

## ***Aspergillus niger* Katalazının Üretimi, Üçlü-Faz Ayırma ile Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu**

Eda BAYKAL SARI<sup>1</sup> , Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ\*<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 41001, Kocaeli, Türkiye

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 41001, Kocaeli, Türkiye

(Alınış / Received: 02.05.2019, Kabul / Accepted: 23.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

### **Anahtar Kelimeler**

*Aspergillus niger*,  
Katalaz,  
Üçlü-faz ayırma sistemi,  
Oksidaz,  
Peroksidaz

**Özet:** Bu çalışmada *Aspergillus niger* katalazının üretimi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Buna göre 1 litrelik YpSs sıvı büyüme ortamında 37°C ve 155 rpm çalkalama hızında büyütülen *A. niger*'den 7. günde ham enzim ekstraktı elde edilmiştir. Katalaz enzimi üçlü-faz ayırma (TPP) tekniği ile saflaştırılmıştır. Bunun için %80 (w/w) amonyum sülfat içeren ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1:1.5 olacak şekilde pH 7.0'da hazırlanan sistemden enzim %263 verim ile 7.9 kat saflaştırılmıştır.  $K_m$  değeri (21.4 mM), optimum reaksiyon sıcaklığı (50°C) ve optimum reaksiyon pH'sı (6.0) belirlenmiştir. Kararlılık testleri, enzimin geniş pH (4.0-9.0) aralığında dayanıklı kalabildiğini göstermiştir. Ayrıca katalaz aktivitesinin %7.5'lik (v/v) etanol varlığında yaklaşık %77'sinin korunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, esas fonksiyonunun yanında 4-metil katekol ve katekol gibi fenolik bileşikleri peroksitten bağımsız olarak okside edebilmiştir. Sonuç olarak, *A. niger*'den katalaz enziminin geleneksel kromatografi yöntemi yerine zamandan tasarruf sağlayan, maliyeti ucuz ve kullanımı oldukça kolay olan üçlü faz sistemleri ile saflaştırılabildiği görülmektedir. Enzimin sahip olduğu biyokimyasal özellikleri (pH ve etanol kararlılığı ve ikincil oksidaz aktivite varlığı), çeşitli endüstriyel uygulama alanlarında avantaj sağlayabilir.

## **Production, Purification of *Aspergillus niger* Catalase by Three-Phase Partitioning and Its Biochemical Characterization**

### **Keywords**

*Aspergillus niger*,  
Catalase,  
Three-phase partitioning,  
Oxidase,  
Peroxidase

**Abstract:** In this study, it was aimed to produce, purify and characterize catalase enzyme from *Aspergillus niger*. For that purpose, the cells of *A. niger* were grown at 37°C and 155 rpm in 1 liter YpSs broth media and on the 7<sup>th</sup> day of cultivation the crude enzyme extract was obtained from the growth media. Catalase enzyme was purified by three-phase partitioning method. Accordingly, the system prepared by 80% (w/w) ammonium sulfate saturation at pH 7.0 with 1:1.5 (v/v) ratio of crude extract to t-butanol gave 7.9-fold purification with 263% activity recovery. The  $K_m$  value (21.4 mM), the optimum reaction temperature (50°C) and the optimum reaction pH (6.0) were determined. Stability tests indicated that the enzyme can remain its activity in a broad pH (4.0-9.0) range. Additionally, it was observed that about 77% of initial catalase activity was maintained in the presence of 7.5% (v/v) ethanol. Besides its main function, it can also oxidase some phenolic compounds like 4-methyl catechol and pyrocatechol in a peroxide-independent way. As a consequence, it was seen that the catalase enzyme can be purified from *A. niger* by a three-phase partitioning system known as a time-effective and inexpensive system and very easy to use rather than a conventional chromatography. Its biochemical properties (pH and ethanol stabilities and presence of a secondary oxidase activity) can provide advantages in various industrial applications.

