

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Aspergillus fumigatus* KATALAZİNİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

CEREN AĞGEZ

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aspergillus fumigatus KATALAZİNİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

CEREN AĞGEZ

Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.
Dr. Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Ayşe AVCI
Jüri Üyesi, Sakarya Üniv.





Tezin Savunulduğu Tarih: 10.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, *Aspergillus fumigatus* katalazının üretimi, kromatografik yöntem ile saflaştırılması ve karakterize edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan ve bana bu imkanı sağlayan kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a, bu çalışmamda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarına ve çalışma arkadaşlarıma, tez savunma jürimde yer alan saygıdeğer hocalarıma, her zaman desteklerini hissettiğim çalışma arkadaşlarım Eda BAYKAL SARI ve Binnur YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak eğitim hayatım boyunca maddi manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen, daima yanımda olan annem Kezban AĞGEZ, babam Kayalı AĞGEZ ve kardeşim İklim AĞGEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2018/126) birimine şükranlarımı sunarım.

Haziran-2019

Ceren AĞGEZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Endüstriyel Enzimler.....	4
1.2. Katalazlar	8
1.2.1. Monofonksiyonel katalazlar.....	9
1.2.2. Katalaz peroksidazlar	9
1.2.3. Mn katalazlar	10
1.3. Katalazların Kullanım Alanları	11
1.4. <i>Aspergillus</i> sp.	13
2. MALZEME VE YÖNTEMLER	16
2.1. Malzemeler.....	16
2.1.1. Kimyasallar	16
2.1.2. Mikroorganizma.....	16
2.2. Yöntemler.....	16
2.2.1. Kültür Hazırlanması.....	16
2.2.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> 'tan optimum enzim üretimi.....	17
2.2.3. <i>A. fumigatus</i> 'dan katalaz enziminin iyon değıştirme kromatografisi ile saflaştırılması	17
2.2.4. Biyokütle tayini.....	17
2.2.5. Enzim aktivite tayini	18
2.2.6. Protein miktar tayini	19
2.2.7. Elektroforez.....	19
2.2.8. <i>A. fumigatus</i> 'dan saflaştırılan katalaz enziminin karakterizasyonu	20
2.2.8.1. Katalaz enzimi için optimum sıcaklık değerin ve termal kararlılığının belirlenmesi.....	20
2.2.8.2. Katalaz enzimi için optimum pH değerin ve kararlılığının belirlenmesi.....	20
2.2.8.3. Enzimin substrat konsantrasyonunun belirlenmesi	21
2.2.8.4. Enzimin substrat özgülüğünün belirlenmesi.....	21
2.2.8.5. Enzim aktivitesine organik çözücülerin etkisinin incelenmesi	21
3. BULGULAR VE TARTIşMA	22
3.1. <i>Aspergillus fumigatus</i> 'dan Katalaz Enziminin Üretimi	22
3.2. Katalaz Üretiminin Optimizasyonu.....	23
3.2.1. Sıcaklığın enzim üretimine etkisi.....	23

3.2.2. H ₂ O ₂ 'nin enzim üretimine etkisi	24
3.3. Katalaz Enziminin Kromatografik Yöntem ile Saflaştırılması	26
3.4. SDS-PAGE Analizi	27
3.5. Saflaştırılmış <i>A. fumigatus</i> Katalazının Biyokimyasal Karakterizasyonu	28
3.5.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi	28
3.5.2. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi	29
3.5.3. Katalazın termal kararlılığı	30
3.5.4. Katalazın pH kararlılığı	31
3.5.5. Organik çözücülerin katalaz aktivitesine etki	32
3.5.6. Farklı substratların katalaz aktivitesine etkisi	34
3.5.7. Katalaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi	35
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	40
EKLER	49
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	55
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i> mantarı	13
Şekil 3.1.	<i>A. fumigatus</i> 'un zamana karşı biyokütle (g/mL) ve katalaz (U/mL) aktivite grafiği	22
Şekil 3.2.	Farklı hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) konsantrasyonlarının katalaz enzim üretimi üzerine etkisi.	25
Şekil 3.3.	<i>A. fumigatus</i> 'dan kromatografik yöntem ile saflaştırılan katalaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü	28
Şekil 3.4.	<i>A. fumigatus</i> katalazının farklı sıcaklık değerlerindeki bağlı aktivite grafiği	29
Şekil 3.5.	<i>A. fumigatus</i> 'un katalaz aktivitesine pH'nın etkisi	30
Şekil 3.6.	<i>A. fumigatus</i> katalazının termal kararlılığı	31
Şekil 3.7.	<i>A. fumigatus</i> katalazının pH kararlılığı	32
Şekil 3.8.	H ₂ O ₂ konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği	36
Şekil 3.9.	Katalaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı	36

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1.	Sıcaklığın katalaz üretimine etkisi	24
Tablo 3.2.	Farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarının katalaz üretimine etkisi.....	25
Tablo 3.3.	Katalaz enziminin saflaştırılma basamakları	26
Tablo 3.4.	Kromatografik yöntemle saflaştırılan mikroorganizmalar	27
Tablo 3.5.	Farklı organik çözücülerin <i>A. fumigatus</i> katalaz aktivitesi üzerine etkisi	33
Tablo 3.6.	<i>A. fumigatus</i> katalazının farklı oksidatif/peroksidatif substratlarına ilgisi ve <i>T. versicolor</i> lakkazı ile turp peroksidazıyla karşılaştırılması.....	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
°C	: Santigrat derece
U	: Unit-Enzim birimi
µmol	: mikromol
nmol/mL/dak	: nanomol/mililitre/dakika
U/mg	: Unit/miligram
U/L	: Unit/litre
g/L	: gram/litre
mg/mL	: miligram/mililitre
mL/dak	: mililitre/dakika
spor/mL	: spor/mililitre

Kısaltmalar

(a/h)	: Ağırlık/Hacim
APS	: Amonyum persülfat
dH ₂ O	: Deiyonize su
DMSO	: Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
(h/h)	: Hacim/Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
kDa	: Kilodalton
K ₂ HPO ₄	: Di Potasyum Fosfat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
nm	: Nanometre
pH	: Power of hydrogen (Hidrojenin gücü)
Rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: Tetrametiletildiamin
V	: Volt
YpSs	: Yeast Extract Powder Soluble Starch Besiyeri (Maya Ekstraktı ve Çözülebilir Nişasta İçeren Besiyeri)

***Aspergillus fumigatus* KATALAZININ ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

ÖZET

Bu çalışmada *Aspergillus fumigatus*'dan katalaz enziminin optimum üretimi, kromatografik yöntemle saflaştırılması ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda 37°C ve 155 rpm çalkalama hızında %1 (a/h) glukoz ve 0,5 mM H₂O₂ içerecek şekilde hazırlanan 1 litrelik YpSs besi ortamında büyütülen *A. fumigatus*'dan 7. günde ham enzim ekstraktı elde edildi. Daha sonra enzim tek basamakta küf özütünden %42 geri kazanımla 4 kat kısmi olarak başarıyla saflaştırıldı. SDS-PAGE analizi ile molekül ağırlığı ~70 kDa olarak hesaplandı. Enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı 60°C, pH'sı ise 7,0 olarak belirlendi. K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,4 mM ve 1250 µmol⁻¹ dak L olarak ölçüldü. Kararlılık testleri enzimin geniş bir pH (4,0-9,0) ve sıcaklık (30°C-50°C) aralığında aktif olarak kalabildiğini gösterdi. Ayrıca bazı organik çözücüleri, konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağlı olarak tolere edebildiği bulundu. Son olarak, peroksit yokluğunda 4-metil katekol ve pyrokatekol gibi fenolik bileşikleri okside edebildiği keşfedildi. Özetle, *A. fumigatus*'dan katalaz enzimi iyon değiştirme kromatografi yöntemi ile tek basamakta ilk kez bu çalışmada saflaştırıldı. Enzimde belirlenen biyokimyasal özellikler (düşük K_m değeri, termostabilite, vb.), katalazın farklı endüstriyel uygulamalar için iyi bir biyokatalizör adayı olacağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *A. fumigatus*, H₂O₂, Karakterizasyon, Katalaz, Kromatografi.

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE FROM *Aspergillus fumigatus*

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the optimum production of catalase from *Aspergillus fumigatus*, to purify using chromatography and to determine its biochemical properties. In line with this goal, the crude enzyme extract was obtained from *A. fumigatus* on 7th day of cultivation of cells grown at 37°C and 155 rpm in 1 liter YpSs medium containing 1% glucose and 0.5 mM H₂O₂. Then, the enzyme was successfully purified 4-fold with 42% recovery from the crude extract in a single step. The molecular weight was found to be as ~70 kDa by SDS-PAGE. The optimum reaction temperature of the enzyme was established as 60°C and the pH was 7.0. K_m and V_{max} values were calculated as 7.4 mM and 1250 μmol⁻¹ min L, respectively. Stability tests have shown that the enzyme can remain active in a wide range of pH (4.0-9.0) and temperature (30°C-50°C). It was also observed that some organic solvents could be tolerated depending on the concentration and incubation time. Finally, it was noticed that in the absence of peroxide, it was able to oxidize phenolic compounds such as 4-methyl catechol and pyrocatechol. In summary, the catalase enzyme from *A. fumigatus* was first purified in a single step by ion exchange chromatography in this study. The biochemical properties of the enzyme (low K_m value, thermostability, etc.) indicate that it can function as a good biocatalyst in different industrial applications.

Keywords: *A. fumigatus*, H₂O₂, Characterization, Catalase, Chromatography.

GİRİŞ

Enzimler katalitik etki sağlayan doğal maddelerdir. Tüm canlı organizmalarda hayatın devamlılığı için elzem olan büyük ve çeşitli kimyasal tepkimelerin miktarını artırmak için canlı organizmalar tarafından meydana getirilirler (Li ve diğ., 2012) . Mikrobiyal enzimler genellikle gıda, tarım, ilaç, kimya ve enerji alanlarında yaygın biçimde kullanılırlar. Enzimler ile gerçekleştirilen uygulamalar, işlem süresinden kazanç, düşük enerji girdisi, maliyette azalma ve çevre dostu özellikleri sebebiyle tercih edilmektedir (Choi ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2012). Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel uygulamalarda önemli olmasının nedeni, maliyet azaltma isteği, tüketim mallarının talebi, çevre güvenliği ve doğal kaynakların tükenmesinden kaynaklıdır (Choi ve diğ., 2015).

Katalazlar, enzim grupları içerisinde üzerinde en çok çalışılanlardan biridir ve hücredeki aşırı biriken hidrojen peroksidin (H_2O_2) moleküler oksijene ve suya çözülmesiyle hücrede antioksidan etkilerini gösterirler (Chelikani ve diğ., 2004). Katalazların bazıları (katalaz-peroksidazlar), çoğunlukla ikinci bir aktivite olarak ortamda uygun organik bileşik mevcut olduğunda peroksidaz fonksiyonu da (düşük molekül ağırlığına sahip alkollerini okside ederek) gösterirler (Maté ve diğ., 1999). Ayrıca, yeni bir bulgu olarak bazı katalazların (memeli katalazı ile *Amaranthus cruentus*, *Bacillus pumilus*, *Scytalidium thermophilum* ve *Thermobifida fusca*'dan izole edilen katalazlar) peroksit yokluğunda oksidaz aktivitesi gösterdikleri keşfedilmiştir (Chen ve diğ., 2017; Loncar ve Fraaije, 2015; Sangar ve diğ., 2012; Vetrano ve diğ., 2005; Yuzugullu ve diğ., 2013).

Katalaz enzimi; başlıca gıda, farmasötik, tekstil, kağıt endüstrileri ve ayrıca immobilizasyon, enzimatik polimerizasyon ve detoksifikasyon sistemleri gibi çeşitli alanlarda da kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015).

FPLC (Hızlı protein sıvı kromatografisi), küçük çaplı durağan fazlar ile mümkün kılınan yüksek çözünürlükten yararlanan yüksek performanslı kromatografi şeklidir. FPLC 1982'de Pharmacia LKB (Uppsala, İsveç) tarafından, proteinleri de kapsayarak,

biyopolimerlerin biyolojik olarak daha uyumlu yüksek çözünürlüklü şekilde ayrıştırılmasını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Yöntem başlangıçta proteinler için geliştirilmiştir ve yaygın kromatografi yöntemlerinde (örneğin iyon değişimi, jel filtrasyonu, afinite ve ters faz) yüksek taşıma kapasitesine, hızlı akış hızlarına, biyoyumlu sulu tampon sistemlerine ve sabit fazların kullanılabilirliğine sahiptir. Bu sistem, otomatik örnek alma cihazları, en yüksek toplama ve gradyan program kontrolü dahil olmak üzere yüksek seviyede bir otomasyonun dahil edilmesiyle tekrarlanabilir ayrıştırmayı mümkün kılmaktadır. Proteinler dışında, oligonükleotitler ve plazmidler dahil olmak üzere diğer başka biyolojik örneklerde de kullanılabilir. FPLC’de en yaygın deney türü, proteinlerin anyon değiş tokuşudur (Madadlou ve diğ., 2010).

Bu çalışmada, mezofilik bir ökaryot olan *A. fumigatus*’ta üretilen monofonksiyonel katalazın üretimi, FPLC ile kısa sürede saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesi ve buradan, bilinen bir katalaz bünyesindeki ikincil aktivite varlığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *A. fumigatus* için hücre büyümesinin ve katalaz enzim üretiminin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar izlenerek katalaz enzimi iyon değiştirme kromatografisi kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmıştır.

Kromatografik yöntem ile saflaştırılarak elde edilen *A. fumigatus* katalazının hem saflığının tespiti hem de moleküler ağırlığının belirlenmesi için elektroforez analizi yapılmıştır. Hemen sonrasında saf olarak elde edilen katalaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon için gerekli olan verilerin eldesi amacıyla enzimin optimum pH değeri ve kararlılığına, optimum sıcaklık değeri ve kararlılığına, organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisine, substrat konsantrasyonuna ve son olarak substrat özgüllüğüne bakılmıştır.

Çalışma *A. fumigatus* katalazının bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ilk kez ortaya çıkarılması bakımından özgün değer taşımaktadır. Tek basamaklı kromatografik yöntem ile zamandan tasarruf edilerek saflaştırılan katalaz enzimi için ilk kez burada tanımlanan özellikler (düşük K_m değeri, termostabil olması, çift aktivite göstermesi vb.), *A. fumigatus* katalazının çeşitli endüstriyel uygulama alanlarda avantaj sağlayabileceğini göstermektedir. Buradan elde edilen bulguların, enzim için

rekombinant ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesi, mutasyon çalışmaları, EPR (Elektron Paramagnetik Rezonans) spektroskopisi, kristalografi çalışmaları ve biyodönüşüm çalışmaları gibi birçok çalışmanın gerçekleştirilme potansiyelini ortaya çıkardığına inanılmaktadır.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Endüstriyel Enzimler

Mikrobiyal enzimler genellikle gıda, tarım, ilaç, kimya ve enerji alanlarında yaygın biçimde kullanılırlar. Enzimler ile gerçekleştirilen uygulamalar, işlem süresinden kazanç, düşük enerji girdisi, maliyette azalma ve çevre dostu özellikleri sebebiyle tercih edilmektedir. (Choi ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2012). Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel uygulamalarda önemli olmasının nedeni, maliyet azaltma isteği, tüketim mallarının talebi, çevre güvenliği ve doğal kaynakların tükenmesinden kaynaklıdır (Choi ve diğ., 2015). Endüstride kullanılan enzimler açısından küresel pazarın 2014 yılında 4,2 milyar dolar olduğu ve bu rakamın 2015'ten 2020 yılına kadar yılda %7'lik artış gerçekleştirerek 6,2 milyar dolara erişmesi beklenmektedir (Singh ve diğ., 2016).

Enzimlerin elzem rollere sahip olduğu alanlardan bazıları biyosensör uygulamaları ve farmasötik endüstrisidir. Bunlar, sindirim problemleri ve enzimatik eksiklikler gibi konularda, diyabet test kitleri ve ELISA gibi tanı prosedürlerinde terapötik ilaçlar olarak yaygın kullanıma sahiptirler (Mane ve Tale, 2015). Diyabet ve diğer sağlık problemlerinin tayini amacıyla klinik tanıda çeşitli enzimler kullanılmaktadır. Örnek olarak, glukoz için glukoz oksidaz (EC 1.1.3.4); trigliseritler için lipaz (EC 3.1.1.3), karboksil esteraz (EC 3.1.1.1) ve gliserol kinaz (EC 2.7.1.30); üre için üreaz (EC 3.5.1.5) gibi enzimler verilebilir (Singh ve diğ., 2016).

Gıda endüstrisinde, kaliteli gıda talebi enzimlerin kullanımıyla sağlanabilmektedir. Enzimler, aroma, doku, renk, lezzet, görünüm ve besin değeri gibi gıda bileşenlerinin geliştirilmesinde etkili şekilde yer almaktadır (Neidleman, 1984). Enzimler gıda endüstrisinde; süt ürünleri, meyve suyu üretimi, pişirme ve demleme gibi sektörlerde kullanılmaktadır. Fırıncılık sektöründe, mikrobiyal enzimler, hamur stabilitesini, yumuşaklığını, yapısını ve üretilen ürünlerin raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Peynir uygulamalarında mikrobiyal enzimlerin kullanımının artması, süt endüstrisi gibi en büyük içecek endüstrisinde enzimlerin kullanımında etkin rol oynamaktadır (Singh ve diğ., 2016).

