞMA

Günümüzde birçok endüstri alanında, klasik kimyasal yöntemlerin yerini, enzimlerin kullanıldığı biyolojik sistemler almaktadır. Biyoteknolojinin de katkısıyla bu işlemler hem daha ılıman şartlarda gerçekleştirilmekte, hem de oluşan yan ürünlerin çevreye verdikleri zararlar en aza indirgenmektedir. Bir endüstriyel enzim olan katalaz da gıda, süt, tekstil, medikal, kağıt gibi ağartma ve sterilizasyon işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında, hidrojen peroksidin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Dhaese, 1996). Ayrıca bilinen termofilik türler arasında yer alan termofilik *Bacillus sp.* ve *Clostridium sp* türleri, spor oluşturabilmeleri, yüksek sıcaklıkta yaşayabilmeleri ve ısıya dayanıklı enzimler üretmelerinden dolayı ilgi çekmektedirler (Sonnleither, 1983; Sharp vd., 1991; Cangenella ve Wiegel, 1993). Bu çalışmada kullanılan katalazların termofilik *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilmiş olması, bunların termofilik davranabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışma, kullanılan 18 bakteri suşunun yeni izole edilmiş ve bu suşlarda katalazın çalışılmamış olması, bu termofilik bakterilerin alternatif katalaz kaynağı olup olmayacağı hususunda önem arz etmektedir.

Mevcut çalışmada kullanılan tüm termofilik suşların katalaz aktivitesine sahip oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, aynı suşların katalaz üretebilme yeteneğinde oldukları rapor edilmiştir (Dülger, 1997; Çanakçı, 2003).

20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ve pH 7,0'de yapılan aktivite çalışmasında tüm katalazların oldukça yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Tablo 8). Çalışmada kullanılan katalazlar, en düşük (A2 katalazı) 857,7 U/mg protein ve en yüksek (A3 katalazı) 64610,5 U/mg protein aktivite göstermişlerdir. Bir sülfat indirgeyici bakteri olan *Desulfovibrio gigas*'dan saflaştırılan katalazın ham özütünde 52,6 U/mg protein, saflaştırma işlemlerinden sonra ise 4200 U/mg protein aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Dos Santos vd., 2000). Thompson ve arkadaşları (2003) *Thermus brockianus*'dan izole ettikleri katalazın ham özütteki özgül aktivitesinin 82 U/mg protein, saflaştırıldıktan sonraki aktivitesinin 5320 U/mg protein olduğunu belirtilmektedir. *Trigonopsis variabilis*'ten elde edilen katalazın ham özütünde 188 U/mg protein, saflaştırma işlemlerinden sonra ise 55000 U/mg protein aktiviteye sahip olduğu ifade edilmektedir (Monti vd., 2003). Saflaştırılmış *H.halobium* katalaz-peroksidazının katalaz aktivitesinin 43,2 U/mg protein olduğu belirtilmektedir. Ayrıca Paar ve arkadaşları (2001) tekstil atık sularından izole

ettikleri üç izolatin katalazlarından olan *B.pallidus* katalazının 8300 U/mg protein, *Bacillus* sp. LF katalazının 63000 U/mg protein, *Bacillus* sp. SF katalazının 107,900 U/mg protein aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Tüm suşlardan elde edilen katalazların, pH 7,0'da en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca A3 ve TK4 katalazlarının pH 6,0-10,0 arasında da yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Diğer taraftan A3, K1 ve A5 katalazlarının 40 °C'de, Ay9 katalazının 20-60 °C arasında, TK4 katalazının 30 °C'de, A9, A6 ve K4 katalazlarının 50 °C'de, A4 katalazının 30-60 °C arasında, A2 katalazının ise 60°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdikleri tespit edilmiştir. Konuyla ilgili birçok literatürde de katalazların optimum pH değerlerinin 7,0 olduğu ve 4,0-10,0 geniş bir pH aralığında da aktivite gösterdikleri ifade edilmektedir (Brown-Peterson ve Salin, 1993; Brown-Peterson ve Salin, 1995; Terzenbach ve Blaut, 1998; Wang vd., 1998; Zou ve Schrempf, 2000; Akgöl vd., 2001; Hidalgo vd., 2004). Ayrıca, *Thermoascus aurantiacus*'un UV radyasyonundaki mutantından (M-3) elde edilen termofilik katalazın 70 °C'de en yüksek aktivite gösterdiği (Wang vd., 1998) ve halofilik bir bakteri olan *Halobacterium halobium*'den elde edilen mezofilik katalazın en yüksek aktiviteyi 40 °C'de gösterdiği (Brown-Peterson ve Salin, 1995) belirtilmiştir. Brown-Peterson ve Salin (1993) yaptıkları çalışmalarında *Halobacterium halobium*'den izole ettikleri peroksidaz-katalaz enziminin katalaz aktivitesinin 50 °C'de aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca USA Yellowstone Ulusal Parkı'ndaki bir kaplıcadan izole edilen *Thermus brokianus* kültüründen saflaştırılan katalazın 85 °C'de en yüksek aktivitesini gösterdiği ifade edilmiştir (Thompson vd., 2003). A2, A9, A6 ve K4 katalazlarının literatür bilgileri ile kıyaslandığında mezofilik katalazlara göre daha yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebildikleri, fakat termofilik katalazlara göre de daha düşük sıcaklıklarda aktivite gösterebildikleri tespit edilmiştir.

Termofilik suşlardan elde edilen katalazların yapılan pH ve ısı kararlılıkları çalışması sonucunda; A3 katalazının pH 6-9 ile 20-30 °C arasında; Ay9 katalazının pH 5-8 ile 20-50 °C arasında; TK4 katalazının pH 6-9 ile 20-50 °C arasında; A9 katalazının pH 6-8 ile 20-40 °C arasında; K1 katalazının pH 7'de ve 20-50 °C arasında; A4 katalazının pH 7'de ve 20-40 °C arasında; K4 katalazının pH 7-8 ile 20-40 °C arasında; A5 katalazının pH 6-10 ile 20-50 °C arasında; A6 katalazının pH 6-9 ile 20-40 °C arasında; A2 katalazının pH 8 ve 20-60 °C arasında kararlı oldukları belirlenmiştir. Bu veriler incelendiğinde K1, A4 ve A2 hariç, diğer katalazların hepsinin geniş bir pH aralığında aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. *Thermoascus aurantiacus* kültüründen elde edilen termofilik katalazın 30 °C'de

60 dakika bekletilmesinden sonra pH 4,5-13,0 arasında kararlı olduğu ve 60 dakika bekleme süresi boyunca 85 °C'ye kadar aktivitesini koruduğu görülmüştür (Wang vd., 1998). *Aspergillus niger*'den izole edilen katalazın pH 4,5-11,0 arasında kararlı olduğu ve 65 °C'de 60 dakika boyunca aktivitesini koruduğu rapor edilmiştir (Kikuchii vd., 1982). Bir başka çalışmada ise *Bacillus pallidus*, *Bacillus* sp. LF, *Bacillus* sp. SF kültürlerinden izole edilen termoalkalofilik katalazların pH 7.0'de 50 °C'de sırasıyla 3, 5 ve 15 saat sonra, 60 °C'de ise 3, 1, 22 saat sonra % 50 oranında aktivitelerini kaybettikleri ifade edilmektedir (Paar vd., 2001). Bir nevi termofilik özelliği ortaya koyan ısı kararlılığı bakıldığında, A2 katalazının aktivitesinin daha düşük olmasına rağmen, çalışmada kullanılan diğer katalazlara göre daha çok termofilik davrandığı görülmektedir. Ay9, K1, TK4, A5 katalazları da 50 °C'ye kadar aktivitelerini büyük bir oranda koruduklarından dolayı, termofilik katalazlar arasında yer alabilirler.