\*İlgili yazar: yyuzugullu@yahoo.com

## 1. Giriş

Katalazlar (E.C. 1.11.1.6) antioksidan etkilerini hücredeki fazla hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak gösterirler. Genel olarak katalazları üç gruba ayırabiliriz: Monofonksiyonel “hem” grubu içeren katalazlar, Katalaz-peroksidazlar ve Demir/hem içermeyip Mn içeren katalazlar [1]. *Aspergillus* türlerinde farklı sayıda ve çeşitte katalaz enzimi üretilmektedir. Genel olarak *Aspergillus*’larda bir adet katalaz-peroksidaz enzimi (miselyumda) bulunur. Diğer yandan monofonksiyonel katalazlar (miselyum ve konidyada bulunan) bir veya daha fazla sayıda olabilir [2-4].

*A. niger* ticari katalaz enzim kaynaklarından biri olmakla birlikte bu küfte en az dört farklı katalaz enziminin üretildiği bulunmuştur. Bunlardan ikisinin glukoz oksidaz enziminin varlığına bağlı olarak üretildiği rapor edilirken diğer iki katalazın *Neurospora crassa* katalazı (monofonksiyonel) ile genetik benzerlik taşıdığı belirtilmiştir [5]. Ancak *A. niger*’de gözlenen katalaz enzimlerinin kinetik özellikleri henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, *A. niger* katalazının üretimi, Üçlü-Faz Ayırma Sistemi (Three-Phase Partitioning-TPP) ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu hedeflenmiştir. TPP proteinlerin bozulmadan sıvı fazda kalması için uygun bir ortam sağlamanın yanı sıra işlem süresinin kısa olması, enzimin yüksek geri kazanımla ve düşük maliyette saflaştırılması gibi ayrıcalıklara sahiptir. Sistem, ham enzim ekstraktına amonyum sülfat (tuz) ve t-butanol (organik çözücü) eklenmesinden oluşur. Sonuçta iki ayrı sıvı faz (üstte alkol içeren faz ve altta tuzlu sulu faz) meydana gelir. Amonyum sülfat, proteinlerin “salting-out” etkisiyle dereceli olarak çökmelerini sağlayan bir tuzdur. Butanol ise istenmeyen bileşiklerin (düşük molekül ağırlığına sahip lipid ve fenolik maddeler) biyomoleküllerden seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar. Düşük hızda uygulanan santrifüj ile proteinler pellete (ara faza) geçer. Ara fazın tamponda tekrar çözünmesiyle spesifik ve toplam aktivite geri kazanılır, bazen de artar. TPP’nin en önemli avantajı büyük ve küçük ölçekli bütün çalışmalara uygulanabilmesidir. Diğer saflaştırma yöntemleri ile kıyaslandığında; harcanan amonyum sülfat miktarı, protein saflaştırmada ara işlemlerden biri olan tuzla çöktürme işlemine göre çok düşük olacağından ve geri kazanımının da mümkün olduğu düşünülürse, maddi açıdan oldukça makul bir maliyet tablosu ortaya çıkmaktadır [6]. TPP, günümüzde birçok biyomolekülün saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak invertaz (*Solanum tuberosum*) [7], pektinaz (*Lycopersicon esculentum*) [8],  $\beta$ -galaktozidaz (*Cicer arietinum*) [9], proteaz inhibitörü (*Eleusine coracana*) [10], tripsin inhibitörü (*Glycine max*) [11],  $\alpha$ -galaktozidaz (*Solanum muricatum*) [12] ve ksilinaz (*A. niger*) [13] verilebilir.