Enzimler, hamur stabilitesi, un arttırma, hacim arttırma, renk iyileştirilmesi ve ekmeğin tazeliğinin korunmasında kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016). Örneğin, amilaz tek başına ya da diğer başka enzimlerle birlikte, tazeliği, yumuşaklığı ve raf ömrünü uzatmak amacıyla nemi daha iyi biçimde tutmak üzere eklemek ununa eklenmektedir. Ayrıca, hamurun stabilitesini sağlamak ve yumuşatmak amacıyla lipaz ve ksilanaz (EC 3.2.1.8) kullanılırken, hamuru güçlendirmek ve beyazlığı arttırmak amacıyla glukoz oksidaz ve lipoksijenaz kullanılmaktadır. (Kuraishi ve diğ., 1997; Kieliszek ve Misiewicz, 2014; Moore ve diğ., 2006).

Gıda sektöründe enzim endüstrisinin elzem parçası olan süt enzimleri, renk, lezzet, aroma gibi özelliklerin dışında daha yüksek süt ürünü eldesi amacıyla verimin geliştirilmesi için kullanılır. Lipazlar, proteazlar, laktaz, esterazlar, aminopeptidaz, laktoperoksidaz, transglutaminaz, lizozim ve katalaz gibi enzimler süt endüstrisinde kullanılmaktadır. Belirtilen enzimler süt ürünlerinin güvenliğini arttırmak ve ürünlerin raf ömrünü uzatmakta biyo-koruyucu olarak kullanılmaktadır. Süt enzimleri, yoğurt, peynir gibi diğer süt ürünlerinin üretimi aşamalarında kullanılmaktadır (Pai, 2003; Qureshi ve diğ., 2015).

İçecek endüstrisi iki ana grup içinde toplanabilir. İlk grup çay, kahve, şurup, meyve suları ve paketlenmiş suları içine alan alkolsüz gruptur. İkincisi ise şarap, bira, distile alkollü içecekleri içeren alkollü gruptur (Singh ve diğ., 2016). Enzimler, meyve ve sebze suyu endüstrisinde işlemede yardımcı elemanlar olarak, soyma işleminde, meyve suyunun hazırlanmasında, temizleme, ekstraksiyon ve ürün kalitesini yükseltme gibi işlem kapasitesini arttırmak için kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016). Meyve suyunun işlenmesi sırasında arındırma ve sıvılaştırma işlemlerinde maliyeti azaltmak için selülaz, pektinaz ve amilazlar uygulanmaktadır (Garg ve diğ., 2016; Kumar, 2015). Bu ürünlerin kalite ve stabilite artışı enzimler ile sağlanmaktadır. (Mojsov, 2012).

Dünyada giderek artan süt ve et tüketimini karşılamak amacıyla kullanılan yem endüstrisinde enzimler kullanılmaktadır. 1980'li yıllarda başlayan hayvan yemlerinde enzim kullanımı 1990'lı yıllarda en yüksek seviyesine gelmiştir. Bu alanda kullanılan enzimler, hayvanlar tarafından besinlerin sindirilmesini arttırmada önemlidirler (Choct, 2006). Bu sektörde, zararlı ya da besin değeri olmayan yem bileşenlerinin

bütünlüğünü bozmak için enzim eklemesi yapılır. Kümes hayvanlarında, proteazlar, fitazlar, glukanzlar, ksilanazlar, α -galaktosidazlar, α -amilazlar ve poligalakturonazlar gibi enzimler kullanılır (Adrio ve Demain, 2014; Bhat, 2000; Chesson, 1993; Walsh ve diğ., 1993). Yem endüstrisindeki en büyük kullanıma sahip enzim olan fitaz, tahıl içerikli yemlerde fitik aside bağlı olan doğal fosforun alınımını gerçekleştirmek için kullanılmaktadır (Bhat, 2000; Frias ve diğ., 2003; Lei ve Stahl, 2000;). Monogastrik hayvanlar, yüksek oranda selüloz ve hemiselüloz barındıran bitki bazlı yemleri sindiremezler. Ksilanaz ve β -glukanaz enzimi yüksek miktarda nişastayı tümüyle parçaladıkları ve sindirdikleri için besinlerine eklenmektedirler (Bhat, 2000; Kirk ve diğ., 2002).

Sürdürülebilirlik konularının zaman geçtikçe dikkat çekmesiyle, mikrobiyal enzimlerin kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisindeki kullanımı ekosistem üzerindeki olumsuz etkileri en aza indirmek amacıyla artmıştır. Enzimlerin kullanımı, enerji tüketimini, işlem süresini ve işlemdeki kimyasalların miktarını aza indirir. Enzimler, kâğıt, kâğıt hamuru endüstrisinde ve atık arıtımında, kimyasal oksijen talebini (COD) ve biyolojik oksijen talebini (BOD) artırmak amacıyla kullanılırlar (Srivastava ve Singh, 2015). Ligninazlar ve ksilanazlar, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde, hemiselüloz ve ligninlerin yok edilmesiyle kâğıt hamurunun değerini yükseltmek amacıyla kullanılmaktadır (Maijala ve diğ., 2008).

Tekstil endüstrisi, ağartıcı kimyasallardan ve boyadan kaynaklanan yüklü miktardaki atık oluşumundan sorumludur ve boya, çevre kirliliğine en büyük sebeplerdendir (Ahuja ve diğ., 2004). Bu tür endüstrilerde, elyaf işleme kısmında çevreye duyarlı teknolojilerin geliştirilmesine ve ürün kalitesini arttırmaya yönelik stratejilerin oluşturulmasına imkan yaratmak için enzimler kullanılmaktadır (Choi ve diğ., 2015). Pamuk terbiye işlemlerinde ve ön işlemede kullanılan temel enzim sınıfları oksidoredüktaz ve hidrolazdır. Hidrolaz grubu, kumaşın biyo-boyanması ve biyo-parlatılmasında, pamuk yumuşatılmasında, yün terbiyesinde, yünün tahriş edilmesinde ve sentetik liflerin modifikasyonunda kullanılan, selülaz, amilaz, proteaz, pektinaz, kütinaz ve lipaz / esterazı barındırır (Araujo ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2013). Oksidoredüktazlar ise, ağartma sonlandırma, biyo-ağartma, boya renklendirme, yün, kumaş terbiyesi gibi alanlarda kullanılan, katalaz, peroksidaz, lakkaz ve ligninaz

içermektedir (Mojsov, 2011). Örneğin *Bacillus* sp. amilazı haşıl sökmede kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016).

Enzimlerin kozmetik alanındaki kullanımı da artmaktadır. Enzimler, serbest radikal toplayıcıları olarak, diş macunu, ağız gargaraları, güneş kremi ve saç boyalarında kullanılırlar (Li ve diğ., 2012). Peroksidaz (POD) ve Süperoksit dismutaz (SOD), güneş kremlerinde serbest radikal yok edici olarak kullanılırlar (Babizhayev, 2006). Ölü ya da zarar görmüş cildi soyarak cildi temizlemek ve pürüzsüzleştirmek amacıyla cilt bakım kremlerinde proteazlar kullanılır (Cho ve diğ., 2007). Endoglikozidaz ve papain, diş macununda, ağız gargaralarında, diş ve diş etinde kokuya sebep olan oluşumları gidermek, dişleri beyazlatmak, plakları temizlemek amacıyla kullanılırlar (Buckingham, 1985). Cilt bakımı alanında katalaz, lipaz gibi enzimler kullanılmaktadır (Diehl, 2008). Ayrıca, kontakt lens temizleyicilerinde protein filmleri çıkarmak amacıyla enzimler kullanılır (Alfa ve Jackson, 2001).

Deterjanlar çamaşır yıkama, bulaşık yıkama, evsel, kurumsal ve endüstriyel temizlik gibi çeşitli işlemlerde kullanılmaktadır (Schafer ve diğ., 2002). Deterjan ürün içeriğindeki enzimler, nişasta, protein, yağ ve yağ kaynaklı lekeleri yok etmek ve deterjanların etkinliğini arttırmak amacıyla kullanılır (Hasan ve diğ., 2010; Kirk ve diğ., 2002). Proteazlar yumurta, çimen, kan ve insan teri gibi organik lekelerin giderilmesinde etkilidirler (Hasan ve diğ., 2010; Kuhad ve diğ., 2011). Proteaz ve amilaz, özellikle bulaşık makinesinde kullanılan deterjanlarda, protein ve karbonhidrat içeren gıda kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla kullanılır (Keshwani ve diğ., 2015).

Atık yönetiminde enzim kullanımı geniş alana sahiptir. Evsel atıklar, endüstriyel atıkların yanı sıra, canlılar ve ekosistem için tehlikeli ya da toksik çok sayıda kimyasal ürün barındırır. Mikrobiyal enzimler, tek başlarına ya da başka enzimlerle birlikte, zehirli kimyasal bileşiklerin zararsız ürünlere dönüştürülmesinde ya da aromatik aminler, nitriller, fenoller gibi endüstriyel atık sularının arıtılmasında kullanılmaktadır (Klibanov ve diğ., 1982; Pandey ve diğ., 2011; Raj ve diğ., 2006; Rubilar ve diğ., 2008). Oksidoredüktazlar, toksik organik maddelerin oksidatif bağlanma yoluyla detoksifikasyonuna yardımcı olmaktadır (Karigar ve Rao, 2011). Endüstriyel atıklardan olan klorlu fenolik bileşiklerin arıtılmasını sağlayan enzimler, lakkaz, tirozinaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz'dır (Gianfreda ve diğ., 1999; Have

ve Teunissen, 2001; Le Roes-Hill ve Prins, 2016; Mai ve diğ., 2000; Piontek ve diğ., 2001).

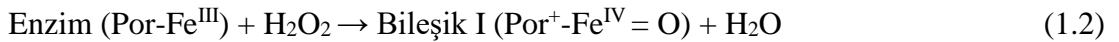
Mikrobiyal enzimler, atıkları tekrar kullanım için geri dönüşüme uğratmak, nişastayı şekere çevirmek, peynir altı suyunu çeşitli yararlı ürünlere dönüştürmek amacıyla da kullanılır (Kalia ve diğ., 2001). Ayrıca, herbisitler, mantar öldürücüler, böcek öldürücüler gibi kirletici maddeler barındıran halojenli organik bileşiklerin parçalanması için kimyasal sentez amacıyla kullanılır (Fetzner ve Lingens, 1994; Karigar ve Rao, 2011).

1.2. Katalazlar

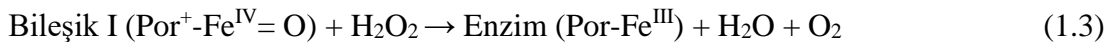
Katalazlar (E.C. 1.11.1.6), enzim grupları içerisinde üzerinde en çok çalışılanlardan biridir. Hücredeki aşırı hidrojen peroksidin (H_2O_2) moleküler oksijene ve suya çözülmesiyle (Denklem 1.1) hücrede antioksidan etkilerini gösterirler (Chelikani ve diğ., 2004).



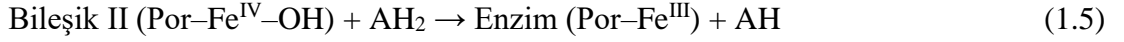
Katalazlar tarafından hidrojen peroksidin çözülmesi iki basamak şeklinde gerçekleştirilir (Chelikani ve diğ., 2004). İlk basamakta bir hidrojen peroksit enzimdeki “Hem” (haem, heme) grubunu (ferrik enzimi) oksiferril formuna (Bileşik I, Cpd I) çevirir (Denklem 1.2).



İkinci basamakta ise diğer bir hidrojen peroksit molekülü, ilk basamakta açığa çıkan bileşiği tekrar indirgeyip enzimin orijinal formuna çevrilmesi ve su ile oksijenin meydana gelmesinde görev alır (Denklem 1.3) (Nicholls ve diğ., 2001).



Katalazların bazıları (katalaz-peroksidazlar), çoğunlukla ikinci bir aktivite olarak ortamda uygun organik bileşik mevcut olduğunda peroksidaz fonksiyonu da (düşük molekül ağırlığına sahip alkollerini okside ederek) gösterirler. (Denklem 1.4, 1.5) (Maté ve diğ., 1999).



Katalazlar genellikle; alt ünite büyüklüklerine, sekans gruplarının ve ‘Hem’ gruplarının çeşitliliğine göre

1) Monofonksiyonel Demir/Hem grubu içeren katalazlar

2) Hem grubu içeren katalaz-peroksidazlar

3) Demir/Hem içermeyip Mangan içeren katalazlar

şeklinde içerisinde üç grup barındırır (Switala ve Loewen, 2002).

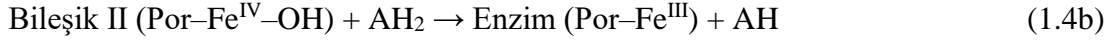
1.2.1 Monofonksiyonel Katalazlar

Monofonksiyonel katalazlar, aktif bölgelerinde “Hem” grubu içeren, diğer katalaz grupları içerisinde en çok çalışılan gruptur (Chelikani ve diğ., 2004; Switala ve Loewen, 2002). Tetramerik bir yapısı olan bu katalaz grubu, monomerleri 75-80 kDa ve 55-60 kDa şeklinde iki alt gruba ayrılmaktadır. Monofonksiyonel katalazların monomerlerinin farklı tip ‘Hem’ içermeleri barındırdıkları en önemli farklılıktır. Küçük alt üniteye sahip katalazlar ‘*b*’ tipi “Hem” grubu, büyük alt üniteli katalazlar ‘*d*’ tipi “Hem” grubu içerirler. ‘*b*’ tipi “Hem” grubu içeren küçük alt üniteye sahip katalazlar proteolize ve sıcaklığa karşı dirençli değildirler ancak bu tip enzimlerde bulunan NAD(P)H bağlanma bölgesi enzim inhibisyonunu engeller (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky ve diğ., 2008). ‘*d*’ tipi “Hem” grubu içeren büyük alt üniteye sahip katalazlar ise proteolize ve sıcaklığa karşı direnç gösterirler (Chelikani ve diğ., 2004).

1.2.2. Katalaz-peroksidazlar

Katalaz-peroksidazlar aktif bölgelerinde “Hem” grubu bulunduran bir diğer enzim grubudur. 120-340 kDa arası molekül ağırlığında olabilen homodimer yapılı enzimlerdir. Katalaz-peroksidazlar, sahip olduğu katalitik aktivitenin yanında bir de; hidrojen peroksit yeterli miktarda bulunmadığı zaman peroksidatif aktivite göstermektedir (Denklem 1.4a, 1.4b) (Nicholls ve diğ., 2001).



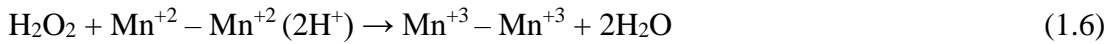


Katalaz-peroksidaz, birçok mikroorganizma yapısında bulunan katG geni tarafından kodlanmaktadır (Chouchane ve diğ., 2000). Bu enzim, düzgün bir katalaz reaksiyonunu destekleyerek hidrojen peroksidi oksijen ve suya çözmek, oldukça geniş substrat yelpazesinde peroksidaz reaksiyonunu desteklemek gibi işlevleri yerine getirmektedir (Machuqueiro ve diğ., 2017). Biri alglerde, biri de mantarlarda olmak üzere iki farklı evrimsel katG gen hattı da ökaryotlarda bulunmaktadır ve bu da yanıl (lateral) gen transferinin olduğunu göstermektedir. (Zamocky ve diğ., 2008).

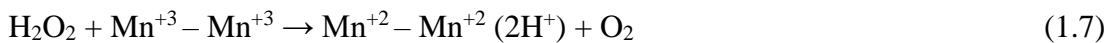
1.2.3. Mn katalazlar

Aktif bölgesinde ‘Hem’ grubu değil ‘Mangan’ barındıran katalazlardır (Mn-Katalazlar, Hem içermeyen katalazlar). İlk zamanlar “Yalancı Katalazlar” olarak isimlendirilen mangan katalazlar sadece bakterilerde bulunmaktadır. *Thermus thermophilus* ve *Lactobacillus plantarum* mangan katalazı barındıran grubun iki farklı temsilcisi olan mikroorganizmalardır. Bunların üç boyutlu yapılarının araştırılması, mangan katalazlarının, her biri 30 kDa molekül ağırlığına sahip altı alt üniteli bir yapıda olduğunu göstermektedir (Zámocký ve Koller, 1999).

Bu katalazların katalitik döngüsü, tipik katalazlardan ve katalaz-peroksidazlardan önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Mangan katalazlar, katalitik döngü esnasında aktif bölgede dimanganez çekirdeğinin indirgenmiş ve yükseltgenmiş durumununun ikisini de barındırmaktadır. $\text{Mn}^{+2}\text{-Mn}^{+2}$ grubunun O-O bağımlı polarize etmesi, suyun açığa çıkmasını sağlamaktadır (Denklem 1.6).



Elektron transferi yardımıyla H_2O_2 oksidasyonu ve moleküler oksijenin serbest duruma geçmesi sağlanmaktadır (Denklem 1.7).