Ayrıca bu termofilik bakterilerden elde edilen katalazların, 20-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 60 dakika bekleme süreleri sonunda elde edilen aktivitelerden hesaplanan termodinamik veriler de termal kararlılık verilerini destekledikleri görülmüştür.  $\Delta G^\ddagger$  ve  $\Delta S^\ddagger$  değerlerindeki ani artış,  $\Delta H^\ddagger$  değerindeki ani azalışın görüldüğü sıcaklıklarda enzim yapısının bozulduğu ve kararsız bir hale geçtiğini göstermektedir.

En yüksek katalaz aktivitesi gösteren 10 suшта yapılan kinetik çalışmalarda, değişik substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen hızlarının çizilen  $1/S-1/V$  grafiğinden  $V_{maks}$ ,  $K_m$  değerleri ve birbirlerine oranlanarak  $V_{maks}/K_m$  değerleri hesaplanmıştır (Tablo 18). Özgüllük (spesifite) oranları olarak tanımlanan bu değerler, bir substratın hangi enzime ya da enzimin hangi substrata ne kadar ilgi duyduğunu ifade eder.  $V_{maks}$  değerleri yalnızca katalaz enzimi konsantrasyonuna bağlıdır ve böyle bir hız eşitliği katalitik hız sabiti ya da dönüşüm sayısı olarak da tanımlanan bir sabiti ( $k_{kat}$ )'de içerir. Toplam enzim konsantrasyonunun bilinmediği durumlarda, spesifite sabitinin bulunmasında  $V_{maks}$  değerlerinin kullanılması uygundur. Dolayısıyla  $V_{maks}/K_m$  oranları böyle durumlarda spesifite oranı olarak ifade edilir. Bu oranlar, çalışmada kullanılan tüm suşların katalazları için değerlendirilecek olursa,  $H_2O_2$  substratı yapılan deney şartlarında en fazla ilgiliyi A3 katalazına duyduğu ve bu ilginin sırasıyla A3>TK4>A9>Ay9>A5>A4>K4>A2>K1>A6 şeklinde olduğu söylenebilir.

Sığır ciğerinden elde edilen saf katalazla yapılan immobilizasyon çalışmasında, serbest enzim için  $V_{maks}$  değeri 236000 U/mg protein,  $K_m$  değeri 16,5 mM olarak ve immobilize edilmiş enzim için  $V_{maks}$  değeri 118000 U/mg protein ve  $K_m$  25,8 mM olarak

bulunmuştur (Akgöl vd., 2001). Bir fototrofik bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1'den saflaştırılan katalazın  $K_m$  değerinin 40 mM ve  $V_{maks}$  değerinin 285000 U/mg protein olduğu hesaplanmıştır (Terzenbach ve Blaut, 1998). *Thermus brockianus*'dan saflaştırılan katalazın  $H_2O_2$  substratı varlığında  $V_{maks}$  değerinin 20,3 U/mg protein olduğu ve  $K_m$  değerinin 35,5 mM olduğu belirtilmiştir (Thompson vd., 2003). *Thermoascus aurantiacus*'dan izole edilen termal-kararlı katalazın 48 mM  $K_m$  değerine ve  $1.07 \times 10^5 s^{-1}$   $k_{kat}$  değerine sahip olduğu belirtilmektedir (Wang vd., 1998). Bir mutant olan *Mycobacterium sp.* JCI DSM 3803'den saflaştırılan katalaz-perokidazın katalaz aktivitesi için yapılan kinetik çalışma sonucunda  $V_{maks}$  değerinin 15,9  $\mu\text{mol/dak/mg}$  protein ve  $K_m$  değeri 1,47 mM olarak bulunduğu belirtilmektedir (Ro vd., 2003). Ayrıca katalazın  $H_2O_2$  substratına ilgisini gösteren  $K_m$  değeri Çetin (2000) tarafından tavuk karaciğeri katalazı için 100 mM, Chatterge ve arkadaşları (1989) tarafından keçi karaciğeri katalazı için 110 mM olarak rapor edilmiştir. Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden saflaştırılan katalaz için  $K_m$  değerinin 62.5 mM olarak bulunduğu belirtilmiştir (Dinçer, 2000).

Çalışmada kullanılan katalazların saflaştırılmış olmamalarına rağmen  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin literatürlerdeki  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerine yakın çıktıkları görülmektedir. Özellikle A3 suşu,  $k_{kat}$  değerine bakıldığında oldukça yüksek potansiyel katalaz kaynağı olarak önem arz etmektedir. Ayrıca diğer suşlardan elde edilen katalazların  $K_m$  değerlerinin (Tablo 18), literatürlerde yer alan birçok katalazdan daha düşük bir  $K_m$  değerine sahip olduğu ve  $H_2O_2$  substratına daha çok ilgi duydukları görülmektedir.

Hill grafiklerinden elde eğim ( $h$ ) ile enzimlerin üzerindeki substrat-bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativitenin olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Hill sabitinin  $h=1$  olması durumunda enzimin birden fazla bağlanma bölgesi olduğunu, fakat bu birimler arasında kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Stenesh, 1984; Noble ve Oberdick, 1988). Çalışmada kullanılan tüm katalazlar için  $H_2O_2$  substratı varlığında elde edilen kinetik veriler ile çizilen Hill grafiklerinde eğimin 1'e yakın çıktığı ve bu enzimler üzerinde birden fazla substrat bağlanma bölgesinin olduğunu ve bu altbirimler arasında kooperativitenin olmadığı tespit edilmiştir.