Literatürde katalazların farklı mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmasına yönelik raporlar mevcuttur; ancak küflerden katalaz eldesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır [14]. Bu çalışmalar incelendiğinde çoğunlukla kromatografik yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir [15-17]. Dolayısıyla, katalazların küflerden TPP ile saflaştırılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Mikroorganizma ve kültür hazırlanması

Küfe ait spor süspansiyonlarını hazırlamak amacıyla örnek PDA’da (Patates Dekstroz Agar, Potato Dextrose Agar) 30°C sıcaklıkta 7 gün süreyle büyütülmüştür. Agar üzerinde gelişen sporlar 30 ml’lik steril %0.01 (v/v) Tween 80 içeren çözelti içine alınarak spor sayımı Petroff - Hausser Lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [18]. Daha sonra spor süspansiyonları steril Tween 80 içeren çözelti ile ml’inde 1 milyon spor içerecek şekilde seyreltilmiş ve %80 (v/v) gliserol eklenerek -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Küfün büyütülmesi için örneğe ait 100  $\mu$ l’lik spor süspansiyonu ( $10^6$  spor/ml) 20 ml’lik öncü büyüme ortamında canlandırıldıktan sonra 2000 ml’lik erlenler içerisinde 1000 ml hazırlanan besiyerine (10 g/l glukoz, 0.5 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 g/l  $K_2HPO_4$  ve 4 g/l maya ekstraktı) aktarılmış ve 10 gün boyunca 155 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır [19]. Katalaz üretiminin optimizasyonu için ısı şoku ile oksidatif stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Isı şoku yaratmak amacıyla kültürler 37, 42, 45, 50 ve 55°C sıcaklık derecelerinde büyütülmüştür [20]. Oksidatif stres için ise ön kültürün aktarıldığı ana büyüme ortamına  $H_2O_2$ , 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM derişimlerinde katalaz aktivitesinin optimum üretildiği günde (7. gün) her 30 dakikada bir eklenerek 2 ila 6 saat (2, 3, 4, 5 ve 6 saat) inkübe edilmiştir [21].

### 2.2. Biyokütle tayini

Biyokütle tayini için 24 saatte bir 50’şer ml örnek kültür ortamından toplanarak hücreler Whatman filtre kağıdından (No:1) filtrasyon yolu ile uzaklaştırılmıştır. Süzölmüş ortam sıvısı (süpernatant), enzim aktivite ve protein miktar tayinlerinde kullanılmıştır. Filtre kağıdında bulunan hücreler ise distile su ile yıkandıktan sonra kuru ağırlığının belirlenmesi üzerine 100°C’de sabit bir ağırlığa ulaşınca kadar bekletilmiş ve biyokütle tayininde kullanılmıştır [22]. Biyokütleden ayrılan ortam sıvısı, ham enzim ekstraktı olarak isimlendirilmiş, saflaştırma ve katalitik aktivite tayininde kullanılmıştır.

### 2.3. Enzim aktivite tayini

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. 1 ml'lik reaksiyon sıvısı, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonundan 2.9 ml ve enzim solüsyonundan 0.1 ml (pH 7.0) konularak hazırlanmıştır. Reaksiyon sıcaklığı 25°C'ye ayarlandıktan sonra hidrojen peroksidin kaybolma hızı 240 nm'de ölçülerek hesaplanmıştır. 1 Ünite aktivite, 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i 1 dakikada parçalayabilen enzime karşılık gelmektedir [15]. Enzim aktivite analizlerinde "kontrol" olarak reaksiyon ortamına enzim yerine tampon çözelti eklenerek aktivite ölçümleri yapılmıştır.

### 2.4. Protein miktar tayini

Protein konsantrasyonu Bradford Metoduna göre belirlenmiş; standart grafiğin çizilmesinde protein olarak siğir serum albümini kullanılmıştır [23].