Mangan katalazların meydana getirdikleri indirgenme ve yükseltgenme tepkime aşamalarında bir düzen bulunmamaktadır. Oksidasyon durumundaki değişimin, oksijenlerin arasında yer alan bağımlı protonasyonundan veya deprotonasyonundan

kaynaklı olduğu düşünölmektedir. Protonasyon, indirgenmiş $Mn^{+2} - Mn^{+2}$ durumu [Denklem (1.6)] için geçerlidir. İki Mn^{+2} iyonu arasında gözlenen sert bir düşüş ile bu durum paralellik göstermektedir. “Hem” grubu içeren katalazlardan farklı olarak, reaktif ara madde meydana gelmemekte ve bir reaksiyonda iki su molekülü açığa çıkmaktadır. Hidrojen peroksidi dönüşüme uğratma oranları, tipik katalaz ve katalaz-peroksidazlara oranla daha az seviyededir; bu da, mangan katalazın neden doğada yaygın olmadığını kanıtlar niteliktedir (Zamocky ve diğ., 2008).

1.3. Katalazların Kullanım Alanları

Katalaz enzimi; başlıca gıda, farmasötik, tekstil, kağıt endüstrileri ve ayrıca immobilizasyon, enzimatik polimerizasyon ve detoksifikasyon sistemleri gibi çeşitli alanlarda da kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015).

Hidrojen peroksit güçlü bir oksitleyicidir ve hücrelere karşı toksik etkiye sahiptir. Pastörizasyon yerine, belirli peynirleri üretirken son ürüne faydalı olan doğal süt enzimlerini korumak amacıyla kullanılır. Bu enzimler 140°C'ye kadar çıkabilen yüksek pastörizasyon ısısı ile yok edilebilir. Bu işleme soğuk pastörizasyon denir. Soğuk pastörizasyon için hidrojen peroksit kullanılabilir ve FDA'nın (Food and Drug Administration) izin verdiği biçimde peynir sütünün üretiminde kullanılır. Sütteki hidrojen peroksit kalıntıları, peynir üretim sürecinde gerekli olan bakteri kültürlerini engelleyebilir, bu sebeple tüm hidrojen peroksit kalıntılarının uzaklaştırılması gerekir. Katalaz enzimi genel olarak mikrobiyolojik kaynaklardan veya sığır karaciğerlerinden elde edilir. Katalaz enzimi, soğuk pastörizasyon işleminden sonra sütte bulunan reaktif oksijen türlerinden, yani hidrojen peroksitten kurtulmak amacıyla kullanılır. Katalaz enzim kullanımı, peynir üretimi sırasında süt numunelerindeki fazla hidrojen peroksitten kurtulmanın çevre dostu ve çok düşük maliyetli bir yöntem olduğunu kanıtlar niteliktedir (Kaushal ve diğ., 2018).

Tekstil ürünlerine çoğunlukla boyama işlemi öncesinde hidrojen peroksit ile ağartma işlemi yapılır. 1980'lerden beri, katalazlarla enzimatik ağartıcı temizliği endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır. Açık renklere tekstil üretimi amacıyla kullanılan iplikler ve örme kumaşlar ağartılmalıdır, ancak bu işlem koyu gölgeli tekstil üretimi için gerekli değildir. Tüm tekstil ürünlerine maksimum hidrofiliği sağlamak amacıyla temizleme ve ağartma işlemleri uygulanır, böylece son kullanıcının isteklerine uygun

boyalar seçilebilir. Ağartma maddelerinin ortamdan uzaklaştırılması, boyama işlemine etki etmemeleri için yapılmaktadır. Bu işlem genel olarak sıcak suyla yoğun bir biçimde yıkanarak yapılır, fakat enzimlerin kullanımı su tüketimini büyük oranda azaltır. Katalaz enziminin kullanımı, tekstilin ağartılması ve boyanması arasında yer alan durulama aşamasının ortadan kaldırılması avantajını sağlar, çünkü peroksit yan ürünler olmadan ayrışmakta ve böylece enzimin tekstil elyafları ya da boyarmadde üzerinde etkisi kalmamaktadır (Blackburn, 2009).

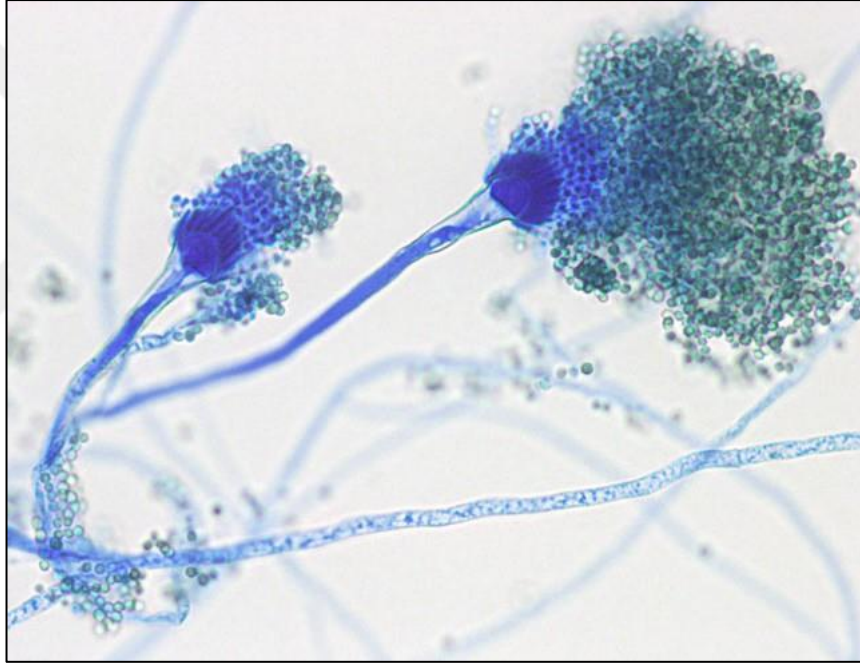
Reaktif oksijen türlerinin (ROS), zatürree üzerine akciğer hasarının uyarılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Rekombinant insan katalazının uygulanmasının ardından akciğer dokusunda akut oksidatif hasarın azaldığı belirlenmiştir (Shi ve diğ., 2010). İyonik olmayan şeker esteri nanovesikülleri, biyolojik açıdan uyumlu bir materyal olarak katalazın kapsüllenmesi amacıyla kullanılır. Bu kapsülleme işlemi, katalazı asidik pH'da daha stabil duruma getirir ve katalazı tripsin sindirimine karşı korur. Katalazın bu şekilde formüle edilmesi, daha hızlı yara iyileşmesini hedefleyen topikal uygulama açısından önemlidir ve sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* bir çalışma ile kanıtlanmıştır (Abdel-Mageed ve diğ., 2012).

Biyosensör alanı, enzim seçiminin ve birçok sentetik yarı iletken malzemenin fazla sayıda imkanlar sağladığı, enzim uygulama alanları içinde en gelişmiş olanlarından biridir. Enzim kaynaklı biyosensörlerin ortak ilkesi bir redoks enziminin kullanılması ve bir sinyal üretmek amacıyla ilgili substratların transformasyonudur. Katalaz bazlı biyosensörlerle ilgili literatürde birçok örnek bulunmaktadır (Shamsipur ve diğ., 2012). Literatürde, hidrojen peroksidin tespiti için birkaç katalaz bazlı biyosensör tanımlanmıştır ve genel olarak katalaz immobilize edilmiş ve Clark tipi bir oksijen elektrotu ile temas halindedir. Kullanılan enzimin yapısına ve seçimine bağlı olarak, farklı duyarlılıklar tespit edilmiştir. Örneğin, bozulmuş süt, artan bir hidrojen peroksit içeriği ile tespit edilebilir. Böyle bir hidrojen peroksit seviyesi biyosensörler kullanılarak ölçülebilir. İnce tabaka enzim hücresinin yüzeyinde katalaz immobilize edilir ve akış enjeksiyon analiz tekniği ile kullanılır (Fütő ve diğ., 2012).

Katalaz enzimi, bilhassa *Aspergillus niger* ve *Micrococcus lysodeikticus* organizmalarından faydalanılarak çeşitli firmalar tarafından ticari olarak temin edilmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013).

1.4. *Aspergillus* sp.

Aspergillus cinsi mantarlar yeryüzünün her alanında bulunurlar ve saprofitlerdir. *Aspergillus*, hif olarak isimlendirilen hücre zincirlerinden meydana gelen ipliksi mantar türlerini kapsamaktadır (Şekil 1.1.). Atmosfere yayılan konidyumlar (sporlar) havada asılı kalabilir, toz ve başka diğer parçacıklarla her yere taşınabilirler. Bu mantarlar havada en yüksek yoğunlukta bulunanlardan biridir. Neredeyse bütün organik maddelerin bütünlüğünün bozulmasını sağlayacak enzim sistemlerine sahiptirler. Oldukça düşük nem'e sahip yerlerde dahi yaşayabildikleri için eşya yüzeylerinde, gıdalarda, ev ve kamu kullanımına açık alanlarda oldukça çok miktarda bulunmaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).



Şekil 1.1. *Aspergillus fumigatus* mantarı (URL-1)

Aspergillus cinsi mantarlar ekolojik, ekonomik ve tıbbi açıdan önemlidirler (Asan, 2004). *Aspergillus* cinsi yaklaşık olarak 200 tür içermektedir. *Aspergillus*'lar insan ve bitki patojenleri olarak toplum sağlığı üzerinde kötü etkiye sahipken çeşitli endüstri uygulama alanlarında da olumlu etkiye sahiptir (Dagenais ve Keller, 2009). Farklı türleri kullanılarak elde edilen katalaz, laktaz, pektinaz, selülaz, lipaz ve proteaz gibi birçok enzim bulunmakta ve gıda sanayisinde farklı amaçlar için kullanılmaktadırlar (Temiz, 1989).

Sahip oldukları enzimler dolayısıyla ilaç ve gıda endüstrisinde *Aspergillus* türlerinin bazılarında yararlanılmaktadır. Örneğin, *A. oryzae*, soya fasulyesini soya sosuna fermantasyonunda, *A. niger*, amilaz, proteaz, sitrik asit, fitaz ve pektinaz'ın endüstriyel üretimi için; *A. terreus*, kolesterol düşürücü ilaç üretimi amacıyla kullanılmaktadır (Dagenais ve Keller, 2009).

Aspergillus cinsi mantarlar üreme koşullarının uygun olduğu ortamlarda, insan, hayvan veya bitkilerde patojen hale gelmekte ve 'Aspergillosis' denilen solunum sistemi hastalığına sebep olmaktadır. Hızlı üreme kapasitesine sahiptirler. İnsanların gün içerisinde solunum yoluyla en az birkaç yüz konidyum aldıkları belirlenmiştir. Bağışıklık sistemi güçlü olan insanlarda bu konidyumların zararsız hale getirildiği bilinmektedir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). İnvaziv aspergillosis (IA), immün sistemi baskılanmış hastaları hedef alan *Aspergillus* ile bağlantılı hastalıkların en tehlikelidir (Dagenais ve Keller, 2009).

Alerjiden bağımsız olarak *Aspergillus*'ların, kemik iliği nakli yapılmış hastalarda, kanser hastalarında, AIDS teşhisi koyulmuş hastalarda ve diğer vücut direnci güçsüz insanlarda invaziv mantar sinüzitlerine yol açtığı bulgular bulunmaktadır. Gözde kornea infeksiyonları, deri hastalıkları ve sindirim sistemi bakımından hasta olan kişilerde görülen infeksiyonlar da diğer aspergillosis tipleri olarak ele alınmaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Hayvanlarda aspergillosis'e neden olan *A. fumigatus*'un bilinen bir bağışıklık sistemi problemi bulunmasa da insanda patojen etki yarattığı elde edilmiştir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). İnsanlarda alerjik bronkopulmoner aspergillosis, aspergilloma ve invaziv aspergillosis gibi çeşitli solunum yolu hastalıklarına neden olmaktadır (Paris ve diğ., 2003).

A. fumigatus, *Aspergillus*'un insanda hastalık yapıcı türleri arasında birincil türüdür, diğerleri ise *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, ve *A. nidulans* şeklindedir (Dagenais ve Keller, 2009).

A. fumigatus'un enfeksiyona yol açtığı yaklaşık 50 yıl önce belirlenmiştir. İmmün sistemi baskılanmış hastaların neredeyse %50'sine invaziv aspergillosis teşhisi koyulmaktadır. Gerekli tedavi sonucunda dahi hastaların ölüm oranının çoğunlukla

%50 olduğu bilinmektedir. *A. fumigatus*'un 1800'lü yılların sonlarından beri solunum yollarının, akciğerlerin, sinüslerin, hasar görmüş cildin ve deri altı dokularının bir numaralı patojeni olduğu tespit edilmiştir. Ameliyat sonrası insan organlarında enfeksiyon hastalıklarına yol açabilir. Bu durum tıbbi tedavinin etkili bir biçimde gerçekleşmesini engeller (Fedorova ve diğ., 2008).

ABD'de 1980-1990 yıllarında, immün sistemi baskılanmış hastalarda aspergillosis bağlı ölümlerin sayısında dört kat artış olduğu otopsi raporları sonucu elde edilmiştir. Çok merkezli Avrupa kayıtlarına bakıldığında akut lösemili hasta kayıtlarında invaziv aspergillosis'in yaklaşık olarak %5 oranında olduğu tespit edilmiştir (Brahm, 2009).

Hastalık yapıcı türleri diğer türlerden ayırt etmek için sıcaklıkta büyüme oranları kullanılabilir; çünkü bazı *Aspergillus* türleri 37°C'de gelişme göstermekte bazıları ise bu özelliğe sahip olamamaktadır. Hastalık geliştirme ve patojenite'nin mantarların büyüme oranlarıyla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Besiyerinin uygun olmasıyla bağlantılı olarak en hızlı büyüme oranına sahip tür *A. fumigatus* 37°C'de 5-12 saatte çimlenme göstermektedir. *İn vitro* gelişim için en iyi sıcaklık ve nem'e sahip ortamda konidyumlar ilk hacimden neredeyse 48 katı büyümüş duruma gelirler (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

2. MALZEME VE YÖNTEMLER

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kimyasallar

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

2.1.2. Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan *A. fumigatus* IMI 385708, Prof. Dr. Zümrüt B. ÖGEL (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi) tarafından laboratuvarımıza hediye edilmiştir.

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar Ek-B'de verilmektedir.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Kültür hazırlanması

A. fumigatus'a ait spor süspansiyonlarını hazırlamak için örnek PDA'da (Patates Dekstroz Agar) 7 gün boyunca 30°C sıcaklıkta büyütüldü. Agar üzerinde gelişim gösteren sporlar 30 mL'lik steril %0,01 (h/h) Tween 80 bulunduran çözelti içine aktarılarak spor sayımı Petroff-Hausser Lamı ile gerçekleştirildi (Garay-Flores ve diğ., 2014). Spor süspansiyonları steril Tween 80 barındıran çözelti yardımıyla mL'sinde 1 milyon spor bulunduracak biçimde seyreltildi ardından %80 (h/h) gliserol eklenip -80°C'de muhafaza edildi. *A. fumigatus*'un büyütülme işlemleri için küfe ait 100 µL'lik spor süspansiyonu (10^6 spor/mL), öncü büyüme ortamı olan 20 mL'lik besiyerinde canlandırıldı. 24 saat sonra ön kültür 2000 mL'lik erlenlerin içinde hazırlanan 1000 mL'lik besiyerine aktarıldı ve 155 rpm'de 10 gün süresince inkübasyona bırakıldı (Söyler, 2012).

2.2.2. *Aspergillus fumigatus*'tan optimum enzim üretimi

Katalaz üretimini optimize etmek için ısı şoku ve oksidatif stres uygulamaları gerçekleştirildi. Kültürler 30, 37, 42, 45, 50 ve 55 °C sıcaklıklarında ısı şoku meydana getirmek için büyütüldü (Chang, 2004; Tsai ve diğ., 2004).

Oksidatif stres'in meydana getirilmesi ise iki şekilde gerçekleştirildi. İlk işlemde ön kültürün transfer edildiği ana büyüme ortamına 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında H₂O₂, katalaz aktivitesinin optimum ortaya çıktığı günde (7. gün) 30 dakikada bir eklenerek 6 saat inkübasyona bırakıldı ve saatte bir örnek alınarak analiz edildi (Kawasaki ve Aguirre, 2001). İkinci işlemde, H₂O₂ konsantrasyonları yukarıda ifade edilen aynı derişimlerde ön kültürün transfer edildiği ana büyüme ortamına ilk gün eklendi ve 7 gün boyunca inkübe edildi.

2.2.3. *A. fumigatus*'dan katalaz enziminin iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılması

A. fumigatus'dan katalaz üretimini gerçekleştirmek amacıyla optimum şartlarda toplanan süpernatant (ortam sıvısı, ham ekstrakt), saflaştırma çalışmalarında kullanıldı. Katalaz enzim saflaştırılmasında geleneksel kromatografi yöntemi uygulandı.

Kromatografik yöntemle saflaştırmada AktaPrime FPLC (GE Healthcare, Amerika) sistemi kullanıldı. Buna göre 20 mL'lik HiPrep 16/10 Q XL kolonuna (anyon değiştirici, GE Healthcare) 1000 mL'lik süpernatant yüklendi. 50 mM Tris-HCl tampon çözelti (pH 8,0) şeklinde kullanıldı ve ayrıca akış hızı 2 mL/dak şeklinde seçildi. Fraksiyon tüplerindeki 3 mL'lik fraksiyonlar 0-1 M NaCl barındıran aynı tampon çözeltisinde toplandı, ardından katalaz aktiviteleri bakımından incelendi. Aktif fraksiyonlar bir gece aynı tampon çözeltiye karşı diyaliz edildi. Ertesi gün konsantre edilerek -80°C'ye muhafaza edilmesi amacıyla koyuldu. Saflaştırılan enzim karakterizasyon işlemlerinde kullanıldı.