Termofilik suşlardan elde edilen özütlerde yapılan doğal elektroforez sonucunda tüm suşlarda katalaz aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yine doğal elektroforez sonucunda, suşların içerdikleri katalazların ve muhtemel izoenzimlerinin yaklaşık molekül ağırlıklarının 202-640 kDa arasında olduğu hesaplanmıştır (Tablo 19). *Trigonopsis variabilis*'ten saflaştırılan katalazın yaklaşık 230 kDa (Monti vd., 2003),

*Thermoascus aurantiacus*'dan izole edilen katalazın yaklaşık 75 kDa altbirimlere sahip yaklaşık 330 kDa (Wang vd., 1998), *Halobacterium halobium* katalazının yaklaşık 240 kDa (Brown-Peterson ve Salin, 1995), *Thermus brockianus*'dan saflaştırılan ısı-alkali kararlılığa sahip katalazın 178 kDa (Thompson vd., 2003), *Bacillus sp.* katalazının 282 kDa (Yumoto vd., 1990), *Vibrio rumoiensis* S-1T (Yumoto vd. 2000) ve *Thermus thermophilus*'dan (Hidalgo vd., 2004) saflaştırılan katalazların yaklaşık 230 kDa molekül ağırlığına sahip oldukları rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan suşlardaki katalazların molekül ağırlıklarının hemen hemen hepsinin literatürlere yakın çıktığı, sadece bazı suşlardaki izoenzimlerin molekül ağırlıklarının beklenenden büyük olduğu görülmüştür.

Çalışmada kullanılan termofilik suşlardan elde edilen katalazların  $\text{NaN}_3$ , KCN,  $\text{HgCl}_2$ , sodyum ditiyonit ve 3-amino-1,2,4-triazol gibi bilinen katalaz inhibitörleri ile inhibe oldukları görülmüştür. TK4 suşundan elde edilen katalazın sodyum ditiyonit ile % 48 oranında inhibe olmasına rağmen 3-ATA ile %7 oranında inhibe olması ve dar bir pH aralığında aktivite göstermesi, TK4 suşundaki aktivitenin katalaz-peroksidaz aktivitesinden kaynaklanabileceği ihtimalini artırmaktadır. Katalazların ditiyonite karşı dirençli oldukları, 3-amino-1,2,4-triazolle inhibe oldukları bilinmektedir (Terzenbach ve Blaut, 1998; Thompson vd., 2003). Tüm suşlardaki katalaz aktivitesinin  $\text{NaN}_3$ , KCN ile inhibe olması, bu suşlardaki katalazların hem grubu içeren enzimler olduklarını ve bunların diğer hemokatalazlar ile uyum içinde olduklarını göstermektedir (Wang vd., 1998). *Thermoascus aurantiacus*'dan izole edilen katalazın 0,1 mM siyanür ve azid ile yaklaşık %90 oranında, 1 mM  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Hg}^{+2}$  metallerinin varlığında ise yalnızca  $\text{Hg}^{+2}$  ile %70 oranında inhibe olduğu belirtilmektedir (Wang vd., 1998). *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1'den saflaştırılan katalazın inhibisyon çalışması sonucunda  $\text{CN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ , 2-merkaptetanol ve sodyum ditiyonit ile inhibe olduğunu ve bu verilerin bu katalazın tek işlevli katalaz olduğunu kanıtladığı belirtilmektedir (Terzenbach ve Blaut, 1998).

Ayrıca en yüksek aktiviteyi gösteren 10 suştan elde edilen katalazların hepsinin 408-417 nm arasında Soret piki vermeleri, bu katalazların hem grubu içerdiklerini kanıtlamaktadır. Ayrıca bu katalazların indirgenmesiyle Soret piklerinin görünür bölgeye doğru kaydıkları ve 520 ile 550 nm civarında pik verdikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, KCN ile  $\alpha$  ve  $\beta$  bantlarına ait piklerin genişlediği görülmüştür. *Halobacterium halobium*'dan saflaştırılan katalazın 406 nm'de Soret piki verdiği ve KCN ile elde edilen piklerin genişleyip 12 nm kadar kırmızı bölgeye kaydığı ifade edilmektedir (Brown-Peterson ve Salin, 1995). Yumoto ve arkadaşlarının (2000) yapmış oldukları bir

karşılaştırmada ökaryotik katalazların Soret pikini 405 nm'de, *V.rumoiensis* S-1<sup>T</sup> katalazının 406 nm'de ve *R.capsularas* katalaz-peroksidazının ise 403 nm'de gösterdiklerini belirtmektedir. *Thermus brockianus* katalazının doğal formu 410 nm'de Soret piki ve 534 nm ile bunun iz piki olan 560 nm'de pik verdikleri, ditiyonit ile indirgenmesi sonucu Soret pikinin 419 nm'ye kaydığı ve 534 nm'deki pikin kaybolup 523 nm ile 553 nm'de piklerin çıktığı belirtilmektedir (Thompson vd., 2003). *Desulfovibrio gigas*'dan saflaştırılan katalazın doğal halinin 405 nm Soret piki gösterdiği, alkali-piridin-ditiyonit karışımında indirgenmiş halinin ise 522 ve 565.5 nm'lerde yüksek spinli ferrik pikleriyle 418 nm'de Soret piki gösterdiği ifade edilmektedir (Dos Santos vd., 2000).



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada kullanılan termofilik suşların katalaz üretebildikleri petri testi ve doğal elektroforezle ortaya konmuş ve bu katalazların saflaştırılmamış olmalarına rağmen oldukça yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Özellikle A3 katalazının diğer suşlardan elde edilen katalazlara ve literatürlerde yer alan katalazlara göre oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tüm suşlardan elde edilen katalazların pH 7,0'da en yüksek aktivite gösterdikleri ve A3 ile Ay9 katalazlarının geniş bir pH aralığında aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. A3, Ay9, TK4, A9, A5 ve A6 katalazlarının geniş bir pH aralığında kararlı oldukları görülmüştür.

En yüksek aktiviteyi gösterdikleri sıcaklık ve ısı kararlılıklarına bakıldığında, aktivitesi düşük olmasına rağmen A2 katalazının hem daha termofilik, hem de daha alkalofilik olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında Ay9, TK4, K1 ve A5 katalazlarının da 50 °C'ye kadar aktivitelerini büyük oranda korudukları belirlenmiştir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratının en fazla ilgiliyi A3 katalazına duyduğu ve bu ilginin sırasıyla A3>TK4>A9>Ay9>A5>A4>K4>A2>K1>A6 şeklinde olduğu görülmüştür.

En yüksek aktiviteyi gösteren 10 suştan elde edilen katalazların 0,5 mM NaN<sub>3</sub>, KCN ve HgCl<sub>2</sub> varlığında aktivitelerini tamamen kaybettikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, tüm katalazların 100 mM 3-amino-1,2,4-triazol ile inhibe oldukları belirlenmiştir. Yalnızca TK4 katalazının 3-ATA ile çok düşük oranda ve ditiyonitle oldukça yüksek bir oranda inhibe olması, bu suştaki aktivitenin katalaz-peroksidazdan kaynaklanabiliyor olabileceği ihtimalini ortaya koyduğu tespit edilmiştir. 0,5 mM SDS'li ortamda tüm katalazların aktivitesinin arttığı görülmüştür. %0,1 TX-100'lü ortamda ise A3, A4, K4, A5 katalazlarının aktivitesi artarken, diğer katalazların aktivitesinin küçük oranlarda azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca birçok iyon varlığında bazı katalazların oldukça dirençli oldukları görülmüştür.