### 2.5. Üçlü-faz ayırma sistemi

Çalışmada, 2 ml ham enzim ekstraktı, farklı amonyum sülfat doygunluklarına (%40, %50, %60, %70, %80 ve %90, w/w) getirilmiş ve karışıma farklı ham enzim ekstrakt/t-bütanol oranları (1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 ve 1.0:2.0) sağlanacak şekilde t-bütanol eklenmiştir. Sistem pH'sı farklı pH'larda (4.0-9.0) hazırlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 4500 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek faz ayrımları gözlenmiştir [7, 24]. Proteinin bulunmasının beklenmediği butanolce zengin üst faz dikkatlice pipetlenerek ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra orta ve alt fazlar toplanarak 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisine (pH 7.0) karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası orta ve alt fazlarda aktivite ve protein değerleri yukarıda anlatılan şekilde spektrofotometrik yöntemle tespit edilmiştir.

Spesifik bir enzimin TPP ile ayrımının analizi aşağıda verilen parametrelerin değerlendirilmesi ile mümkündür [25]:

Spesifik aktivite (**SA**), 1 mg protein başına düşen enzim ünitesidir. Her bir basamaktaki enzim aktivitenin (U/ml) yine her basamaktaki protein konsantrasyonuna (mg/ml) bölünmesiyle hesaplanır. Saflaştırma katsayısı (**PF**), herhangi bir fazda ölçülen enzime ait spesifik aktivitenin ham enzim ekstraktında ölçülen enzim aktivitesine oranıdır. Protein geri kazanım değeri (**%R**) ise herhangi bir fazdaki enzim aktivite değerinin sisteme eklenen enzimin başlangıçtaki aktivitesine oranıdır.

### 2.6. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Katalaz enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE analizi ile yapılmıştır. Buna göre elektroforez, Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %5 (v/v) yükleme jeli

ve %15 (v/v) ayırma jeli hazırlanarak gerçekleştirilmiştir [26]. Protein markör'ü olarak BioRad Low Range (14-97 kDa) kullanılmıştır. Elektroforez 200 V'da yaklaşık 50 dak yürütülerek gerçekleştirilmiş ve yürütülen jeller elde edilen protein konsantrasyonuna göre gümüş boyama [27] ile boyanmıştır.

### 2.7. Sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın enzim üzerine etkisini incelemeye 30°C - 70°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi (% Bağlı Aktivite) ve reaksiyon sıcaklık değerleri arasında çizilen grafik ile enzimin optimum reaksiyon sıcaklık değeri belirlenmiştir. Termal kararlılık tayini için ise aynı miktarda protein ihtiva eden enzim örnekleri 60 dak boyunca farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60 ve 70°C) inkübe edilip ardından standart aktivite ölçüm değerinde (25°C'de) aktivite tayinleri yapılmıştır.

Farklı pH değerlerinin katalitik aktivite üzerindeki etkilerini belirlemek için 4.0 ile 9.0 arasında değişen farklı pH'larda (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) standart koşullar altında spektrofotometrede (Cary60, Agilent) enzim aktivite ölçümü alınmıştır. pH 4.0 - 5.0 arasındaki reaksiyonlar için 100 mM sitrat tampon çözeltisi, pH 6.0 ile 7.0 için 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi, pH 8.0 için 100 mM tris tampon çözeltisi ve pH 9.0 için 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri kullanılmıştır. pH'nın enzim dayanıklılığı üzerine etkisini test etmek için ise aynı pH aralığı arasında hazırlanmış tampon çözeltilerde enzim örnekleri 1 saat inkübe edildikten sonra katalaz aktivite ölçümleri yapılmıştır [28].

### 2.8. Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücülere karşı katalaz enziminin dayanıklılık derecesini incelemek amacıyla, aseton, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve metanol son konsantrasyonları % 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 ve 25 (v/v) olacak şekilde reaksiyon karışımına direk eklenmiş [22] ve katalaz aktivite tayini yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 2.9. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

*A. niger*'den saflaştırılan katalaz örneği 0.1-70 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit substrat olarak kullanılarak aktiviteleri ölçülmüş; K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri Lineweaver-Burk Plot ile hesaplanmıştır [29].