2.2.4. Biyokütle tayini

2 X 1000 mL'lik büyüme ortamları biyokütle tayini için hazırlandı, ardından spor süspansiyonu (10⁶ spor/mL) inoküle edildi ve bir gece süresince inkübasyona bırakıldı. 155 rpm ve 37°C'de gerçekleştirilen 10 günlük büyüme periyodunda 24 saatte bir

50'şer mL örnek kültür içerisinde toplanarak hücreler filtrasyon yolu ile Whatman filtre kağıdından (No:1) uzaklaştırıldı.

Filtre kağıdı üzerinde kalan hücreler, distile su yardımıyla yıkandı, ardından kuru ağırlığının tespiti üzerine sabit bir ağırlığa ulaşınca kadar 100°C'de bekletildi ve biyokütle belirlenmesinde kullanıldı (Ögel ve diğ., 2006). Biyokütleden uzaklaştırılan süpernatant (süzülmüş ortam sıvısı), enzim aktivite ve protein miktarı tayinlerinde kullanıldı.

2.2.5. Enzim aktivite tayini

Ham enzim ekstraktı ile iyon değişirme kromatografisi yardımıyla elde edilen örneğin enzim aktivite analizleri spektrofotometre cihazı (Cary 60, Agilent) ile ölçülerek yapıldı. Enzim aktivite tayinlerinde "kontrol" olarak reaksiyon küvetine enzim yerine tampon çözelti eklenerek aktivite tayini yapıldı.

Katalaz aktivitesi (CAT) için reaksiyon sıvısı 10 mM H₂O₂ karışımından 2,9 mL ve enzim örneğinden 0,1 mL (pH 7,0) eklenerek son hacim 3 mL olacak biçimde süpernatandan elde edilen örnekler kullanılarak oluşturuldu. Önce substrat solüsyonunun (100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisinde hazırlanan H₂O₂ (pH 7,0)) 25°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda 1 dak inkübasyonu yapıldı. İnkübasyonun ardından solüsyon reaksiyon küvetine aktarılıp üzerine örnek eklendi. Reaksiyon sıcaklığı 25°C'ye ayarlandıktan sonra cihazın absorbans değeri hidrojen peroksidin kaybolma hızı olan 240 nm'ye ayarlandı ve ölçüm gerçekleştirildi. Başlangıç reaksiyon hızı ve hidrojen peroksidin kaybolma katsayı değeri (39,4 M⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak enzim aktivitesi belirlendi (Merle ve diğ., 2007). 1 ünite enzim aktivitesi, 1 µmol H₂O₂'nin 1 dakikada ayrışmasını katalizleyen enzime denk gelmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013).

Peroksidaz aktivitesi (POD), pirogallol oksidasyon yöntemi kullanılarak 2,4 mL 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) barındıran bir reaksiyon sıvısında belirlendi. Aktivite tayinlerinde 100 µL uygun biçimde seyreltilmiş enzim örneği, 300 µL %5,3 (a/h) pirogallol ve 200 µL %0,6 (a/a) H₂O₂ barındıran karışım kullanıldı. 90 saniyede 420 nm'de absorbanstaki yükseliş belirlendi. Enzim aktivitesi pirogallol birimleri

cinsinden tanımlanmaktadır (Valetti ve Picó, 2013). Bir birim enzim aktivitesi 20 s başına 1 mg purpurogallin oluşumuna denk gelmektedir.

Fenol oksidaz aktivitesi (PO), 0,1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içinde hazırlanmış 100 mM katekol çözeltisinden 0,5 mL, tampon çözeltisinden 1 mL, süpernatandan 0,5 mL ilave edilerek 2 mL'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. 25°C'de gerçekleşen reaksiyon sırasındaki katekol oksidasyon ürününün ortama enzim aktarıldıktan sonraki 420 nm'de absorbans değişimi ölçüldü. Enzim aktivite değeri başlangıç reaksiyon hızı ve katekolün okside olma katsayısı olan $3450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ değerinin kullanılmasıyla belirlendi (Ögel ve diğ., 2006). 1 ünite enzim aktivitesi, 1 nanomol katekolü 1 dakikada okside edebilen enzime denk gelmektedir.

2.2.6. Protein miktar tayini

Bradford metodu kullanılarak ham enzim ekstraktının ve saflaştırılmış örneklerin protein miktarları belirlendi. Yöntemde, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının vermiş olduğu absorbans değerine (595 nm) bakılmaktadır. BSA (Sığır Serum Albumin), standart protein olarak kullanılır. 1500 µL Bradford boyası üzerine 100 µL BSA solüsyonu eklendi (0,1 mg/mL –1,5 mg/mL) ve sıralı dilüsyonlar gerçekleştirildi. 10 dak süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı, ardından 595 nm'de absorbans değeri ölçüldü. Sonrasında absorbans değerleri ile standart protein grafiği meydana getirildi. Örneklerin protein miktarı tayinleri bu grafik kullanılarak hesaplandı (EK-C).

2.2.7. Elektroforez

İyon değiştirme kromatografisi ile elde edilen enzimin saflığının kontrolü Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile belirlendi. Elektroforez; %5 (h/h) yükleme jeli (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], %5 h/h Akrilamid/Bisakrilamid, %0,1 a/h SDS, APS ve TEMED) ve %15 (h/h) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], %15 h/h Akrilamid/Bisakrilamid, %0,1 a/h SDS, APS ve TEMED) hazırlanarak (Laemmli, 1970) Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler indirgeme ajanı (β -merkaptoetanol) barındıran yükleme tampon ile 90°C su banyosunda 10 dak süreyle kaynatılarak denatüre edildi. Protein markör'ü olarak, molekül ağırlıklarının tayin edilmesinde BioRad Low Range (14,4 –

97,4 kDa) kullanıldı. Örnekler, 50 dak 200 V'da yürütülerek elektroforez gerçekleştirildi ve jeller Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası yardımıyla boyandı. Örnekler boyandıktan sonra, boyayı jelden temizlemek için Destain solüsyonu (EK-B) kullanıldı. Moleküler ağırlık tayininde kullanılan grafik EK-D'de verildi.

2.2.8. A. *fumigatus*'dan saflaştırılan katalaz enziminin karakterizasyonu

2.2.8.1 Katalaz enzimi için optimum sıcaklık değerinin ve termal kararlılığının belirlenmesi

Reaksiyon sıcaklığının enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 30°C-70°C arası sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapıldı. Reaksiyon sıcaklık değerleri ve enzim aktivitesi (% Bağıl Aktivite) arasında çizilen grafik yardımıyla enzimin optimum reaksiyon gösterdiği sıcaklık değeri belirlendi.

Enzimin termal kararlılığının belirlenmesi amacıyla, eşit miktarda protein bulunduran enzim örnekleri 30°C -70°C (30, 40, 50, 60 ve 70°C) arası sıcaklıklarda enzim 60 dak inkübasyona bırakıldıktan sonra standart koşullarda (25°C'de) aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

2.2.8.2. Katalaz enzimi için optimum pH değerinin ve kararlılığının belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemede reaksiyon ortamının pH'sı 4,0 ila 9,0 arasında değişen farklı pH'larda denenerek enzim aktivite ölçümü yapıldı. Farklı pH değerleri için tampon çözeltileri olarak; 100 mM sitrat tampon çözeltisi (pH 4,0 – 5,0 arasındaki reaksiyonlar için), 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 6,0 ila 7,0 için), 100 mM tris tampon çözeltisi (pH 8,0 için) ve 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri (pH 9,0 için) kullanıldı (Hazırlanan tampon çözeltiler EK-B'de verilmiştir). Reaksiyon pH ve enzim aktivite (% Bağıl Aktivite) değerleri arasında çizilen grafik yardımıyla enzimin sahip olduğu optimum pH değeri belirlendi. Ortam pH'sının enzim kararlılığı üzerine etkisini test etmek için ise pH aralığı 4,0 ila 9,0 arasında (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0) hazırlanmış tampon çözeltilerde enzim örnekleri 1 saat inkübasyona bırakılıp katalaz aktivite ölçümleri standart koşullarda (pH 7,0) yapıldı (Kocabas ve diğ, 2008).

2.2.8.3. Enzimin substrat konsantrasyonunun belirlenmesi

Enzimin K_m ile V_{max} değerlerinin belirlenmesi için, 0,1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0, 25°C) 0-300 mM H_2O_2 substrat konsantrasyonları kullanılarak enzim aktivite tayinleri yapıldı (Sutay, 2007). K_m ve V_{max} değerleri $1/S$ ile $1/V$ arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramı ile hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

2.2.8.4. Enzimin substrat özgülüğünün belirlenmesi

A. fumigatus'dan üretilen ve saflaştırılan katalaz enziminde diğer bazı mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal katalazlarda (Chen ve diğ., 2017; Loncar ve Fraaije, 2015; Sangar ve diğ., 2012; Vetrano ve diğ., 2005; Yuzugullu ve diğ., 2013) gözlenen oksidatif/peroksidatif özelliğinin varlığını test etmek amacıyla çeşitli substratlar kullanılarak 4-metil katekol (420 nm), pyrokatekol (420 nm), pirogallol (430 nm), guaiakol (465 nm), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, 420 nm), hidrokinon (440 nm), ve L-tirozin (475 nm) (Ögel ve diğ., 2006; Vetrano ve diğ., 2005) enzim aktivite tayinleri yukarıda fenol oksidaz ve peroksidaz aktiviteleri için belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Bağıl aktivite değerleri belirlendi.

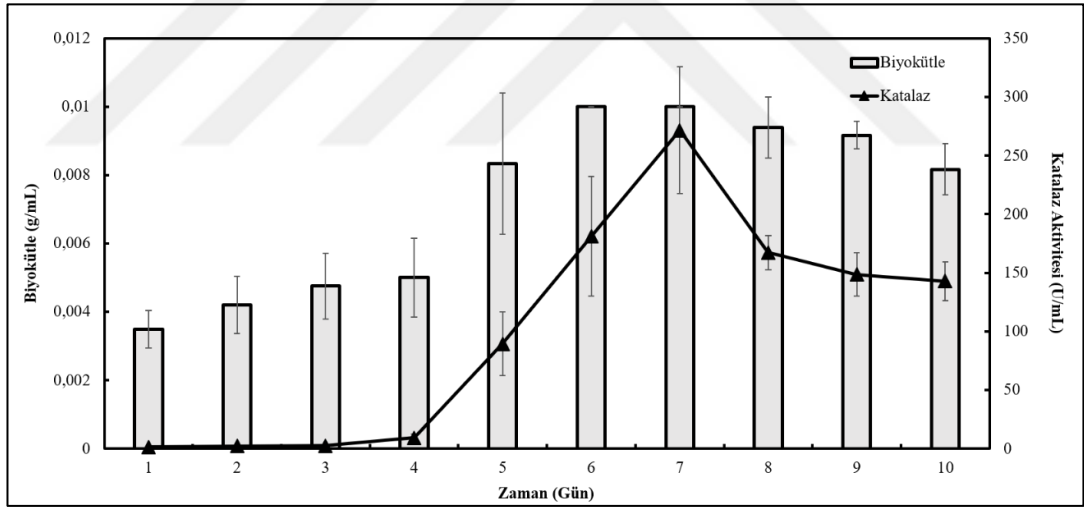
2.2.8.5 Enzim aktivitesine organik çözücülerin etkisinin incelenmesi

Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini tespit etmek için etanol, metanol, aseton ve dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Etanol, metanol, aseton ve DMSO için % 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 ve 25 (h/h) konsantrasyonları denendi (Ögel ve diğ., 2006). Enzim belirtilen konsantrasyonlardaki organik çözücüler içerisinde buz içerisinde 1 saat bekletildi ve her 15 dakikada bir standart aktivite tayini yapıldı ve bağıl aktivite değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *Aspergillus fumigatus*'dan Katalaz Enziminin Üretimi

10 gün süresince % 1 (a/h) glukoz barındıran besi ortamında büyütülen *A. fumigatus*'da meydana gelen hücre dışı katalaz üretimi ve küfe ait biyokütle verileri zamana karşı karşılaştırıldı (Şekil 3.1). *A. fumigatus*'un büyümesi sırasında elde edilen verilere göre ilk iki gün lag fazı oluşmuş ardından logaritmik faz başlamış ve altıncı güne kadar devam etmiştir. Ayrıca küf 6. günde durağan faza girip 7. güne kadar bu fazda kalmıştır. Katalaz enzim üretimi *A. fumigatus*'un durağan fazda olduğu gün (7.gün) optimum değerine ulaşmıştır. Bu da enzim üretiminin sekonder metabolizma sonucu gerçekleşmiş olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.1. *A. fumigatus*'un zamana karşı biyokütle (g/mL) ve katalaz (U/mL) aktivite grafiği

Katalazlar birçok küf ve mantar türünden izole edilmektedir. Üretim için gerçekleştirilen fermentasyon süreleri 3 ila 6 gün arasında değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Septoria tritici*'den ISR398AI (ATCC 48507), Levy ve diğ. tarafından 3 günlük bir inkübasyon sonrasında izole edilmiştir (Levy ve diğ., 1992). Benzer şekilde *Aspergillus niger*, 3 gün büyütülmüştür (Buckova ve diğ., 2005; Fiedurek ve Gromada, 2000). *Penicillium variable* ve *A. phoenicis* ise sırasıyla 80 ve 96 saatlik fermentasyon sonrasında bunlardan optimum katalaz üretimi sağlanmıştır (Kacem-Chaouche ve diğ.,

2005; Petruccioli ve diğ., 1995). Diğ er yandan termofilik bir kü f olan *S. thermophilum* ve nefes darlığı na sebep olan *Alternaria alternata* mantarında fermentasyon süreleri sırasıyla beş ve altı gün olarak belirlenmiştir (Caridis ve diğ ., 1991; Kocabas ve diğ ., 2008; Yuzugullu ve diğ ., 2013). Fermentasyon sürelerindeki bu farklılık mantar türüne bağı lı olabildiğı gibi kullanılan büyü me ortam içeriğı , pH ve sıcaklığı na da bağı lı olabilir (Sooch ve diğ ., 2014).

3.2. Katalaz Üretimini Optimizasyonu

Katalaz enzim üretimini *Aspergillus*'larda ısı şoku veya oksidatif strese bağı lı olarak hücre içerisinde artan H₂O₂ konsantrasyonuna karşı savunma amacıyla arttığı bilinmektedir (Calera ve diğ ., 2000; Kawasaki ve diğ ., 1997; Kawasaki ve Aguirre, 2001; Noventa-Jordao ve diğ ., 1999). Bu sebeple, aynı miktarda spordan canlandırma yapılarak büyütülen *A. fumigatus*'da H₂O₂'nin ve sıcaklığın katalaz enzim üretimine olumlu/olumsuz etkileri araştırıldı.

3.2.1. Sıcaklığın enzim üretimine etkisi

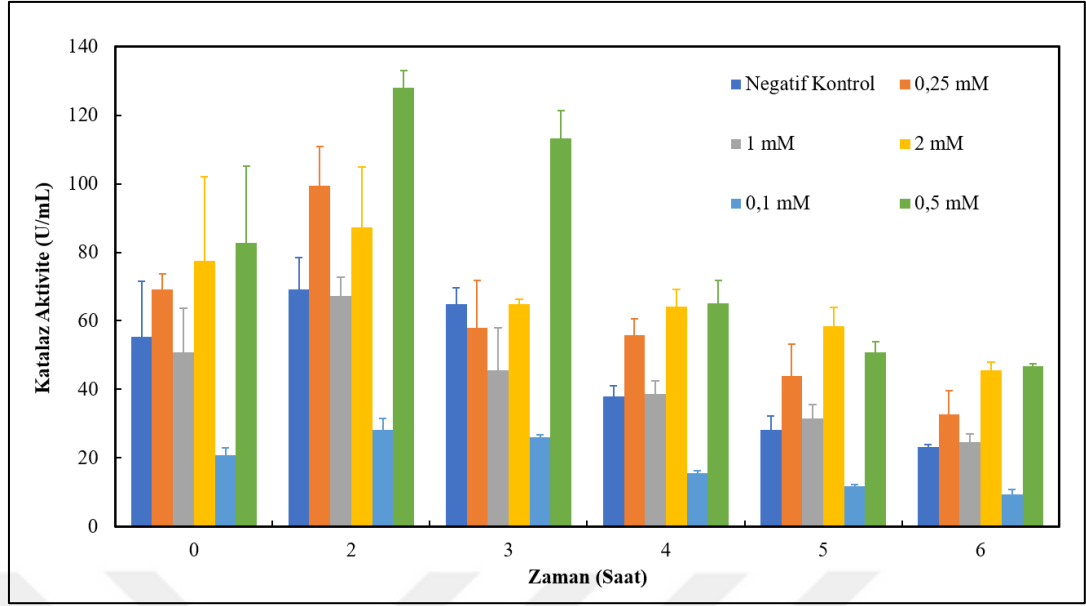
Aspergillus'ların optimum büyü me sıcaklıkları 28-30°C olup (Sooch ve diğ ., 2014) bazılarında bu sıcaklık değ erinin 55°C'ye kadar çıkabildiğı rapor edilmiştir (Chang ve diğ ., 2004). Bu nedenle, bu çalışmada *A. fumigatus* farklı sıcaklık derecelerinde (30, 37, 42, 45, 50 ve 55°C) büyütüldü ve katalaz aktivitesinin en yüksek gözleendiğı yedinci günde süpernatant alınıp enzim aktivite analizi gerçekleştirildi. Tablo 3.1'de gösterildiğı gibi enzim üretimini optimum olarak görüldüğü sıcaklık 37°C'dir ve enzim üretimi 45°C'nin üzerinde inhibe olmuştur. Buradan ısı şoku uygulamasının çalışmada kullanılan *A. fumigatus* için uygun olmadığı sonucuna varıldı. Diğ er yandan, 37°C'de büyütülen *A. fumigatus*'ta ölçülen aktivite değ eri (213 U/mL), daha düşük sıcaklıklarda büyütülen *Aspergillus* türlerine ait katalaz enzimleri için rapor edilen değ erlerden (59-65 U/mL) (Sooch ve diğ ., 2014) yaklaşık 3 ila 3,6 kat daha yüksektir.