En yüksek aktiviteyi gösteren 10 suştan elde edilen katalazların hepsinin 408-417 nm arasında Soret piki verdikleri ve ayrıca bu katalazların indirgenmesiyle 520 ile 550 nm'de pik verdikleri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; çalışmada kullanılan termofilik kültürlerin birer potansiyel katalaz kaynağı oldukları, bu suşlardan elde edilen katalazların gerek pH-ısı kararlılıkları, gerek



bazı iyon ve deterjanlar varlığında kararlı kalmaları bakımından, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in kullanıldığı tüm endüstri alanlarında rahatlıkla kullanma imkanı bulabilecekleri söylenebilir. Özellikle, A2 katalazının yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlık göstermesinden dolayı, ağartma işlemlerinin yüksek sıcaklık (> 60 °C) ve alkali ortamlarda gerçekleştiği tekstil gibi endüstri alanlarında kullanılması önerilebilir.



## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, bazı termofilik bakterilerin endüstriyel bir enzim olan katalazı üretebilme kapasitesi belirlenmiş ve bu katalazların bazı kinetik verileri ortaya konmuştur. Bu veriler, bu termofilik kültürlerdeki katalaz veya izoenzimlerinin genel davranışlarını göstermektedir. Bu katalazların 3-boyutlu yapıları hakkındaki detaylı bilgilere ancak saf enzimlerle çalışıldığı takdirde ulaşılabilecektir. Bununla birlikte, endüstri alanlarında daha çok saf enzim veya immobilize edilmiş enzimler uygulama imkanı bulabilmektedir. Enzimlerin saflaştırılması pahalı ve zahmetli bir yöntem olmasından dolayı alternatif kaynakların bulunması oldukça önem arz etmektedir. Bu suşların oldukça yüksek aktiviteye sahip katalaz üretebilmeleri bunların önemli bir katalaz kaynağı olarak görev yapabileceklerini göstermektedir.

İleriki çalışmalarda, bu veriler ışığında, elde edilen bu katalazlar için uygun saflaştırma ve immobilizasyon tekniklerinin belirlenmesi faydalı olacaktır. Bu saflaştırma işlemlerinden sonra bulunacak kinetik veriler, bu katalazlar hakkında daha detaylı bilginin elde edilmesini sağlayacaktır. Ayrıca bu katalazların saflaştırılmasıyla, muhtemel olarak belirlenen enzim ve izoenzim molekül ağırlıkları daha detaylı olarak incelenebilecektir. Bununla birlikte, saf katalazlar ile elde edilecek spektroskopik veriler, aktif bölge hakkında daha çok bilgi verecektir.

İleride yapılacak böyle bir çalışmada, bu suşlardaki katalaz aktivitesi yanında peroksidaz aktivitesinin incelenmesi de, bu suşların içermiş olduğu katalazların sınıfının belirlenmesi açısından faydalı olacaktır. Ayrıca bu kültürlerdeki (özellikle A3 suşu) katalaz genlerinin belirlenip bir vektöre aktarılması sayesinde katalaz üretiminin artırılması sağlanabilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

- Aebi, H. E., 1983. Catalase, in: Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie GmbH (VCH), Methods of Enzymatic Analysis, Third Edition, Vol. III, 273-286.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*, Method Enzymol., 105, 121-126.
- Afsar, H., Demirata, B., 1993. Indirect Spectrophotometric Determination of Hydrogen-Peroxide, Fresenius J. Anal. Chem., 347, 460-462.
- Aguilar, A., 1996. Extremophile Research in the European Inion: from Fundamental Aspects to Industrial Expectation, FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92.
- Ahmad, I., 2001. Catalase, Free Radicals in Biology and Medicine, Iowa University, Iowa, Spring Term, 1-10.
- Akertek, E., Tarhan, L., 1995. Characterization of Immobilized Catalases and Their Application in Pasteurization of Milk With H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Appl. Biochem. Biotechnol., 50, 291-303.
- Akgöl, S., Dinçkaya, E., 1999. A Novel Biosensor for Specific Determination of Hydrogen Peroxide: Catalase Enzyme Electrode Based on Dissolved Oxygen Probe, Talanta, 48, 363-367.
- Akgöl, S., Kaçar, Y., Özkara, S., Yavuz, H., Denizli, A., Arica, M. Y., 2001. Immobilization of Catalase Via Adsorption onto L-histidine Grafted Functional pHEMA Based Membran, J. Mol. Catal. B: Enzym., 15, 197-206.
- Allgood, G. S. ve Perry, J. J., 1986. Characterization of a Manganese-containing Catalase from the Obligate Thermophile *Thermoleophilum album*, J. Bacteriol., 168, 563-567.
- Amara, P., Andreoletti, P., Jouve, H. M. ve Field, M. J., 2001. Ligand Diffusion in the Catalase from *Proteus mirabilis*: a Molecular Dynamics Study, Protein Sci., 10, 1927-1935.
- Amelunxen, R. E., Lins, M., 1968. Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125, 765-771.
- Anonim, 1986. Maden Suyu Analiz Raporu, T.C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Çevre Sağlığı Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim, 1994. Maden Suyu Analiz Raporu, T.C. İstanbul Üniversitesi Tıbbi Ekoloji ve Hidro-Klimatoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul.
- Antonyuk, S. V., Melik-Adamyan, V. R., Popov, A. N., Lamzin, V. S., Hampstead, P. D., Harrison, P. M., vd., 2000. Crystal Structure of Manganese Catalase from *Lactobacillus plantarum*, Structure, 9, 725-738.
- Baker, R. D., Cook, C. O. ve Goodwin, D. C., 2004. Properties of Catalase-Peroxidase Lacking Its C-terminal Domain, Biochem. Biophys. Res. Commun., 320, 833-839.