### 2.10. Oksidaz/peroksidaz substrat özgüllüğü

Katalaz enziminin olası ikincil oksidatif/peroksidatif aktivite özelliği spektrofotometrik yöntemle test edilmiştir. Buna göre (saf) enzim aktivitesi farklı

oksidaz/peroksidaz substratları varlığında analiz edilmiştir. Kullanılan substratlar arasında pirogallol (430 nm), hidrokinnon (440 nm), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, 420 nm), guaiakol (465 nm) ve L-tirozin (475 nm) yer almaktadır [22, 30].

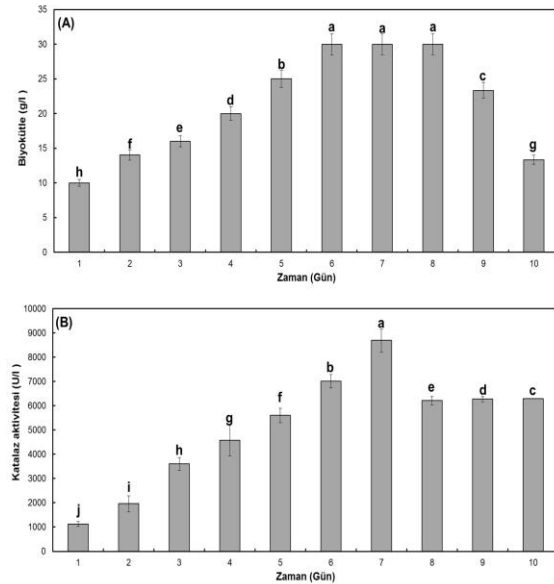
### 2.11. İstatistiksel analiz

Denemeler farklı zaman dilimlerinde üç kez tekrar edilmiştir. Veriler arasındaki istatistiksel farklılığın derecesi ( $p < 0.05$ ) veri setine göre Duncan veya Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre belirlenmiştir. İstatistiksel analiz IBM SPSS Statistics 19 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 3. Bulgular

### 3.1. Zamana bağlı katalaz üretimi

%1 (w/v) glukoz içeren besi ortamında 10 gün boyunca büyütülen *A. niger*'de ölçülen hücre dışı katalaz üretimi ve biyokütle tayin sonuçları Şekil 1'de gösterilmektedir. Buna göre, küfün büyümesi sırasında gözlenen Logaritmik faz altıncı güne kadar sürmüştür. Diğer yandan küf 6. güne durağan faza girmiş ve 8. güne kadar bu fazda kalmıştır. Katalaz aktivitesi ise küf büyümesine paralel olarak artış göstermiş; en yüksek değerine küf durağan fazda (7. gün) iken ulaşmıştır.



**Şekil 1.** *A. niger*'e ait (A) biyokütle (g/l) ve (B) katalaz (U/l) aktivite grafiği. *A. niger*, karbon kaynağı olarak %1 (w/v) glukoz içeren 1 litrelik YpSs büyüme ortamında büyütülmüştür. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Katalaz üretiminin optimizasyonu

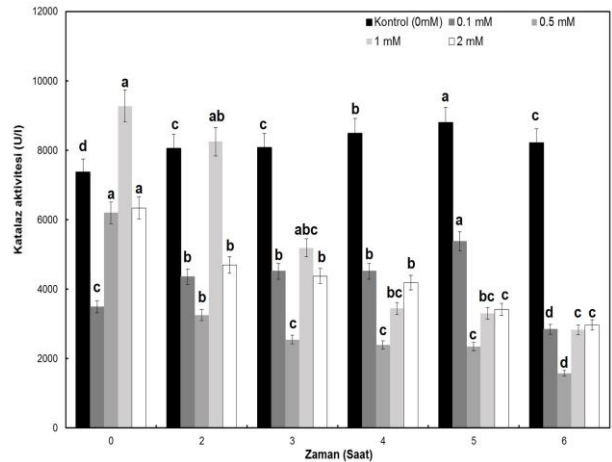
Katalaz enzim üretiminin optimizasyonunda eşit miktarda spordan canlandırma yapılarak büyütülen *A.*