Tablo 3.1. Sıcaklığın katalaz üretimine etkisi
'±' standart hatayı ifade etmektedir.

Sıcaklık (°C)	Katalaz aktivite (U/mL)
30	186±9,6
37	213±9,4
42	23±6,3
45	16±4,4
50	-
55	-

3.2.2. H₂O₂'nin enzim üretimine etkisi

Oksidatif stres yaratmak için gerçekleştirilen basamaklar Bölüm 2.2.2'de detaylı olarak verildi. Buna göre uygulanan ilk yöntemde büyüme ortamına eklenen 0,1 mM ve 1 mM H₂O₂ konsantrasyonlarında negatif kontrole oranla daha düşük seviyede katalaz üretimi gerçekleşti (Şekil 3.2). Diğer H₂O₂ konsantrasyonlarının hepsinde negatif kontrolden daha yüksek aktivite görüldü. Katalaz aktivitesinin en yüksek ölçüldüğü durum 0,5 mM H₂O₂'nin eklendiği ve inkübasyon zamanının yedinci günü ikinci saati olarak bulundu. Benzer şekilde *A. niger* büyüme ortamına 1-2 mM H₂O₂ eklendiğinde katalaz üretiminde artış gözlemlendiği rapor edilmiştir (Fiedurek ve Gromada, 2000).



Şekil 3.2. Farklı hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonlarının katalaz enzim üretimi üzerine etkisi. *A. fumigatus*, karbon kaynağı olarak %1 (a/h) glukoz barındıran 1 litrelik YpSs besi ortamında büyütüldü. H_2O_2 , besi ortamına enzim üretiminin en yüksek görüldüğü yedinci gününde 30'ar dakika arayla eklendi

Oksidatif stres yaratmak amacıyla uygulanan diğer yöntemde ise H_2O_2 eklenmesinin katalaz enzim üretimine etkisinin sadece 0,5 mM H_2O_2 konsantrasyonunda olumlu yönde olduğu görüldü (Tablo 3.2). 0,5 mM H_2O_2 derişiminde diğer konsantrasyonlara ve negatif kontrole göre aktivite değerinin daha yüksek ölçülmesine rağmen bu artışın ilk yöntemde gözlenen artıştan daha düşük değerde olması nedeniyle bu yöntemle katalaz üretiminden vazgeçildi.

Tablo 3.2. Farklı H_2O_2 konsantrasyonlarının katalaz üretimine etkisi '±' standart hatayı ifade etmektedir.

H_2O_2 (mM)	Katalaz aktivite (U/mL)
0	72±6
0,1	53±11
0,25	22±3
0,5	110±6
1	39±1
2	24±4

Elde edilen bulgular doğrultusunda katalaz üretimini arttırmak için oksidatif stres uygulamasının bazı *Aspergillus* türleri (Fiedurek ve Gromada, 2000; Kawasaki ve Aguirre, 2001) için literatürde rapor edilen bulgularla benzer şekilde *A. fumigatus*'da olumlu etki göstermesi nedeniyle hücre dışı ortama peroksit eklenmesi üretim için tercih edildi.

3.3. Katalaz Enziminin Kromatografik Yöntem ile Saflaştırılması

Kromatografi; gıda, tıp, kimya, biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında analizde, izolasyonda ve saflaştırmada yaygın şekilde kullanıma sahip ayırma tekniğidir. Genel olarak sanayide küçük ve büyük ölçekli üretimlerde sürecin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Protein saflaştırma işlemi için yöntemlerin iyileştirilmesi gıda, tıp, biyoloji ve kimya alanlarında meydana getirilen pek çok gelişme için önemli bir koşuldur (Konak ve diğ., 2014).

Katalaz enzimini kromatografik yöntemle saflaştırmak için ham ekstrakt olarak kullanılacak süpernatant anyon değiştirici kolona yüklendi ve elde edilen fraksiyonlar katalaz aktiviteleri açısından incelendi. Saflaştırma işlemlerine ait tüm bulgular Tablo 3.3'te verildi. Buna göre, katalaz enzimi tek basamakla ham ekstraktan %42 geri kazanımla 4 kat saflaştırıldı.

Protein saflaştırma işleminin az aşamada ve kısa zamanda gerçekleştirilmesi, işlemin maliyeti açısından önem arz etmektedir. Ayrıca işlem sırasında ortaya çıkan ürün kayıplarının da en aza inmesini sağlamaktadır (Konak ve diğ., 2014)

Tablo 3.3. Katalaz enziminin saflaştırılma basamakları

	V(mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Enzim geri kazanımı (%)
Ham ekstrakt	24,4	1,34	8161	6	1	100
İyon değiştirme kromatografisi	9	0,12	3395	27	4	42

Farklı kaynaklardan kromatografik yöntemler ile elde edilen katalaz enzimlerine ait benzer veriler literatürde yer almaktadır (Tablo 3.4). Buna göre, bu çalışmada elde edilen enzim geri kazanım değeri *S. thermophilum*'dan saflaştırılan katalaz enzimi için hesaplanan aktivite geri kazanım değeri ile benzerlik göstermektedir. Diğer yandan bu çalışmada bulunan geri kazanım değeri diğer katalaz örnekleri için rapor edilen değerlerden (%8,6-29,9) daha yüksektir. Ayrıca saflaştırmanın tek basamakta gerçekleştirilmesi ile hem zamandan tasarruf edilmiş hem de maliyet düşürülmüş olundu. Buna göre, test edilen bu yöntemin *A. fumigatus* katalazı için uygun olduğu görüldü.

Tablo 3.4. Kromatografik yöntemle saflaştırılan mikroorganizmalar

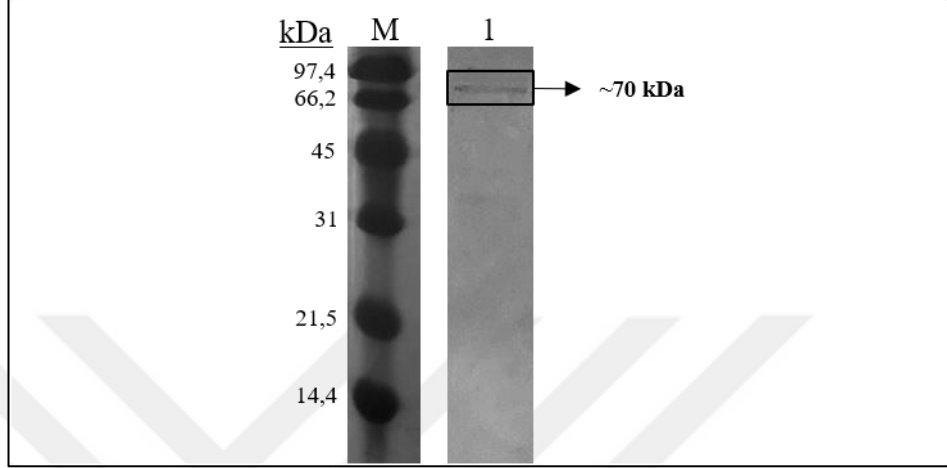
Mikroorganizma	Kromatografik Yöntem	Saflaştırma Katsayısı	Enzim Geri kazanımı (%)	Referans
<i>Scytalidium thermophilum</i>	AEC, GF	10	45	Kocabas ve diğ., 2008
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Ethanol precipitation, DEAE (DE-52), Sep (CL6B)	5,14	29,9	Wang ve diğ., 1998
<i>Serratia marcescens</i> SYBC 08	ASF, IEC, GF	13,8	22	Zeng ve diğ., 2011
<i>Halobacterium halobium</i>	% 15 PEG, HPLC, Seph G-150	12,7	8,6	Brown-Peterson ve Salin, 1993
<i>Streptomyces cyaneus</i>	ASF, Q-Sep, Mono-Q superpose 12, IEF	15,5	9,5	Mliki ve Zimmermann, 1992
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	ASF, Mono-Q1 ve Q2 chromatography	38	22	Walker ve diğ., 1995

*Sep: sepharose; Seph: sephadex; ASF: ammonium sulfate fractionation; GF: gel filtration; DEAE-C: DEAE cellulose; IEC/AEC: ion/anion exchange chromatography; PEG: poly ethylene glycol

3.4. SDS-PAGE Analizi

Kromatografik yöntem ile saflaştırılan enzimin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının tespiti için gerçekleştirilen poliakrilamid jel elektroforezi ile elde edilen protein bantlarına ait görüntü Şekil 3.4.'de gösterildi. SDS-PAGE analizi sonrası örneğe ait yaklaşık 70 kDa (Şekil 3.4) civarında tek bir bant gözlemlendi. Bu bulgu katalaz

enziminin başarılı bir şekilde saflaştığını kanıtlamıştır. Literatürde yer alan *Rhodobacter sphaeroides* (68 kDa) ve *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. (72 kDa) organizmalarından izole edilen katalaz enzimleri de benzer molekül ağırlığına sahiptirler (Terzenbach ve Blaut, 1998; Calandrelli ve diğ., 2008).

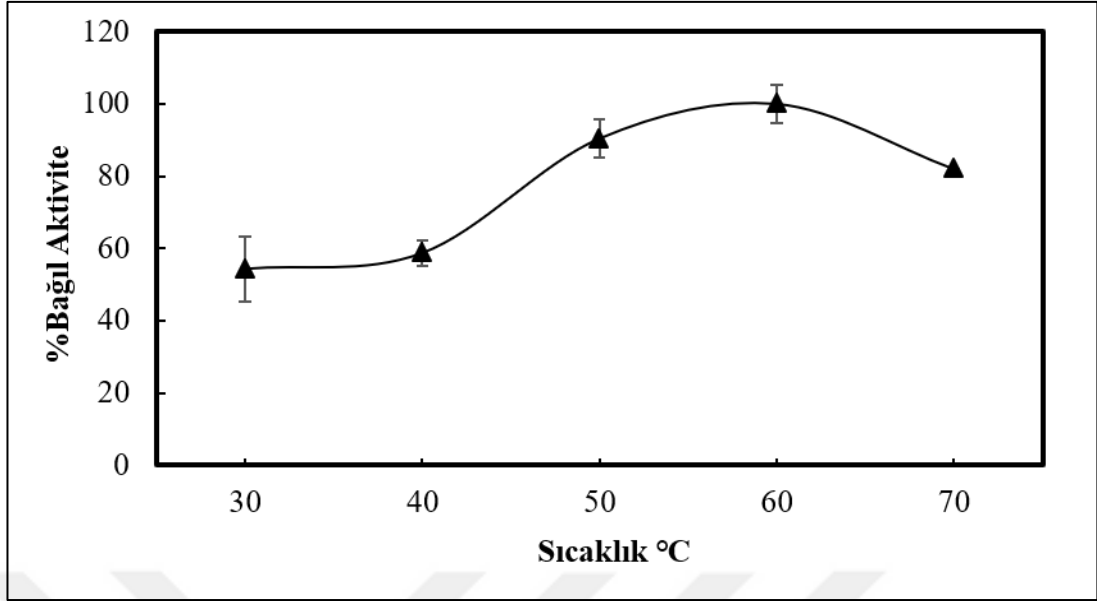


Şekil 3.3. *A. fumigatus*'dan kromatografik yöntem ile saflaştırılan katalaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (marker) (Bio-Rad Unstained SDS-PAGE Standards, Amerika); 1, iyon değiştirme kromatografisi ile sistemden izole edilen katalaz örneği

3.5. Saflaştırılmış *A. fumigatus* Katalazının Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Reaksiyon sıcaklığının katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin tayini için 30°C-70°C arası sıcaklıklarda yapılan aktivite ölçümleri Şekil 3.5.'de verilmiştir. Aktivite ölçümleri sonucu grafikte gösterildiği üzere *A. fumigatus* katalazı için optimum reaksiyon sıcaklığı 60°C olarak bulundu. Bu sıcaklık değerinin üzerinde katalaz enzim aktivitesinin kademeli olarak azaldığı gözlemlendi. Ancak, 70°C sıcaklık değerlerinde aktivitesini 60°C'deki aktiviteye göre %82 oranında koruduğu gözlemlendi. Bu da katalazın 70°C'de dahi büyük oranda aktif olarak işlev görebildiğini gösterir. Çeşitli kaynaklardan (*Bacillus* sp., *Desulfovibrio gigas* ve *S. thermophilum*) elde edilen katalazlar için en yüksek reaksiyon sıcaklık değeri benzer biçimde 60°C olarak literatürde belirtilmiştir (Gudelj ve diğ., 2001; Kocabas ve diğ., 2008; Santos ve diğ., 2000).

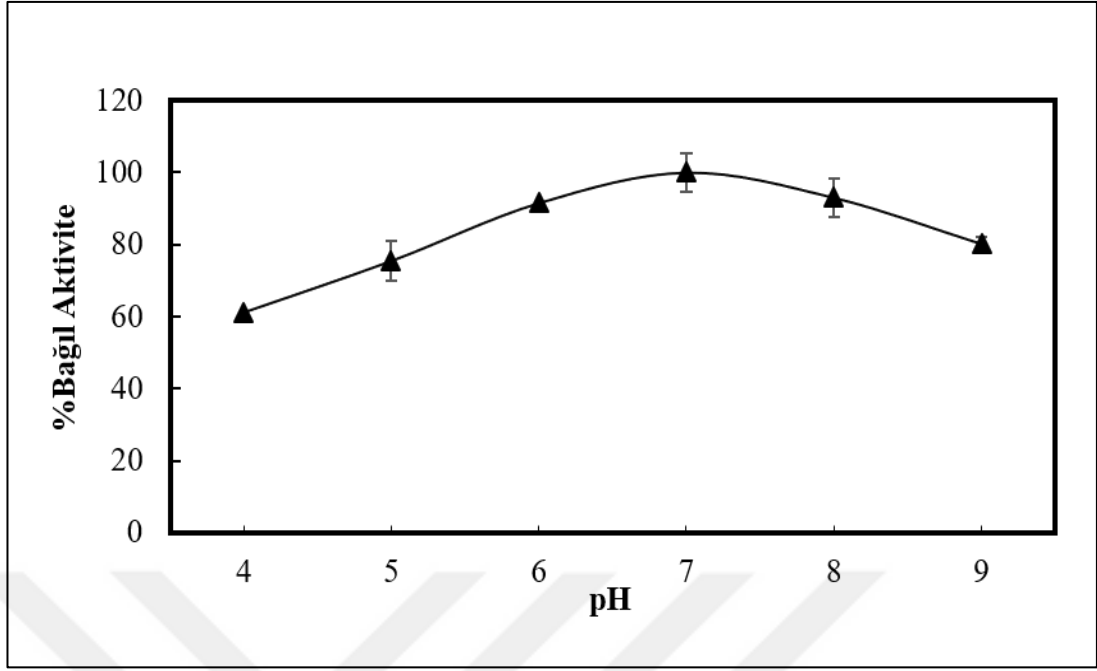


Şekil 3.4. *A. fumigatus* katalazının farklı sıcaklık değerlerindeki bağıl aktivite grafiği

3.5.2. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Farklı pH değer aralıklarındaki reaksiyon ortamlarının katalaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi (Şekil 3.6.). pH 4,0-9,0 aralıklarında yapılan aktivite ölçümlerinden en yüksek reaksiyon pH değeri 7,0 olarak belirlendi. Diğer yandan pH 8,0'da pH 7,0'da ölçülen aktiviteye göre yaklaşık %93'ünün korunduğu, pH 6,0'da ise %91'inin korunduğu gözlenirken pH 8,0'dan sonra aktivitede %20'lik bir düşüş gözlemlendi. pH 6,0'nın altında ise sırasıyla pH 4,0 ve pH 5,0'da, % 39 ve %25'lik aktivite kaybı gözlemlendi.

Asidik koşullarda enzim aktivitesinde gözlenen kayıp yüksek pH'larda gözlenen değerden daha fazladır ve bu da enzimin alkali ortamları tercih ettiğini göstermektedir. Bu şekilde yüksek pH değerlerinde aktivite özelliğine sahip olan bir katalaz enziminin endüstriyel uygulama alanlarında önemli olabileceği düşünülmektedir. Optimum reaksiyon pH değeri literatürde yer alan çeşitli katalazlarla (*Beauveria bassiana*, *Rhodospirillum rubrum* S1 ve *S. thermophilum* katalazları) benzerlik göstermektedir (Kocabas ve diğ., 2008; Pedrini ve diğ., 2006; Kang ve diğ., 2006).