- Baldwin, J. L., 1997. A Catalase Journey, Doktora Tezi, New Mexico Üniversitesi, New Mexico.
- Bartos, M., Falkinham, J. O., Pavlik, I., 2004. Mycobacterial Catalases, Peroxidases, and Superoxide Dismutases and Their Effects on Virulence and Isoniazid-susceptibility in Mycobacteria—a Review, Vet. Med. —Czech, 49, 5, 161-170.
- Barynin, V. V., Whittaker, M. M., Antonyuk, S. V., Lamzin, V. S., Harrison, P. M., Artymiuk, P. J. ve Whittaker, J. W., 2001. Crystal Structure of Manganese Catalase from *Lactobacillus plantarum*, Structure (Camb), 9, 725-738.
- Beaumont, F., Jouvec, H. M., Gagnon, J., Gaillard, J. ve Pelmont, J., 1990. Purification and Properties of Catalase from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*), Plant Sci., 72, 1, 19-26.
- Belal, R., Momenteau, M., Meunier, B., 1989. Why an Oxygen and Not a Nitrogen Atom as Proximal Ligand in Catalase? Hydrogen Peroxide Dismutation catalyzed by Synthetic Iron and Manganese Porphyrins, New J. Chem., 13, 853-862.
- Bergmeyer, J. ve Grabl, M., 1983. Methods of Enzymatic Analysis (Third Edition), Germany, 190-302.
- Berthet, S., Nykyri, L. M., Bravo, J., Mate, M. J., Berthet-Colominas, C. Alzari, P. M., vd., 1997. Crystallization and Preliminary Structural Analysis of Catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Sci., 6, 481-483.
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R. ve Guisan, J. M., 2003. Preparation of a Stable Biocatalyst of Bovine Liver Catalase Using Immobilization and Postimmobilization Techniques, Biotechnol. Prog., 19, 763-767.
- Bonnichsen, R., In Colowick, S. P. ve Kaplan, N. O., 1955. Blood Catalase, Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. II, 781-784.
- Bravo, J., Fita, I., Gouet, P., Jouve, H. M., Melik-Adamyany, W. ve Murshudov, G. N., 1997. Structure of catalases. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (Scandalios, J. G., ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 407-445.
- Brock, T. D., 1985. Life at High Temperatures, Science, 230, 132-138.
- Brock, T. D., 1986. Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T. D. (Ed.), John Wiley and Sons, New York.
- Brown-Peterson, N. J. ve Salin M. L., 1993. Purification of Catalase-Peroxidase from *Halobacterium halobium*: Characterization of Some Unique Properties of the Halophilic Enzyme, J. Bacteriol., 175, 13, 4197-4202.
- Brown-Peterson, N. J. ve Salin M. L., 1995. Purification and Characterization of Mesohalic Catalase from Halophilic Bacterium *Halobacterium halobium*, J. Bacteriol., 177, 2, 378-384.
- Cangenalla, F. ve Wiegel, J., 1993. The Clostridia and Biotechnology, Woods, B.W. (ed.), Butterworth Press, Stoneham, MA.
- Carpena, X., Guarne, A., Ferrer, J. C., Alzari, P. M., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2002. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Hydroperoxidase I C-

- terminal Domain from *Escherichia coli*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 58, 853-855.
- Carpene, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P. C. ve Fita, I., 2003. Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å Resolution, J. Mol. Biol., 327, 475-487.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs, Physiol. Rev., 59, 3, 527-625.
- Chartterge, U., Kumar, A., Sanwal, G., 1989. Purification and Properties of Goat Liver Catalase: Two pH optima, Indian J. Biochem. Biophys., 26, 140-147.
- Chary, P. ve Natvig, D. O., 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development, J. Bacteriol. 171, 2646-2652.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanism, Food Chem. Toxicol., 37, 949-962.
- Chelikani, P. V. G. B. K., 2004. Probing the Structure of *Escherichia coli* Catalase HPII, Doktora Tezi, Manitoba Üniversitesi, Manitoba.
- Chen, L. H., Boissonneault, G. A., Glauert, H. P., 1988. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res., 8, 739-748.
- Claiborne, A., Malinowski, D. P. ve Fridovich, I., 1979. Purification and Characterization of Hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B., J. Biol. Chem., 254, 11664-11668.
- Colacino, F. ve Crichton, R. R., 1997. Enzyme Thermostabilization: The State of the Art, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 14, 211-277.
- Company, R., Serafim, A., Bebianno, M. J., Cosson, R., Shillito, B., Fiala-Médioni, A., 2004. Effect of Cadmium, Copper and Mercury on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in The Gills of The Hydrothermal Vent Mussel *Bathymodiolus azoricus*, Mar. Environ. Res., 58, 377-381.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Paar, A., Gudelj, M., Gübitz, G. M., Cavaco-Paulo, A., 2001. Immobilization of Catalases from *Bacillus* SF on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents, Enzyme Microb. Technol., 28, 815-819.
- Çanakçı (Dülger), S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Çetin, K., 2000. Tavuk Karaciğerinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Çetinus (Akkuş), Ş., 1998. Katalazın Değişik Materyaller Üzerinde Tutuklanma Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Darr, D. ve Fridovich, I., 1986. Irreversible inactivation of Catalase by 3-amino-1,2,4-triazole, Biochem. Pharmacol., 35, 20, 3642.
- Das, R. ve Gerstein, M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genom., 1, 76-88.

- De Vito, J. A., Morris, S., 2003. Exploring the Structure and Function of the Mycobacterial KatG Protein Using *trans*-Dominant Mutants, Antimicrob. Agents Chemother., 47, 1, 188-195.
- Dhaese, P., 1996. Catalase: An enzyme with growing industrial potential, Chim. Oggi., 14, (1-2), 19-21.
- Díaz, A., Horjales, E., Rudiño-Piñera, E., Arreola, R. ve Hansberg, W., 2004. Unusual Cys-Tyr Covalent Bond in a Large Catalase, J. Mol. Biol., 342, 971-985.
- Dinçer, A., 2000. Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Donald, L. J., Krokhin, O. V., Duckworth, H. W., Wiseman, B., Deemagarn, T., Singh, R., Switala, J., Carpena, X., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2003. Characterization of the Catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* by mass spectrometry, J. Biol. Chem., 278, 35687-35692.
- Donald, L. J., Krokhin, O. V., Duckworth, H. W., Wiseman, B., Deemagarn, T., Singh, R., Switala, J., Carpena, X., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2003. Characterization of the Catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* by Mass Spectrometry, J. Biol. Chem., 278, 35687-35692.
- Dos Santos, W. G., Pacheco, I., Liu, M.-Y., Teixeira, M., Xavier, A. V. ve Legal, J., 2000. Purification and Characterization of an Iron Superoxide Dismutase and a Catalase from the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio gigas*, J. Bacteriol., 182, 3, 796-804.
- Dounce, A. L., 1983. A Proposed Mechanism for the catalytic action of Catalase, J. Theor. Biol., 105, 553-567.
- Dülger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Osidatif Stres ve Antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Eberhardt, A. M., Pedroni V., Volpe, M., Ferreira, M. L., 2004. Immobilization of Catalase from *Aspergillus niger* on Inorganic and biopolymeric Supports for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Decomposition, Appl. Catalysis B: Environ., 47, 153-163.
- Edge, R., Mc Garvey, D. J. ve Truscott, T. G., The Carotenoids as Antioxidants, a review, J. Photoc. Photobio., 41, 189-200.
- Erişen, B., Akkuş, İ., Uygur, N., Koçak, A., 1996. Türkiye Jeotermal Envanteri, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Evans, S., 1993. SETOR: hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules, J. Mol. Graphics, 11, 134-138.
- Feinstein, R. N., 1949. J. Biol. Chem., 180, 1197.
- Fita, I., Rossmann, M. G., 1985. The Active Center of Catalase, J. Mol. Biol., 185, 1, 21-37.
- Fridovich, I., 1986. Biological Effects of Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 247, 1-11.