*niger*'de sıcaklığın ve  $H_2O_2$ 'nin katalaz üretimine olumlu/olumsuz etkileri araştırılmıştır. Buna göre, katalaz aktivitesinin en yüksek bulunduğu değer küfün  $37^\circ C$  sıcaklıkta (Tablo 1) büyütüldüğü ve  $H_2O_2$ 'nin büyüme ortamına eklenmediği (Şekil 2) koşullarda ölçülmüştür.

**Tablo 1.** Sıcaklığın katalaz üretimine etkisi

Sıcaklık ( $^\circ C$ )	Katalaz aktivitesi (U/l)
30	8688±480b
37	<b>9128±148a</b>
45	6269±937c
47	-d
50	-d
55	-d

Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ( $p < 0.05$ ). Standart sapma ( $\pm SS$ ).



**Şekil 2.** Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) konsantrasyonunun katalaz aktivite üzerine etkisi. *A. niger*, karbon kaynağı olarak %1 (w/v) glukoz içeren 1 litrelik YpSs sıvı büyüme ortamında büyütülmüştür.  $H_2O_2$ , büyüme ortamına enzim üretiminin optimum olduğu yedinci gününde 30'ar dakika arayla eklenmiştir. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Katalaz enziminin üçlü-faz ayırma sistemi ile kısmi saflaştırılması

*A. niger*'den elde edilen süpernatandan (1 mg protein; 79 U/mg) katalaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sistemi Bölüm 2.5'te açıklandığı şekilde uygulanmıştır. Bu amaçla, farklı derişimlerde hazırlanan amonyum sülfat ve t-butanol çözeltileri kullanılmıştır. Öncelikle optimum amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek için ham ekstrakt/t-butanol oranı 1:1 olan farklı amonyum sülfat konsantrasyonları ile hazırlanan sulu üçlü faz sistemlerinde *A. niger* katalazının dağılımı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre *A. niger* katalazı hazırlanan faz kompozisyonlarının çoğunda dağılıma göstermiştir. En yüksek saflaştırma katsayısı (7.0) ve aktivite geri kazanım değerleri (%206), %80 (w/w) amonyum sülfat ile hazırlanan sistemin ara fazında ölçülmüştür.

**Tablo 2.** Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonunun TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi

	SA (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	PF	%R	
Ham ekstrakt	79	79	1.0	1.0	100	
%40 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	-	0.1	-	-	
	Alt faz	316	151	0.5	4.0	191
%50 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	24	13.4	0.6	0.3	17
	Alt faz	71	40	0.6	0.9	51
%60 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	103	104	0.9	1.3	132
	Alt faz	270	27	0.1	3.4	34
%70 (w/w) AS	Üst faz	97	67	0.7	1.2	85
	Ara faz	75	13	0.2	3.0	160
	Alt faz*	-	-	-	-	-
%80 (w/w) AS	Üst faz	-	0.3	-	-	
	<b>Ara faz</b>	<b>540</b>	<b>162</b>	<b>0.3</b>	<b>7.0</b>	<b>206</b>
	Alt faz	79	32	0.4	1.0	40
%90 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	383	115	0.3	5.0	146
	Alt faz*	-	-	-	-	-

\*Bu fazlarda enzim aktivite ve protein miktar tayinleri negatif sonuç vermiştir. SA: spesifik aktivite, PF: Saflaştırma katsayısı, %R: Enzim aktivite geri kazanımı. Sistem pH'sı 6.0, sıcaklığı ise 25°C'dir.