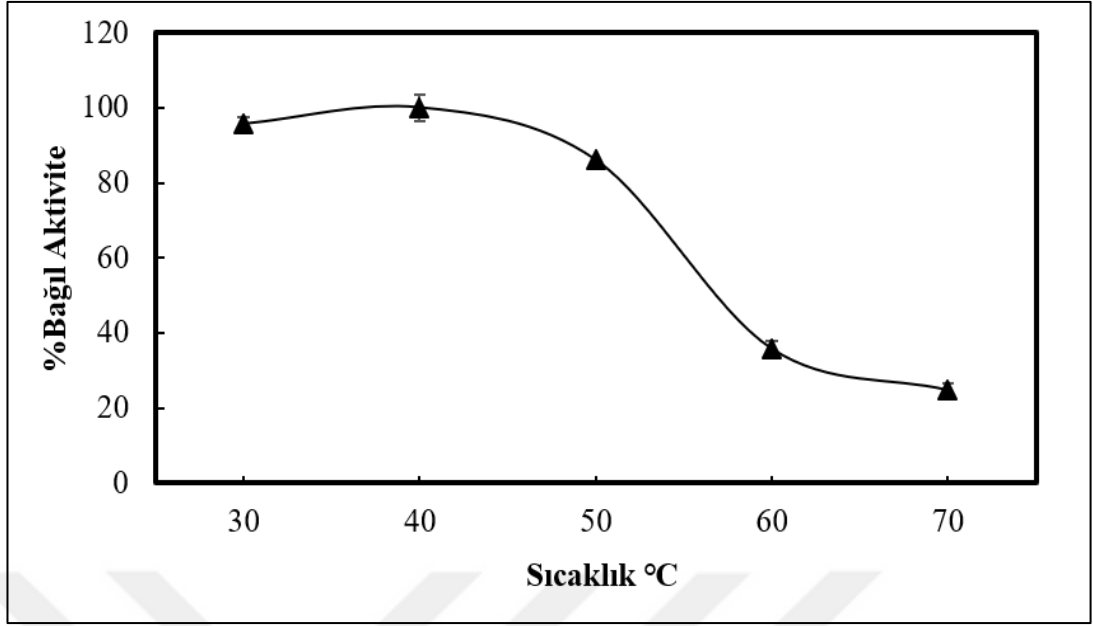


Şekil 3.5. *A. fumigatus*'un katalaz aktivitesine pH'nin etkisi

3.5.3.Katalazın termal kararlılığı

Sıcaklığın enzimin kararlılığına etkisinin tayini için 30°C-70°C arası sıcaklık değerlerinde enzime 60 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra standart koşullarda aktivite ölçümleri yapıldı. Şekil 3.7'de görüldüğü gibi enzimin kararlı kaldığı en yüksek sıcaklık değeri 40°C olarak belirlendi. Bu sıcaklık değerinin üzerinde katalaz aktivitesinde azalma olduğu gözlemlendi. 30°C sıcaklık değerinde ise enzim aktivitesinin 40°C'dekine (optimal sıcaklık değeri) göre %95 oranında, 50°C'de ise %86 oranında korunduğu gözlemlendi.

Enzimin geniş sayılabilecek bir sıcaklık değeri aralığında (30°C-50°C) kararlı bir şekilde kalması endüstriyel uygulamalarda bir avantaj sağlamaktadır. 1 saat inkübasyon süresince sahip olduğu optimum sıcaklık değerine (40°C) örnek olarak literatürde rapor edilmiş *Serratia marcescens* FZSF01 ve *Escherichia coli* katalazı verilebilir (Jia ve diğ., 2017; Nadler ve diğ., 1986).

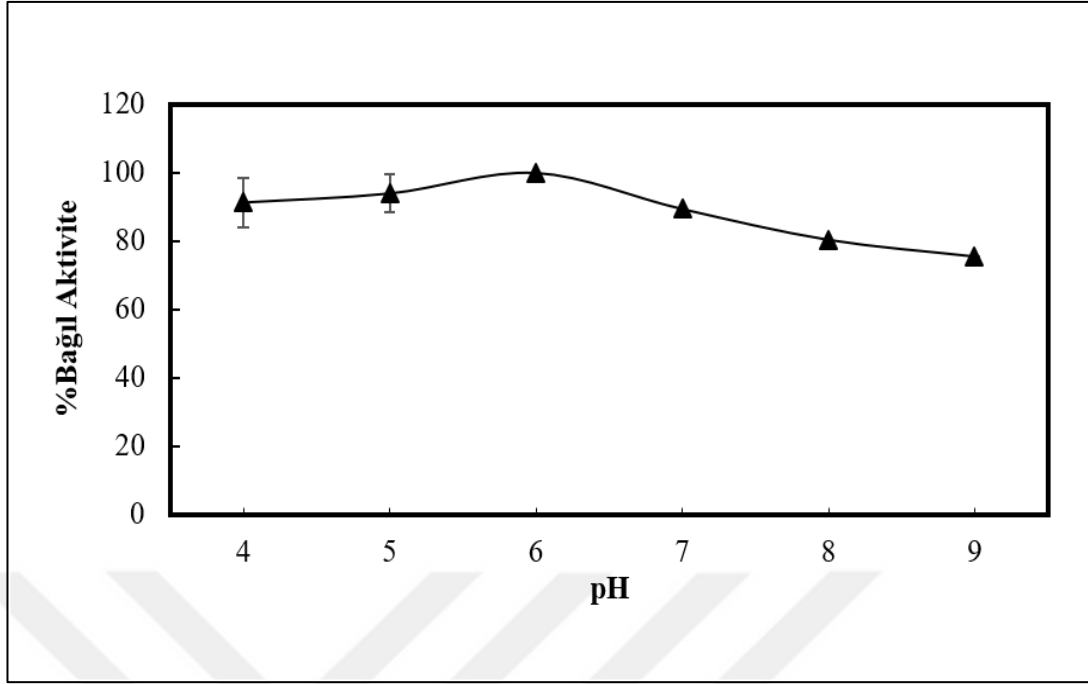


Şekil 3.6. *A. fumigatus* katalazının termal kararlılığı

3.5.4. Katalazın pH kararlılığı

Farklı pH değer aralıklarında (pH 4,0-9,0) enzimin kararlılığının belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.8’de verildi. Enzimin kararlı kaldığı en yüksek pH değeri 6,0 olarak belirlendi. Optimum pH değerinin altında enzim aktivitesinin sırasıyla %93 ve %91’inin korunduğu; pH 6,0’ın üstünde ise aktivitede giderek azalan bir grafik gözlemlendi.

Kararlı olma özelliğinde görülen yüksek pH değerleri (pH 9,0’da aktivitenin %75’i korunmuştur) dikkat çekmektedir. Enzimin farklı pH değerlerinde kararlı özellik göstermesi endüstriyel uygulamalar bakımından önemlidir. Süreçlerin uzun sürmesinden kaynaklı olarak ortam pH’sına uzun zaman maruz kalabilecek bir enzim açısından bu parametre önemlidir (Calandrelli ve diğ., 2008). Örneğin *Thermoascus aurantiacus* katalazı pH 5-13 aralığında stabil kalabilmektedir (Wang ve diğ., 1998). *A. fumigatus* katalazı ile benzer pH aralıklarında stabil kalabilen bir örnek olarak *S. thermophilum* katalazı (pH 5-9) verilebilir (Sutay Kocabas ve diğ., 2008).



Şekil 3.7. *A. fumigatus* katalazının pH kararlılığı

3.5.5. Organik çözücülerin katalaz aktivitesine etkisi

Organik çözücülerin katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi Tablo 3.8’de gösterilmiştir. Organik çözücülerin, proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirme özelliği vardır. Genelde proteindeki kovalent olmayan bağlar, dipoller ve iyonik gruplar, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi özellikleri değiştirirler (Rehan ve Younus, 2006).

Organik çözücülerin eklendiği reaksiyon ortamında sadece %5 (h/h)’lik etanol’de çözen konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak aktivite artışı gerçekleşip daha sonra kademeli olarak azalma gözlemlendi. Diğer organik çözücülerde ise konsantrasyon artışına bağlı olarak aktivitede kademeli olarak azalma görüldü. Etanol eklenen aktivite ortamında %20 (h/h)’lik konsantrasyonunda aktivitenin %55’inin korunduğu gözlemlendi. Metanol, aseton ve DMSO (dimetil sülfoksit) çözenlerinde %10 (h/h)’luk konsantrasyonlarda sırasıyla %55, %48 ve %44 oranında aktivitenin korunduğu belirlendi (Tablo 3.5).

A. fumigatus katalazının organik çözücülere olan dayanıklılığı düşük konsantrasyonlarda Metanol>Etanol>DMSO>Aseton şeklindedir. Enzimin metanole

olan dayanıklılığının endüstriyel uygulamalarda bu çözünenin kullanılmasına olanak vereceği önerilebilir.

Tablo 3.5. Farklı organik çözücülerin *A. fumigatus* katalaz aktivitesi üzerine etkisi. % son konsantrasyonu ifade etmektedir. 'Kontrol' organik çözücü eklemesi yapılmadan önce saf enzimin aktivitesidir

A) Etanol	Bağıl Aktivite (%)			
	Zaman	%2,5	%5	%7,5
Kontrol		100	100	100
15.dak		78	83	81
30.dak		70	73	72
45.dak		68	69	67
60.dak		64	66	64

A) Etanol (Devam)	Bağıl Aktivite (%)			
	Zaman	%10	%15	%20
Kontrol		100	100	100
15.dak		78	71	70
30.dak		70	68	66
45.dak		66	65	64
60.dak		62	57	55

B) Metanol	Bağıl Aktivite (%)				
	Zaman	%2,5	%5	%7,5	%10
Kontrol		100	100	100	100
15.dak		81	80	76	73
30.dak		78	77	72	66
45.dak		76	74	70	62
60.dak		71	70	68	55

Tablo 3.5. (Devam) Farklı organik çözücülerin *A. fumigatus* katalaz aktivitesi üzerine etkisi. % son konsantrasyonu ifade etmektedir. 'Kontrol' organik çözücü eklemesi yapılmadan önce saf enzimin aktivitesidir

C) DMSO		Bağıl Aktivite (%)			
Zaman	%2,5	%5	%7,5	%10	
Kontrol	100	100	100	100	
15.dak	74	72	69	65	
30.dak	72	70	65	61	
45.dak	67	65	60	54	
60.dak	63	61	53	44	

D) Aseton		Bağıl Aktivite (%)			
Zaman	%2,5	%5	%7,5	%10	
Kontrol	100	100	100	100	
15.dak	69	68	57	54	
30.dak	66	65	55	51	
45.dak	63	61	53	50	
60.dak	61	58	50	48	

3.5.6.Farklı substratların katalaz aktivitesine etkisi

A. fumigatus katalazında diğer başka katalazlarda olduğu gibi peroksitten bağımsız olarak ikincil aktivitenin (Chen ve diğ., 2017; Lončar ve Fraaije, 2015; Sangar ve diğ., 2012; Kocabas ve diğ., 2008; Teng ve diğ., 2016; Vetrano ve diğ., 2005; Yuzugullu ve diğ., 2013) varlığının tespiti amacıyla farklı oksidaz ve peroksidaz substratlarına karşı aktivite analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Tablo 3.9'da gösterildi. *A. fumigatus* katalazının hidrojen peroksidin olmadığı ortamda 4-metil katekol ve pyrokatekolü okside edebildiği belirlendi. Diğer yandan, pirogallol, guaiakol, ABTS, hidrokinon ve L-tirozin üzerinde herhangi bir etki görülmedi. Bu durum *A. fumigatus* katalazının özellikle *orto*-difenolik bileşiklere karşı etkili olduğuna işaret etmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013). Buna göre *A. fumigatus*'dan izole edilen katalaz enziminin polifenol oksidaz (substrat ilgisi: 4-metil katekol>pyrokatekol) aktivitesi gösterdiği tespit edildi. *A. fumigatus* katalazının ikincil aktivite özelliğinin endüstriyel uygulamalarda önemli rol oynayacağı muhtemeldir. Ayrıca *Scytalidium thermophilum*

(Yuzugullu ve diğ., 2013), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015), *Bacillus pumilus* (Sangar ve diğ., 2012) gibi çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen katalazlarda da ikincil aktivitenin varlığı tespit edilmiştir.

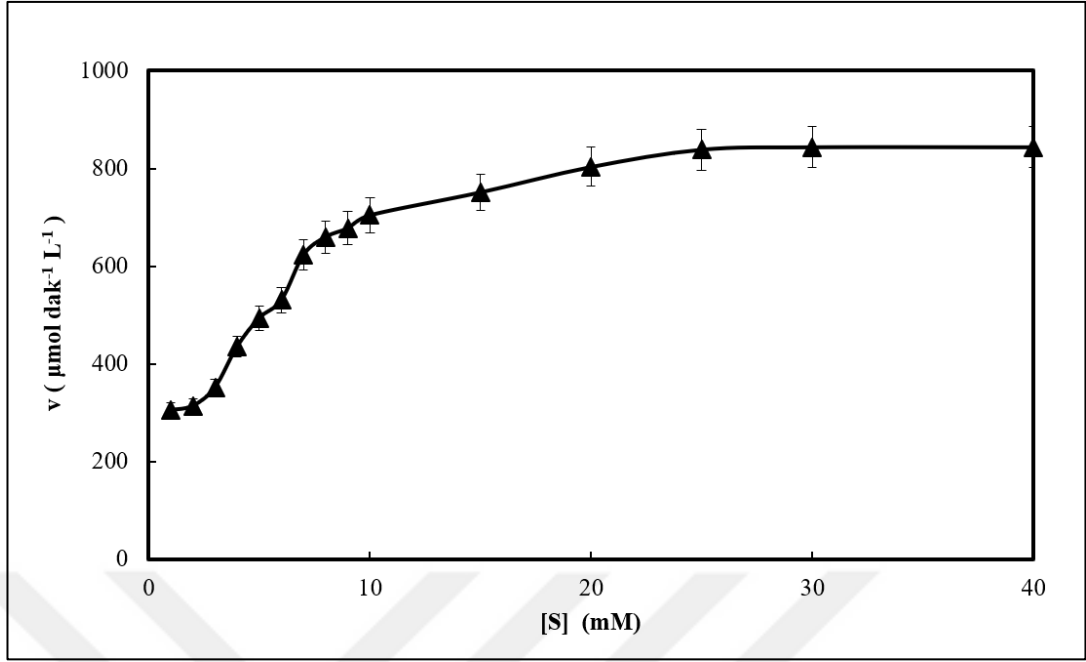
Tablo 3.6. *A. fumigatus* katalazının farklı oksidatif/peroksidatif substratlarına ilgisi ve *T. versicolor* lakkazı ile turp peroksidazıyla karşılaştırılması

Substrat (mM*)	Oksidatif/Peroksidatif aktivite (nmol/mL/dak)		
	<i>A. fumigatus</i> katalazı	<i>T. versicolor</i> lakkazı	Turp peroksidazı
4-Metil Katekol (100 mM)	100	3,4	-
Pyrokatekol (100 mM)	18,5	0,02	-
Pirogallol (285 mM)	-	-	100
Guaicol (2 mM)	-	28,4	-
Guaicol (5 mM)	-	41,5	-
ABTS (5 mM)	-	100	-
Hidrokinon (100 mM)	-	-	-
L-Tirozin (5 mM)	-	-	-

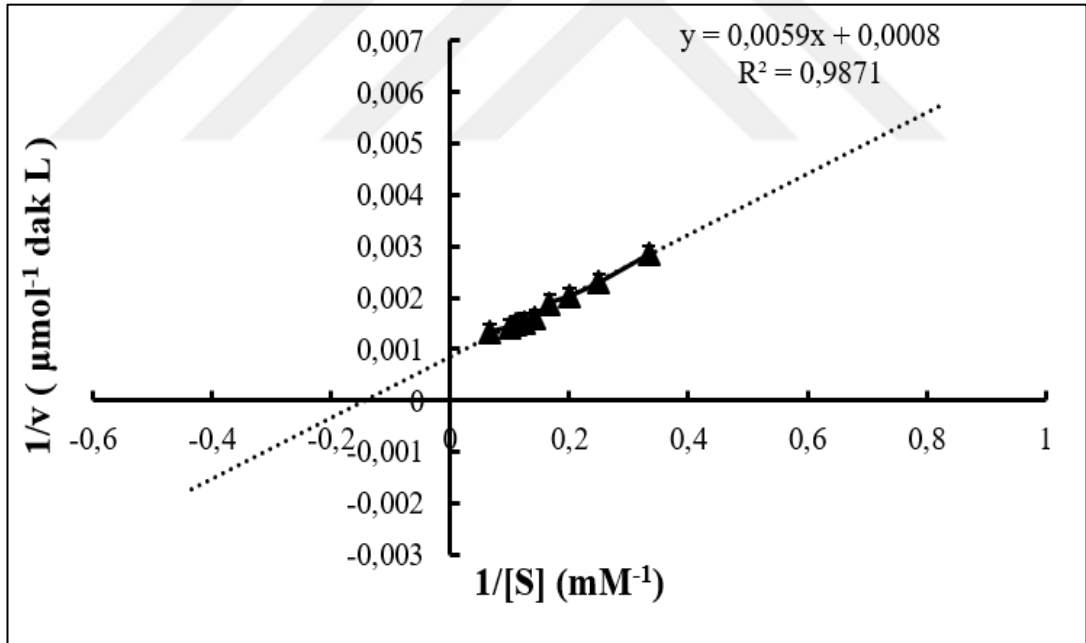
*Substratlar için kullanılan konsantrasyon değerleri literatürden (Ögel ve diğ., 2006; Tauber, 1953) seçilmiştir.