- Frugoli, J. A., 1998. Characterization of Catalase in *Arabidopsis thaliana*, Doktora Tezi, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire.
- Fruhwrith, G. O., Paar, A., Gudelj, M., Cavaco-Paulo, A., Robra, K.-H., Gubitz, G. M., 2002. An immobilized catalase peroxidase from the alkalothermophilic *Bacillus* SF for the treatment of textile-bleaching effluents, Appl. Microbiol. Biotechnol., 60, 313-319.
- Gonçalves, V. M., de Cerqueira Leite, L. C., Raw, I. ve Cabrera-Crespo, J., 1999. Purification of Catalase from Human Placenta, Biotechnol. Appl. Biochem., 29, 73-77.
- Görenek, G., 1999. Aljinat Kürecikler İçinde Katalaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Green, M. T., 2001. The Structure and Spin Coupling of Catalase Compound I: A Study of Noncovalent Effects, J. Am. Chem. Soc., 123, 9218-9219.
- Grupta, M., 1995. Thermostability of Enzymes, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Guagliardi, A., Martino, M., Iaccarino, I., de Rosa, M., Rossi, M., Bartolucci, S., 1996. Purification and Characterization of the Alcohol Dehydrogenase from a Novel Strain of *Bacillus stearothermophilus* Growing at 70 °C, Int. J. Biochem. Cell Biol., 28, 239-246.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 1984. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease, Biochem. J., 219, 1-14.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease, Method. Enzymol., 186, 1-80.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant Defence Mechanisms: from the Beginning to the End (of the Beginning). Free Radic. Res., 31, 261-272.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. ve Cross, E. C., 1992. Free Radical, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now?, J. Lab. Clin. Med., 119, 6, 598-620.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R., Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3578-3583.
- Hatchikian, E. C., LeGall, J., Bruschi, M. ve Dubourdiou, M., 1972. Regulation of the Reduction of Sulfite and Thiosulfate by Ferredoxin, Flavodoxin and Cytochrome C<sub>3</sub> in Extracts of the Sulfate Reducer *Desulfovibrio gigas*, Biochim. Biophys. Acta, 258, 701-708.
- Hazell, S. L., Evans Jr, D. J., Graham, D. Y., 1991. *Helicobacter pylori* Catalase, J. Gen. Microbiol., 137, 57-61.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Mateo, C., Lopez-Gallego, F., Moreno, R., Berenguer, J., Guisan, J. M. ve Fernández-Lafuente, R., 2004. Purification of a Catalase from *Thermus thermophilus* via IMAC Chromatography: Effect of the Support, Biotechnol. Prog., 20, 1578-1582.
- Hildebrandt, A. G. ve Roots, I., 1975. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH)-dependent Formation and Breakdown of Hydrogen Peroxide

- Daring Mixed Function Oxidation Reaction in Liver Microsomes, Arch. Biochem. Biophys., 171, 385-397.
- Hillar, A., Nicholls, P., Switala, J. ve Loewen, P. C., 1994. NADPH Binding and Control of Catalase Compound II Formation: Comparison of Bovine, Yeast, and *Escherichia coli* Enzymes, Biochem. J., 300, 531-539.
- Hillar, a., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A. G. ve Loewen, P. C., 2000. Modulation of the Activities of Catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by Site-directed mutagenesis, Biochemistry, 39, 5868-5875.
- Hillenbrand, T., 1999. Die abwasser situation in der deutschen papier-, textile-, und lederindustrie, GWF, Wasser/Abwasser, 140, 4, 267-273.
- Huang, J., Kim-Shapiro, D. B. ve King, S. B., 2004. Catalase-Mediated Nitric Oxide Formation from Hydroxyurea, J. Med. Chem., 47, 3495-3501.
- Imlay, J. A., Chin, S. M., Linn, S., 1988. Toxic DNA Damage by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Through Fenton Reaction *in vivo* and *in vitro*, Science, 240, 640-642.
- İnal, T., 1990. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi, 1108.
- Jaenicke, R. ve Bohm, G., 1998. The Stability of Proteins in Extreme Environments, Curr. Opin. Struct. Biol., 8, 738-748.
- Jakopitsch, C., Auer, M., Ivancich, A., Rujer, F., Furtmuller, P. G. ve Obinger, C., 2003. Total Conversion of Bifunctional Catalase-peroxidase (KatG) to Monofunctional Peroxidase by Exchange of a Conserved Distal Side Tyrosine, J. Biol. Chem., 278, 20185-20191.
- Johnson, P., 2002. Antioxidant Enzyme Expression in Health and Disease: Effects of Exercise and Hypertension, Comp. Biochem. Phys., Part C, 133, 493-505.
- Johnsson K., Froland W. A. ve Schultz P. G., 1997. Overexpression, Purification, and Characterization of the Catalase-peoksidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*, J. Biol. Chem., 272, 5, 2834-2840.
- Kagawa, M., Murakoshi, N., Nishikawa, Y., Matsumoto, G., Kurata, Y., Mizobata, T., Kawata, Y., Nagai J., 1999. Purification and Cloning of a Thermostable Manganese Catalase from a Thermophilic Bacterium, Arch. Biochem. Biophys., 362, 2, 346-355.
- Kalko, S. G., Gelpi, J. L., Fita, I. ve Orozco, M., 2001. Theoretical Study of the Mechanisms of Substrate Recognition by Catalase, J. Am. Chem. Soc., 123, 9665-9672.
- Kettle, A. J. ve Winterbourn, C. C., 2001. A Kinetic Analysis of the Catalase Activity of Myeloperoxidase, Biochemistry, 40, 34, 10204-10212.
- Kikuchii, K., Hayashi, S., Nakamoto, H. ve Nakamura, S., 1982. Properties of *Aspergillus niger* Catalase, J. Biochem., 92, 1449-1456.
- Kim, H., Lee, J. S., Hah, Y. C., Roe, J. H., 1994. Characterization of the Major Catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147, Microbiol., 140, 3391-3397.
- Kirkman H. N., Gaetani G. F., 1984. Catalase: a Tetrameric Enzyme with Four Tightly Bound Molecules of NADPH, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4343-4347.