3.5.7. Katalaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi

A. fumigatus katalaz enzimine ait K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması amacıyla oluşturulan Michaelis Menten grafiği ve Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir. Enzimin hızını ve substratına olan afinitesini gösteren bu değerlerin hesaplanması için katalaz enzimi 0,1 – 40 mM aralığındaki H_2O_2 (substratı) konsantrasyonlarında aktivite tayini gerçekleştirildi. Lineweaver-Burk diyagramı yardımıyla ($1/S$ 'ye karşı $1/V$) K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,4 mM ve $1250 \mu\text{mol}^{-1}$ dak L olarak belirlendi.



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



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

A. fumigatus katalazının K_m değerinin 3,4 mM olan *Septoria tritici*, 6,5 mM olan *Klebsiella pneumoniae* ve 8,6 mM olan *Archaeoglobus fulgidus* katalazları ile yakın değere sahip olduğu görüldü (Hochman ve Goldberg, 1991; Kengen ve diğ., 2001; Levy ve diğ., 1992). Ayrıca K_m değerleri 21,7 mM (*Neurospora crassa*) 39 mM (*B.*

subtilis 168) ve 78 mM (*Serratia marcescens* SYBC08 katalazı) olan örnekler de mevcuttur (Diaz ve diğ., 2001; Li ve diğ., 2013; Zeng ve diğ., 2011). Literatürde rapor edilen K_m değerleri *A. fumigatus* katalazına ait değer ile karşılaştırıldığında bu çalışmada saf olarak elde edilen katalaz enziminin substratına olan afinitesinin daha yüksek seviyede olduğu görüldü. Artan substrat konsantrasyonlarında yapılan katalaz aktivite tayinlerinde, 0,1-1,0 mM aralığında aktivite gözlenmedi ve 40 mM'ın üzerinde enzimin doygunluk noktasına ulaşmış olduğu tespit edildi.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk önce enzim kaynağı olarak kullanılan *A. fumigatus*'un hücre büyüme optimizasyonu gerçekleştirildi. Zamana bağlı biyokütle miktarı ve katalaz aktivite bulguları karşılaştırıldığında, enzim üretiminin *A. fumigatus*'un durağan fazda olduğu gün (7.gün) optimum değerine ulaştığını gösterdi. Bu da enzim üretiminin sekonder metabolizma sonucu gerçekleşmiş olduğuna işaret etmektedir.

Enzim üretimini arttırmak için ise farklı sıcaklık derecelerinde (30°C-55°C) ve çeşitli H₂O₂ konsantrasyonlarında (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM) büyütme yapıldı. Sonuç olarak 37°C sıcaklıkta YpSs Broth besiyerinde 10 gün süresince inkübasyona bırakılan hücrelerde 7. günde katalaz aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Enzim üretiminin 45°C'nin üzerinde ise inhibe olduğu görüldü. Oksidatif stres yaratmak için eklenen farklı H₂O₂ konsantrasyonlarından 0,5 mM H₂O₂'de en yüksek katalaz aktivitesinin görüldüğü belirlendi.

Katalaz enzimi kromatografik yöntemle *A. fumigatus*'dan ilk defa bu çalışmada saflaştırıldı. Kromatografik yöntemle saflaştırma işleminde iyon değiştirme kromatografisinden yararlanıldı ve enzim %42 geri kazanımla 4 kat saflaştırıldı. Katalaz enziminin saflığının kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı ve burada tek bant gözlemlendi. Katalaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile yaklaşık 70 kDa olarak hesaplandı. Biyokimyasal karakterizasyon sonucu saf enzimin optimum sıcaklık ve pH'sı sırasıyla 60°C ve 7,0 olarak belirlendi. Ayrıca enzimin yaklaşık 1 saat boyunca 30°C-50°C ve pH 4,0-9,0 arasında kararlılığını koruduğu gözlemlendi. Lineweaver-Burk diyagramı yardımıyla (1/S'a karşı 1/V) K_m değeri 7,4 mM, V_{max} değeri ise 1250 µmol⁻¹ dak L olarak hesaplandı. Spektrofotometrik yöntemle yapılan analizde katalaz enziminin ikincil bir aktivite olarak polifenol oksidaz aktivitesi taşıdığı tespit edildi. Son olarak enzimin organik çözücülere olan dayanıklılığının düşük konsantrasyonlarda (%2,5, %5, %7,5) Metanol>Etanol>DMSO>Aseton şeklinde olduğu tespit edildi.

Karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilen enzimin geniş sayılabilecek pH ve sıcaklık değer aralıklarında reaksiyon ve stabilite özelliğinin olması, endüstriyel uygulamalar esnasında uzayan süreçlerde olumsuz etkilere karşı avantaj sağlayabilecek özelliktedir. Yine enzimin farklı organik çözücülere karşı çeşitli konsantrasyonlarda gösterdiği dayanıklılık dikkat çeken bir diğer özelliktir. İkincil bir aktivite olarak polifenol oksidaz aktivitesi taşıdığı düşünülen *A. fumigatus* katalazının endüstriyel uygulamalara fayda sağlayabileceği düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda enzimin X-ışını kristalografisi ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) yöntemleriyle 3 boyutlu yapısı belirlenerek moleküler düzeyde analiz yapılabilir ve enzimin sahip olduğu karakteristik özellikleri daha ayrıntılı araştırılarak farklı substratların ve efektörlerin enzimde yapısal ne şekilde değişikliklere yol açtığı belirlenebilir.

KAYNAKLAR

Abdel-Mageed H. M., El-Laithy H. M., Mahran L. G., Fahmy A. S., Mader K., Mohamed S. A., Development of Novel Flexible Sugar Ester Vesicles as Carrier Systems for the Antioxidant Enzyme Catalase for Wound Healing Applications, *Process Biochem*, 2012, **47**(7), 1155–1162.

Adrio J. L., Demain A. L., Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes, *Biomolecules*, 2014, **4**(1), 117–139.

Ahuja S. K., Ferreira G. M., Moreira A. R., Utilization of Enzymes for Environmental Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, **24**(2–3), 125–154.

Alfa M. J., Jackson M., A New Hydrogen Peroxide-Based Medicaldevice Detergent with Germicidal Properties: Comparison with Enzymatic Cleaners, *Am J Infect Control*, 2001, **29**(3), 168–177.

Araujo R., Casal M., Cavaco-Paulo A., Application of Enzymes for Textiles Fibers Processing, *Biocatal Biotechnol*, 2008, **26**, 332–349.

Asan A., *Aspergillus*, *Penicillium* and Related Species Reported from Turkey, *Mycotaxon*, 2004, **89**, 155–157.

Babizhayev M. A., Biological Activities of the Natural Imidazole-Containing Peptidomimetics N-Acetylcarnosine, Carnisine and L-Carnosine in Ophthalmic and Skin Care Products, *Life Sciences*, 2006, **78**(20), 2343–2357.

Bhat M., Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology (Review), *Biotechnology Advances*, 2000, **18**, 355–383.

Blackburn R. S., *Sustainable Textiles: Life Cycle and Environmental Impact*, 1st ed., Woodhead, Cambridge, 2009.

Buckingham K. W. C., Methods for the Treatment and Prophylaxis of Diaper Rash and Diaper Dermatitis, 1985, Patent No. US4556560A, *The Procter & Gamble Company*.

Bučková M., Godočíková J., Šimonovičová A., Polek B., Production of Catalases by *Aspergillus niger* Isolates as a Response to Pollutant Stress by Heavy Metals, *Current Microbiology*, 2005, **50**(4), 175–179.

Brahm H. S., Aspergillosis, *The New Engl and Journal of Medicine*, 2009, **360**, 1870-1884.

- Brown-Peterson N. J., Salin M. L., Purification of a Catalase–Peroxidase from *Halobacterium halobium*: Characterization of Some Unique Properties of the Halophilic Enzyme, *J Bacteriol*, 1993, **175**, 4197–4202.
- Calandrelli V., Gambacorta R. I., Carratore V., Lama L., A Novel Thermo-Alkali Stable Catalase–Peroxidase from *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldaniensis*: Purification and Characterization, *World Journal Microbiol Biotechnology*, 2008, **24**, 2269–2275.
- Calera J. A., Sánchez-Weatherby J., López-Medrano R., Leal F., Distinctive Properties of the Catalase B of *Aspergillus nidulans*, *FEBS Letters*, 2000, **475**, 117–120.
- Chang Y. C., Tsai H. F., Karos M., Kwon-Chung K. J., THTA, a Thermotolerance Gene of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genetics and Biology*, 2004, **41**(9), 888–896.
- Chelikani, P., Fita I., Loewen P. C., Diversity of Structures and Properties Among Catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**(2), 192–208.
- Chen S., Su L., Chen J., Wu J., Cutinase: Characteristics, Preparation and Application, *Biotechnol Adv.*, 2013, **31**(8), 1754–1767.
- Chen N., Teng X. L., Xiao X. G., Subcellular Localization of a Plant Catalase-Phenol Oxidase, AcCATPO, from *Amaranthus* and Identification of a Non-Canonical Peroxisome Targeting Signal, *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**, 1–11.
- Chesson A., Feed Enzymes, *Animal Feed Science and Technology*, 1993, **45**(1), 65–79.
- Choct M., Enzymes for the Feed Industry: Past, Present and Future, *World's Poultry Science Journal*, 2006, **62**(1), 5–16.
- Cho S. A., Cho J. C., Han S. H., Cosmetic Composition Containing Enzyme and Amino Acid, 2007, Patent No. US20090098102A1, *Amorepacific Corporation*.
- Choi J. M., Han S. S., Kim H. S., Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects, *Biotechnology advances*, 2015, **33**(7), 1443–1454.
- Chouchane S., Lippai I., Magliozzo R. S., Catalase-Peroxidase (*Mycobacterium tuberculosis* KatG) Catalysis and Isoniazid Activation, *Biochemistry*, 2000, **39**, 9975–9983.
- Caridis K. A., Christakopoulos P., Macris B. J., Simultaneous Production of Glucose Oxidase and Catalase by *Alternaria alternata*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, **34**(6), 794–797.
- Dagenais T. R. T., Keller N. P., Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, **22**(3), 447–465.

- Diaz A., Rangel P., Oca Y. M., Lledias F., Hansberg W., Molecular and Kinetic Study of Catalase-1, a Durable Large Catalase of *Neurospora crassa*, *Free Radic Biol Med*, 2001, **31**(11), 1323–1333.
- Diehl C., Skin Treatment Preparation, 2008, Patent No. US7468195, Crawford Healthcare Limited.
- Fedorova N. D., Khaldi N., Joardar V. S., Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*, *PLoS Genetics*, DOI:10.1371/1000046.
- Fetzner S., Lingens F., Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics and Biotechnological Applications, *Microbiol Rev*, 1994, **58**(4), 641–685.
- Fiedurek J., Gromada A., Production of Catalase and Glucose Oxidase by *Aspergillus niger* Using Unconventional Oxygenation of Culture, *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**, 85-89.
- Frias J., Doblado R., Antezana J. R., Vidal-Valverde C., Inositol Phosphate Degradation by the Action of Phytase Enzyme in Legume Seeds, *Food Chemistry*, 2003, **81**(2), 233–239.
- Fűtő P., Markus G., Kiss A., Adányi N., Development of a Catalasebased Amperometric Biosensor for the Determination of Increased Catalase Content in Milk Samples, *Electroanalysis*, 2012, **24**(1), 107–113.
- Garay-Flores R. V., Segura-Ceniceros E. P., De Leon-Gamez R., Balvantín-García C., Martínez-Hernández J. L., Betancourt-Galindo R., Ramírez A. R. P., Aguilar C. N., Ilyina A., Production of Glucose Oxidase and Catalase by *Aspergillus niger* Free and Immobilized in Alginate-Polyvinyl Alcohol Beads, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2014, **60**, 262–269.
- Garg G., Singh A., Kaur A., Singh R., Kaur J., Mahajan R., Microbial Pectinases: An Ecofriendly Tool of Nature for Industries, *Biotech*, 2016, **6**(1), 1–13.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J. M., Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, *Bioremediation Journal*, 1999, **3**(1), 1–26.
- Gudelj M., Fruhwirth G. O., Paar A., Lottspeich F., Robra K. H., Cavaco-Paulo A., et al., A Catalase–Peroxidase from a Newly Isolated Thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with Potential for the Treatment of Textile Bleaching Effluents, *Extremophiles*, 2001, **5**(6), 423–429.
- Hasan F., Shah A. A., Javed S., Hameed A., Enzymes Used in Detergents: Lipases, *Afr J Biotechnol*, 2010, **9**(31), 4836–4844.
- Have R. T., Teunissen P. J. M., Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi, *Chemical Reviews*, 2001, **101**(11), 3397–3413.
- Hochman A., Goldberg I., Purification and Characterization of a Catalase–Peroxidase and a Typical Catalase from the Bacterium *Klebsiella pneumoniae*, *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1077**(3), 299–307.

Jia X., Lin X., Lin C., Lin L., Chen J., Enhanced Alkaline Catalase Production by *Serratia marcescens* FZSF01: Enzyme Purification, Characterization, and Recombinant Expression, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, **30**, 110-117.

Kacem-Chaouche N., Maraihi Z., Destain J., Thonart P., Study of Catalase Production by an *Aspergillus phoenicis* Mutant Strain in Date Flour Extract Submerged Cultures, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2005, **9**(3), 173–178.

Kalia V. C., Rashmi Lal S., Gupta M. N., Using Enzymes for Oil Recovery from Edible Seeds, *J Sci Ind Res*, 2001, **60**, 298–310.

Kang Y. S., Lee D. H., Yoon B. J., Oh D. C., Purification and Characterization of a Catalase from Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1 Grown Under Anaerobic Conditions, *J Microbiol*, 2006, **44**(2), 185–191.

Kantarcıoğlu S., Yücel A., *Aspergillus* Cinsi Mantarlar İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç Ve Duyarlilik Deneyleri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2003, **34**(3), 140–157.

Karigar C. S., Rao S. S., Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review, *Enzyme Research*, DOI:10.4061/2011/805187.

Kaushal J., Singh S. G., Raina A., Arya S. K., Catalase Enzyme: Application in Bioremediation and Food Industry, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, **16**, 192–199.

Kawasaki L., Wysong D., Diamond R., Aguirre J., Two Divergent Catalase Genes are Differentially Regulated During *Aspergillus nidulans* Development and Oxidative Stress, *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**, 3284–3292.

Kawasaki L., Aguirre J., Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*, *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**(4), 1434–1440.

Kengen S. W., Bikker F. J., Hagen W. R., Vos W. M., Oost J., Characterization of a Catalase–Peroxidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *Extremophiles*, 2001, **5**(5), 323–332.

Keshwani A., Malhotra B., Kharkwal H., Natural Polymer Based Detergents for Stain Removal, *World J Pharm Pharm Sci*, 2015, **4**(4), 490–508.

Kieliszek M., Misiewicz A., Microbial Transglutaminase and its Application in the Food Industry; A review, *Folia Microbiol*, 2014, **59**, 241–250.

Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., Industrial Enzyme Applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**(4), 345–351.

Klibanov A. M., Tu T. M., Scott K. P., Enzymatic Removal of Hazardous Pollutants from Industrial Aqueous Effluents, *Enzym Eng*, 1982, **6**, 319–323.

Kuhad R. C., Gupta R., Singh A., Microbial Cellulases and Their Industrial Applications, *Enzym Res.*, 2011, 1-10.

Konak Ü. İ., Turhan İ., Certel M., Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması, *Academic Food Journal*, 2014, **12**(2), 79-87.

Kumar S., Role of Enzymes in Fruit Juice Processing and Its Quality Enhancement, *Advances in Applied Science Research*, 2015, **6**(6), 114–124.

Kuraishi C., Sakamoto J., Yamazaki K., et al., Production of Restructured Meat Using Microbial Transglutaminase Without Saltor Cooking, *J Food Sci*, 1997, **62**, 488–490.

Laemmli U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680–685.

Lang G., Cotteret J., Composition for the Oxidation Dyeing of Keratinous Fibres Containing a Laccase and Dyeing Method Using, 2004, US2004255401A, *This composition*.

Le Roes-Hill M., Prins A., Biotechnological Potential of Oxidative Enzymes from Actinobacteria, *InTech*, DOI:10.5772/61321.

Lei X. G., Stahl C. H., Nutritional Benefits of Phytase and Dietary Determinants of Its Efficacy, *Journal of Applied Animal Research*, 2000, **17**(1), 97–112.

Levy E., Eyal Z., Hochmant A., Purification and Characterization of a Catalase-Peroxidase from the Fungus *Septoria tritici*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, **296**(1), 321-327.

Li S., Yang X., Yang S., Zhu M., Wang X., Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, DOI: 10.5936/2012/09017.

Li J., Zhanga Y., Chena H., Liua Y., Yang Y., Purification and Characterization of Recombinant *Bacillus subtilis* 168 Catalase Using a Basic Polypeptide from Ribosomal Protein L2, *Biochemical Engineering Journal*, 2013, **72**, 83-89.

Lineweaver H., Burk D., The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of American Chemical Society*, 1934, **56**, 658–666.

Lončar N., Fraaije M. W., Not so Monofunctional—a Case of Thermostable *Thermobifida fusca* Catalase with Peroxidase Activity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, **99**(5), 2225–2232.

Machunqueiro M., Victor B., Switala J., Villanueva J., Rovira C., Fita I., Loewen P. C., The Catalase Activity of Catalase-Peroxidases Is Modulated by Changes in the pKa of the Distal Histidine, *Biochemistry*, 2017, **56**(17), 2271–2281.

Madadlou A., O’Sullivan S., Sheehan D., Fast Protein Liquid Chromatography, Editors: Carta G., Jungbauer A., *Protein Chromatography*, 1st ed., Wiley-VCH, Weinheim, 439-447, 2010.

Mai C., Schormann W., Milstein O., Huttermann A., Enhanced Stability of Laccase in the Presence of Phenolic Compounds, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, **54**(4), 510–514.

Maijala P., Kleen M., Westin C., Poppius-Levlin K., Herranen K., Lehto J. H., Reponen P., Maentausta O., Mettal A., Hatakka A., Biomechanical Pulping of Softwood with Enzymes and White-rot Fungus *Physisporinus rivulosus*, *Enzym Microb Technol*, 2008, **43**, 169–177.

Mane P., Tale V., Review Article Overview of Microbial Therapeutic Enzymes, *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2015, **4**(4), 17–26.

Maté, M. J., Zamocky M., Nykyri L. M., Herzog C., Alzari P. M., Betzel C., Koller F., Fita I., Structure of Catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Molecular Biology*, 1999, **286**(1), 135–149.

Merle, P. L., Sabourault C., Richier S., Allemand D., Furla P., Catalase Characterization and Implication in Bleaching of a Symbiotic Sea Anemone, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, **42**(2), 236–246.

Mliki A., Zimmermann W., Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from *Streptomyces cyaneus*, *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(3), 916–919.

Moore M. M., Heinbockel M., Dockery P., Ulmer M. H., Arendt E. K., Network Formation in Gluten-free Bread with Application of Transglutaminase, *Cereal Chem*, 2006, **83**, 28–36.

Mojsov K., Applications of Enzymes in the Textile Industry: a Review., *In: 2nd international congress: Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 2011.

Mojsov K., Microbial Alpha-amylases and Their Industrial Applications: a Review, *Int J Manage IT Eng.*, 2012, **2**(10), 583–609.

Nadler V., Goldberg I., Hochman A., Comparative Study of Bacterial Catalases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **882**, 234-241.

Neidleman S. L., Applications of Biocatalysis to Biotechnology, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1984, **1**(1), 1–38.

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

Noventa-Jordão M. A., Couto R. M., Goldman M. H. S., Aguirre J., Iyer S., Caplan A., Terenzi H. F., Goldman G. H., Catalase Activity is Necessary for Heat-shock Recovery in *Aspergillus nidulans* Germlings, *Microbiology*, 1999, **145**, 3229–3234.

Ögel Z. B., Yüzügüllü Y., Mete S., Bakir U., Kaptan Y., Sutay D., Demir A. S., Production, Properties and Application to Biocatalysis of a Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **71**(6), 853–862.

Pai J. S., Applications of Microorganisms in Food Biotechnology, *Indian Journal of Biotechnology*, 2003, **2**(3), 382–386.

Pandey D., Singh R., Chand D., An Improved Bioprocess for Synthesis of Acetohydroxamic Acids Using DTT (dithiothreitol) Treated Resting Cells of *Bacillus* sp. APB-6, *Bioresour Technol*, 2011, **102**(11), 6579–6586.

Paris S., Wysong D., Debeaupuis J. P., Shibuya K., Philippe B., Diamond R. D., Latgé J. P., Catalases of *Aspergillus fumigatus*, *Infection and Immunity*, 2003, **71**(6), 3551–3562.

Pedrini N., Juarez M. P., Crespo R., Alaniz M. J., Clues on the Role of *Beauveria bassiana* Catalases in Alkane Degradation Events, *Mycologia*, 2006, **98**(4), 528–534.

Petruccioli M., Fenice M., Piccioni P., Federici F., Effect of Stirrer Speed and Buffering Agents on the Production of Glucose Oxidase and Catalase by *Penicillium variabile* (P16) in Benchtop Bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, **17**(4), 336–339.

Piontek K., Smith A. T., Blodig W., Lignin Peroxidase Structure and Function, *Biochem Soc Trans.*, 2001, **29**(2), 111–116.

Qureshi M. A., Khare A. K., Pervez A., Enzymes Used in Dairy Industries, *Int J Appl Res.*, 2015, **1**(10), 523–527.

Raj J., Prasad S., Bhalla T. C., *Rhodococcus rhodochrous* PA-34: A Potential Biocatalyst for Acrylamide Synthesis, *Process Biochemistry*, 2006, **41**(6), 1359–1363.

Rehan M., Younus H., Effect of Organic Solvents on the Conformation and Interaction of Catalase and Anticatalase Antibodies, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, **38**(3-5), 289–295.

Rubilar O., Diez MC., Gianfreda L., Transformation of Chlorinated Phenolic Compounds by White Rot Fungi, *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2008, **38**, 227–268.

Sangar S., Pal M., Moon L. S., Jolly R. S., A Catalase-Peroxidase for Oxidation of β -Lactams to Their (R)-Sulfoxides, *Bioresource Technology*, 2012, **115**, 102–110.

Santos W. G., Pacheco I., Liu M. Y., Teixeira M., Xavier A., Legall J., Purification and Characterization of an Iron Superoxide Dismutase and a Catalase from the Sulfate-reducing Bacterium *Desulfovibrio gigas*, *J Bacteriol*, 2000, **182**(3), 796–804.

Schafer T., Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., Pedersen S., Salmon S., Olsen H. S., Deinhammer R., Lund H., Enzymes for Technical Applications, In: *Fahnestock SR, Steinbüchel A (eds) Biopolymers*, Cambridge, 2002.

Shamsipur M., Asgari M., Maragheh M. G., Moosavi-Movahedi A. A., A Novel Impedimetric Nanobiosensor for Low Level Determination of Hydrogen Peroxide Based on Biocatalysis of Catalase, *Bioelectrochemistry*, 2012, **83**, 31–37.

Shi X., Shi Z., Huang H., Zhu H., Zhou P., Ju D., Therapeutic Effect of Recombinant Human Catalase on H1N1 Influenza-induced Pneumonia in Mice, *Inflammation*, 2010, **33**(3), 166–172.

Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P. K., Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century, *Biotech*, 2016, **6**(2), 174.

Sooch B. S., Kauldhar B. S., Puri M., Recent Insights into Microbial Catalases: Isolation, Production and Purification, *Biotechnology Advances*, 2014, **32**, 1429–1447.

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

Srivastava N., Singh P., Degradation of Toxic Pollutants from Pulp & Paper Mill Effluent, *Discovery*, 2015, **40**(183), 221–227.

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

Sutay Kocabas D., Bakir U., Phillips S. E. V., McPherson M. J., Ogel Z. B., Purification, Characterization, and Identification of a Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**(3), 407–415.

Switala J., Loewen P. C., Diversity of Properties Among Catalases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **401**, 145–154.

Temiz A., *Aspergillus* Cinsi Küflerin Tanımlanması, *Gıda Dergisi*, 1989, **14**, 51–56.

Tauber H., Oxidation of Pyrogallol to Purpurogallin by Crystalline Catalase, *J. Biol. Chem*, 1953, **205**, 395-400.

Teng X. L., Chen N., Xiao X. G., Identification of a Catalase-Phenol Oxidase in Betalain Biosynthesis in Red Amaranth (*Amaranthus Cruentus*), *Frontiers in Plant Science*, 2016, **6**, 1–16.

Terzenbach D. P., Blaut M., Purification and Characterization of a Catalase from the Nonsulfur Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and its Role in the Oxidative Stress Response, *Arch. Microbiol.*, 1998, **169**(6), 503-508.

URL-1: <https://www.inspq.qc.ca/node/483>, (Ziyaret tarihi: 17 Haziran 2019)

Vetrano A. M., Heck D. E., Mariano T. M., Mishin V., Laskin D. L., Laskin J. D., Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(42), 35372–35381.

Walsh G. A., Power R. F., Headon D. R., Enzymes in the Animalfeed Industry, *Trends Biotechnol*, 1993, **11**(10), 424–430.

Walker G. E., Dunbar B., Hunter I. S., Nimmo H. G., Coggins J. R., A Catalase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Microbiology*, 1995, **141**(6), 1377–1383.

Wang H., Tokusige Y., Shinoyama H., Fujii T., Urakami T., Purification and Characterization of Thermostable Catalase from Culture Broth of *Thermoascus auranticus*, *J Ferment Bioeng*, 1998, **85**(2), 169–173.

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

Yuzugullu Y., Trinh C. H., Smith M. A., Pearson A. R., Phillips S. E. V., Sutay Kocabas D., Bakir U., Ogel Z. B., McPherson M. J., Structure, Recombinant Expression and Mutagenesis Studies of the Catalase with Oxidase Activity from *Scytalidium thermophilum*, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2013, **69**(3), 398–408.

Zamocky M., Furtmüller P. G., Obinger C., Evolution of Catalases from Bacteria to Humans, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, **10**(9), 1527–1548.

Zamocky M., Koller F., Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and in Vitro Mutagenesis, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, **72**(1), 19–66.

Zeng H. W., Cai Y. J., Liao X. R., Zhang F., Zhang D. B., Production, Characterization, Cloning and Sequence Analysis of a Monofunctional Catalase from *Serratia marcescens* SYBC08, *J Basic Microbiol*, 2011, **51**, 205–214.



Ek-A

Tablo A.1. Deneyleerde kullanılan cihazlar

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

Ek-B

Büyüme Ortamı Hazırlanması

Besiyeri (YpSs büyüme ortamı)

4g Yeast Ekstrakt

1g K₂HPO₄

0,5g MgSO₄*7H₂O

10g Glikoz

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

Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri

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

Solüsyonların Hazırlanışı

SDS-PAGE Jel Elektrofrez

SDS-PAGE Elektrofrez jeli için

%15 (h/h) ayırma jeli

%30 Akrilamid – 2,5 ml

1,5 Tris-HCl [pH 8,8] – 1,25 ml

ddH₂O – 1,18 ml

%20 SDS – 0,025 ml

%10 APS – 0,050 ml

TEMED – 0,005 ml

%5 (h/h) yükleme jeli

%30 Akrilamid – 830 µL

1 M Tris-HCl [pH 6,8] – 630 µL

ddH₂O – 3,4 ml

%20 SDS – 0,025 ml

%10 APS – 0,050 ml

TEMED – 0,005 ml

%10 h/h APS (Amonyumpersülfat)

10 g APS tartılır, 10 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -80°C'de muhafaza edilir.

Jel Yükleme Tamponu

%20 SDS – 2 ml

1 M Tris-HCl – 1 ml

Gliserol – 1 ml

Mercaptoethanol – 1 ml

Bromophenol

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

Ek-B (Devam)

10x Running Buffer

30 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su içerisinde çözdürülür. pH 8,3'e ayarlanıp 4°C'de saklanır. Jeli yürütme esnasında bu solüsyondan 100 ml alınır ve üzerine 900 ml distile su ilave edilerek karıştırılır. Sonrasında elektroforez tankına aktarılarak jel yürütülür.

Coomassie Blue Stain Solüsyonu (1 litre)

2,5 g Coomassie Blue, 450 ml metanol içerisinde 1 gece boyunca çözdürülür. 70 ml Asetik Asit ve 480 ml distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 4°C'de saklanır.

Destain Solüsyonu (1 litre)

250 ml Metanol, 150 ml Asetik Asit, 675 ml distile su, koyu renkli şişede karıştırıldıktan sonra 4°C'ye saklanılmak üzere kaldırılır.

1,5 M Tris HCl Tamponu, 100 ml (pH 8.8)

18,5 g Tris Base; 0,4 g SDS 80 ml distile su içerisinde çözdürülür. 1 M HCl ile pH 8.7 'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

0,1 M Sitrat tamponu (pH 4,0)

Sodyum sitrat 9,838 g

Sitrik asit 12,782 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 4,0'a ayarlanır.

0,1 M Sitrat tamponu (pH 5,0)

Sodyum sitrat 16,963 g

Sitrik asit 8,127 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 5,0'a ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 6,0)

Monobazik 13,68 g

Dibazik 3,30 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 6,0'a ayarlanır.

0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7,0)

Monobazik 6,08 g

Dibazik 21,8 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,0'a ayarlanır.

0,1 M Tris Tamponu (pH 8,0)

Tris 12,114 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 8,0'a ayarlanır.

0,1 M Glisin sodyum hidroksit Tamponu (pH 9,0)

Glisin 0,66 g

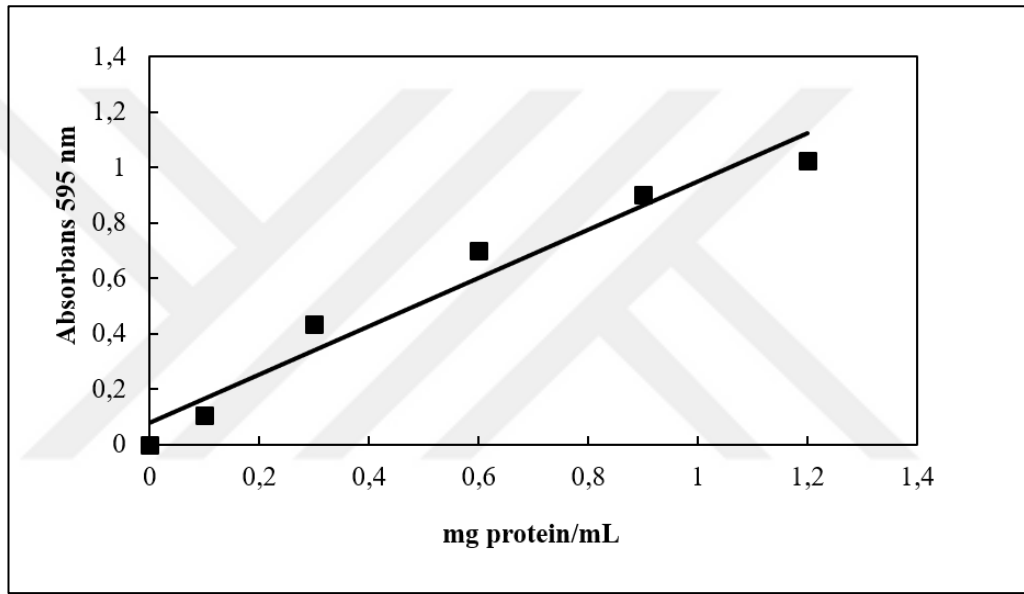
Sodyum hidroksit 0,046 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 9,0'a ayarlanır.

Ek-C

Bradford Metodu ile Protein Miktarının Hesaplanması

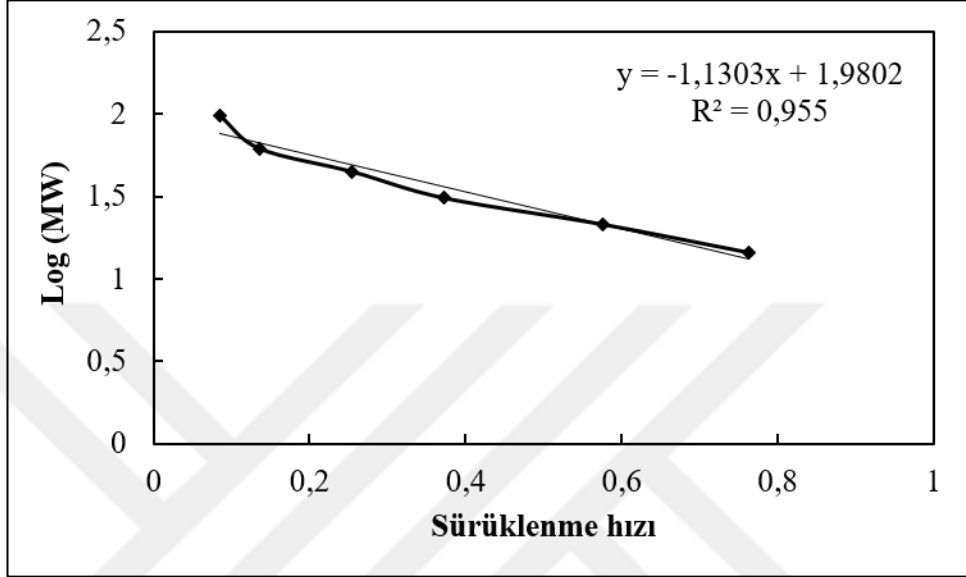
Protein miktarının belirlenmesi için standart protein olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Stok BSA çözeltisi (2 mg/mL) aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde standart protein çözeltiler, hazırlandı. Numarlandırılmış olan 2 ml'lik ependorflara, farklı BSA konsantrasyonlarından 100 μ L ve 1.5 mL Bradford reaktifi (expedon, Bradford Ultra Protein Assay) eklendi. 10 dak oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm gerçekleştirilerek standart eğri oluşturuldu (Şekil C.1.).



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

Ek-D

Kromatografik yöntem ile saflaştırılan enzimin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının tespiti için poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi. SDS-PAGE analizi sonrası örneğe ait molekül ağırlığının hesaplanması aşağıdaki grafik ile gerçekleştirildi ve yaklaşık 70 kDa civarında tek bir bant gözlemlendi.



Şekil D.1. Moleküler ağırlık tayininde kullanılan grafik

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Ağgez C., Yüzügüllü Karkuş Y., “*Aspergillus fumigatus* Katalazının Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, *Uluslararası Marmara Fen ve Sosyal Bilimler Kongresi (Bahar) 2019 Bildiriler Kitabı Cilt I (Fen Bilimleri)*, s6.



ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2012 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.