- Kleywegt, G.J. ve Jones, T.A., 1994. In: From First Map to Final Model (S. Bailey, R. Hubbard, ve D.A. Waller, Eds.), SERC Daresbury Laboratory, Warrington, U.K., 59-66.
- Klotz, M. G. ve Loewen, P. C., 2003. The Molecular Evolution of Catalatic Hydroperoxidases: Evidence for Multiple lateral Transfer of Genes Between Prokaryota and from Bacteria into Eukaryota, Mol. Biol. Evol., 20, 1098-1012.
- Koffler, H., 1957. Protoplasmic Differences Between Mesophiles and Thermophiles, Bacteriol. Rev., 21, 227-232.
- Koller, F., 2005. Protein-engineering of Hydroperoxidases, Biyokimya Bölümü, Vienna Üniversitesi, <http://www.univie.ac.at/ibmz/groups/koller.htm>, 15 Mart 2005.
- Kono, Y. ve Fridovich, I., 1983. Isolation and Characterization of the Pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*, J. Biol. Chem., 258, 6015-6019.
- Kristjansson, J. K., 1989. Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes, Trends Biotechnol., 7, 349.
- Kristjansson, J. K., Stetter, K. O., 1992. Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J. K. (Ed.), CRC Press, Boca Raton.
- Kuusk, H., Björklund, M., Rydström, J., 2001. Purification and Characterization of a Novel Bromoperoxidase-Catalase Isolated from Bacteria Found in Recycled Pulp White Water, Enzyme Microb. Technol., 28, 617-624.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Loew, O., 1901. U.S. Depent of Agri. Repts., 65, 5.
- Loewen, P.C., 1997. Bacterial catalases, in: J.G. Scandalios (Ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 273-308.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall R. J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2000. Brock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Matés, J. M., Pérés-Gomez, C., de Castro, I. N., 1999. Antioxidant Enzymes and Human Disease, Clin. Biochem., 32, 8, 595-603.
- Matsumura, M., Katakura, Y., Imanaka, T., Aiba, S., 1984. Enzymatic and Nucleotide Sequence Studies of a Kanamycin-Inactivating Enzyme Encoded by a Plasmid from Thermophilic Bacilli in Comparison with That Encoded by Plasmid pUB110, J. Bacteriol., 160, 413-420.
- Matsunaga, I. ve Shiro, Y., 2004. Peroxide-Utilizing Biocatalysts: Structural and Functional Diversity of Heme-Containing Enzymes, Curr. Opin. Chem. Biol., 8, 127-132.
- Meister, A. ve Anderson, M. E., 1983. Glutathion, Annu. Rev. Biochem., 52, 711-760.
- Melik-Adamyan, W., Bravo, J., Carpena, X., Switala, J., Mate, M. J., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2001. Substrate Flow in Catalases Deduced from the Crystal Structures of

- Active Site Variants of HPII from *Escherichia coli*, Proteins: Struct. Funct. Genet. 44, 270–281.
- Miquel, P., 1888. Monographie d'un Bacille Vant Au-Dela de 70 °C, Ann Micrographic, 1, 3.
- Monti, D., Baldaro, E., Riva, S., 2003. Separation and Characterization of Two Catalase Activities Isolated from the Yeast *Trigonopsis variabilis*, Enzyme Microb. Technol., 32, 596-605.
- Murthy, M. R., Reid, T. J. 3d, Sicignano, A., Tanaka, N., Rossmann, M. G., 1981. Structure of Beef Liver Catalase, J. Mol. Biol., 152, 2, 465-499.
- Nadler, V., Goldberg, I. ve Hochman, A., 1986. Comparative Study of Bacterial Catalases, Biochim. Biophys. Acta, 882, 234-241.
- Nicholls, P., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2001. Enzymology and Structure of Catalases, Adv. Inorg. Chem., 51, 51-106.
- Noble, J. ve Oberdick, J. D., 1988. Biochemistry, Student's Solution Guide, Second Edition, Macmillan Publishing Company, New York, 93-94.
- Olson, L. P. ve Bruice, T. C., 1995. Electron Tunneling and Ab Initio Calculations Related to One-Electron Oxidation of NAD(P)H Bound to Catalase, Biochemistry, 34, 7335–7347.
- Oral, B., 2003. Salisilik Asit ve Düşük Sıcaklıkların Ispanak Yapraklarına Nitrat Redüktaz, Katalaz ve Peroksidaz Aktivitesi ve Donma Hasarı Seviyesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Paar, A., Costa, S., Tzanov T., Gudelj, M., Robra, K., H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G. M., 2001. Thermo-alkali-stable Catalases from Newly Isolated *Bacillus* sp. For The Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents, J. Biotechnol., 89, 147-153.
- Popescu, I.C., Zetterberg, G., Gorton, L., 1995. Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP-modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Biosens. Bioelectr., 10, 5, 443-461.
- Pürçüklü, S., 1996. Kırmızı Kan Hücrelerinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Querol, E., Perez-Pons, J. A., Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Eng., 9, 265-271.
- Redila, V. A., 1998. An Examination of the Effects the Catalase Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazole on Ethanol, Food and Water Intake, Yüksek Lisans Tezi, Concordia Üniversitesi, Montreal, Kanada.
- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Furthmuller, P. G., Rueker, F., Switala, J., Loewen, P. C. ve Obinger, C., 2001. The Role of Distal Tryptophan in the Bifunctional Activity of Catalase-peroxidase, Biochem. Soc. Trans., 29, 99-105.

- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Rueker, F., Krois, D., Peschek, G. A. ve Obinger, C., 2000. Effect of Distal Cavity Mutations on the Formation of Compound I in Catalase-Peroxidases, J Biol. Chem., 275, 22854-22861.
- Reid, T. J. 3d, Murthy, M. R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W. D., Rossmann, M. G., 1981. Structure and Heme Environment of Beef Liver Catalase at 2.5 Å Resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 8, 4767-4771.
- Ro, Y. T., Lee, H. I., Kim, E. J., Koo, J. H., Kim, E., Kim, Y. M., 2003. Purification, Characterization, and Physiological Response of Catalase-Peroxidase in *Mycobacterium* sp. Strain JCI DSM 3803 Grown on Methanol, FEMS Microbiol. Lett., 226, 397-403.
- Rovira, C. ve Fita, I., 2003. The Proximal Hydrogen-Bonded Residue Controls the Stability of the Compound II Intermediate of Peroxidases and Catalases, J. Phys. Chem. B, 107, 22, 5300-5305.
- Russell, R. J. M., Taylor, G. L., 1995. Engineering Thermostability: Lessons from Thermophilic Proteins, Curr. Opin. Biotechnol., 6, 370-374.
- Sarp, R. S., Riley, P. W. ve White, D., 1991. Heterotrophic Thermophilic Bacilli. In: Thermophilic Bacteria, Krispjansson, J. K. (ed.), CRC Pres, Boca Raton.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P. C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie., 80, 933-941.
- Schake, S. A., 1999. Analysis of Transgenic Tobacco That Express Maize Catalase3, Doktora Tezi, Texas Tech Universitesi, USA.
- Sonnleithner, A., 1983. Biotechnology of Thermophilic Bacteria, Growth Products and Application, Adv. Biochem. Eng. Biotech., 28, 69-138.
- Spink, C. H. Ve Chaires, J. B., 1999. Effects of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA, Biochemistry, 38, 496-508.
- Stenesh, J., 1984. Experimental Biochemistry, Allyn and Bacon, Inc., USA, 230-231.
- Storz, G. ve Imlay, J., 1999. Oxidative Stress, Current Opin. Microbiol., 2, 188-194.
- Switala, J. ve Loewen, P. C., 2002. Diversity of Properties Among Catalases, Arch. Biochem. Biophys., 401, 145-154.
- Takahara S., Hamilton, H.B., Neel, J.V., Kobara T. Y., Ogura, Y. ve Nishimura, E.T., 1960. J. Clin. Invest., 39, 610.
- Tanaka, M., Ogawa, N., Ihara, K., Sugiyama, Y. ve Mukohata, Y., 2002. Cytochrome *aa<sub>3</sub>* in *Haloferox volcanii*, J. Bacteriol., 184, 3, 840-845.
- Tarhan, L., Uslan, A. H., 1990. Characterization and Operational Stability of Immobilised Catalase, Process Biochem., 25, 1, 14-18.
- Taub, J. J., 2001. Characterization of Catalase and its Role in Life-span Determination in *Caenorhabditis elegans*, Doktora Tezi, Dartmouth Collage, Hanover, New Hampshire.
- Terzenbach D. P., Blaut, M., 1998. Purification and Characterization of a Catalase from the Nonsulfur Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and Its Role in the Oxidative Stres Response, Arch. Microbiol., 169, 503-508.

- Thomas, L. D., Dunkley, M. L., Moore, R., Reynolds, S., Bastin, D. A., Kyd, J. M., Cripps, A. W., 2001. Catalase Immunization from *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Bacterial Clearance in the Rat Lung, Vaccine, 19, 348-357.
- Thompson, V. S., Schaller, K. D. Ve Apel, W. A., 2003. Purification and Characterization of a Novel Thermo-Alkali-Stable Catalase from *Thermus brockianus*, Biotechnol. Prog., 19, 1292-1299.
- Triggs-Raine, B. L., Doble, B. W., Mulvey, M. R., Sorby, P. A. ve Loewen, P. C., 1988. Nucleotide Sequence of KatG, Encoding Catalase HPI of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 170, 4415-4419.
- Tzanov, T., Costa, S., Gubitz, G. M., Cavaco-Paulo, A., 2001. Dyeing with catalase treated bleaching baths, Color Tech., 117, 1-5.
- Unwin, P. N. T. (1975). Beef Liver Catalase Structure: Interpretation of Electron Micrographs, J. Mol. Biol., 98, 235-242.
- Vieille, C., Burdette, D. S., Zeikus, J. G., 1996. Thermozyms, Biotechnol. Ann. Rev., 2, 1-83.
- Vogt, G. ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability: Hydrogen Bonds or Internal Packing?, Folding Design, 2, 40-46.
- Vogt, G., Woell, S., Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability: Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Wada, K., Tada, T., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Tamoi, M., Shigeoka, S. ve Nishimura, K., 2002. Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies of Catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC 7942, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 58, 157-159.
- Wang, H., Tokusige, Y., Shinoyama, H., Fujii, T. ve Urakami, T., 1998. Purification and Characterization of a Thermostable Catalase from Culture Broth of *Thermoascus aurantiacus*, J. Ferment. Bioeng., 85, 2, 169-173.
- Watanabe, K., Oshima, T., Nishimura, S., 1976. CD Spectra of 5-methyl-2-thiouridine in tRNA-met-F from an Extreme Thermophile, Nuc. Acids. Res., 3, 1703-1713.
- Wayne, L. G., Diaz, G. A., 1986. A Double Staining Method for Differentiating Between Two Classes of Mycobacterial Catalase in Polyacrylamide Electrophoresis Gels, Anal. Biochem., 157, 89-92.
- Weck, M., 1991. Hydrogen peroxide—an environmentally acceptable textile bleaching agent, Text. Prax. Int., 2, 144-147.
- Wei, C.-J., Lei, B., Musser, J. M. ve Tu, S.-C., 2003. Isoniazid Activation Defects in Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) Mutants Evident in InhA Inhibitor Production, Antimicrob. Agents Chemother., 47, 2, 670-675.
- Woodbury, W., Spencer, A. K., Stahmann, M. A., 1971. An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isozymes, Anal. Biochem., 44, 301-305.
- Wu, S.-C., Huang, H., Lin, C.-C., 2004. Expression and Functional Characterization of *Helicobacter pylori* Catalase from Baculovirus-infected Insect Cells, Enz. Microb. Technol., yayında.

- Yamada, Y., Saijo, S., Sato, T., Igarashi, N., Usui, H., Fujiwara, T. ve Tanaka, N., 2001. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Catalase-peroxidase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 57, 1157-1158.
- Yıldız, H., 1999. Selüloz Asetat Kürecikler Yüzeyinde Katalaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yu, A. ve Caruso, F., 2003. Thin Film of Polyelectrolyte-Encapsulated Catalase Microcrystals for Biosensing, Anal. Chem., 75, 3031-3037.
- Yumoto, I., Ichihashi, D., Iwata, H., Istokovics, A., Ichise, N., Matsuyama, H., Okuyama, H. ve Kawasaki, K., 2000. Purification and Characterization of a Catalase from the Facultatively Psychrophilic Bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1T Exhibiting High Catalase Activity, J. Bacteriol., 182, 7, 1903-1909.
- Yurdakul, Z., 2005. Oksijen ve Canlılar, <http://www.klinikbiyokimya.com/seminer/oksijen/oksijen.htm>, 15 Mart 2005.
- Zamocky, M. ve Koller, F., 1999. Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and *in vitro* Mutagenesis, Prog. Biophys. Mol. Biol., 72, 19-66.
- Zamocky, M., Janecek, S. ve Koller, F., 1997. The Area of the Main Substrate Channel is Highly Conserved among All True Catalases, Biologia, 52, 723-730.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. ve Cole, S., 1992. The Catalase-peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, Nature, 358, 591-593.
- Zou, P. ve Schrempf, H., 2000. The Heme-Independent Manganese-Peroxidase Activity Depends on the Presence of the C-Terminal Domain Within the *Streptomyces reticuli* Catalase-Peroxidase CpeB, Eur. J. Biochem., 267, 2840-2849.

## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Trabzon'un Çaykara İlçesi'nde doğdu. 1991 yılında Trabzon Lisesi'nden mezun olduktan sonra, aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 1995 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra mezun oldu. 1995 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisans öğrenimini 1999 yılında tamamladı. 1999 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. 1996–1999 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptıktan sonra 1999 yılında aynı üniversitenin Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne Öğretim Görevlisi olarak atandı. Halen Öğretim Görevlisi olarak çalışmakta olup, evlidir.