Daha sonra amonyum sülfat konsantrasyonu (80%, w/w) sabit tutularak farklı ham ekstrakt/t-butanol oranlarında hazırlanmış sistemlerde spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Bir önceki basamakta enzimin seçici olarak ara fazda toplandığı belirlendiğinden sadece ara faz sonuçları değerlendirilmiştir. Tablo 3'de belirtildiği üzere enzimin saflık derecesi 1:1, 1:1.5 ve 1:2 sistemlerinde 1:0.5'e göre daha iyi çıkmıştır. 1:1.5 oranında hazırlanan sistemde maksimum saflaştırma katsayısı (7.7) ve aktivite geri kazanımı (%212) elde edilmiştir. Bu sebeple, ileriki denemeler ham ekstrakt:t-butanol oranının 1:1.5 olduğu sistemlerde yapılmıştır.

**Tablo 3.** Ham ekstrakt/t-butanol oranının TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi

	SA (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	PF	%R
HE	79	79	1.0	1.0	100
HE: t-but 1.0:0.5	158	96	0.6	2.0	121
HE: t-but 1.0:1.0	540	162	0.3	7.0	206
HE: t-but <b>1.0:1.5</b>	<b>611</b>	<b>168</b>	<b>0.3</b>	<b>7.7</b>	<b>212</b>
HE: t-but 1.0:2.0	466	161	0.3	5.9	204

HE: Ham ekstrakt, t-but: t-butanol, SA: spesifik aktivite, PF: Saflaştırma katsayısı, %R: Enzim aktivite geri kazanımı. Sistem pH'sı 6.0, sıcaklığı ise 25°C'dir.

Optimum sistem pH'sını tayin etmek için ham ekstrakt %80 (w/w) amonyum sülfatla doyurulduktan sonra sistem pH'sı ayarlanmıştır. Tablo 4, farklı pH'larda hazırlanan sistemlerde ölçülen enzim aktivite ve miktar bulgularını göstermektedir. En yüksek saflaştırma katsayısı (7.9)

ve aktivite geri kazanım değerleri (%263), pH'sı 7.0 olan sistemde ölçülmüştür.

**Tablo 4.** TPP sistem pH'sının katalaz ayırımına etkisi

	SA (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	PF	%R
HE	79	79	1.0	1.0	100
pH 3.0	142	16	0.1	1.8	20
pH 4.0	158	28	0.2	2.0	35
pH 5.0	198	36	0.2	2.5	45
pH 6.0	611	168	0.3	7.7	212
<b>pH 7.0</b>	<b>624</b>	<b>208</b>	<b>0.3</b>	<b>7.9</b>	<b>263</b>
pH 8.0	174	28	0.2	2.2	36
pH 9.0	150	19	0.1	1.9	24

HE: Ham ekstrakt, t-but: t-butanol, SA: spesifik aktivite, PF: Saflaştırma katsayısı, %R: Enzim aktivite geri kazanımı. Sistem sıcaklığı 25°C'dir.

### 3.4. SDS-PAGE analizi

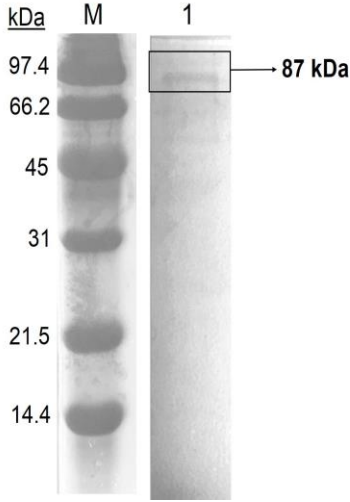
TPP sistemi ile saflaştırılan katalaz enziminin saflığının kontrolü %15'lik SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Elektroferez sonrası jel, gümüş boyama metodu ile boyanmıştır. Şekil 3'de görüldüğü üzere örneğe ait yaklaşık 87 kDa civarında tek bir bant gözlenmiştir.

### 3.5. *A. niger* katalazının biyokimyasal karakterizasyonu

#### 3.5.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi ve dayanıklılığı üzerine etkisinin incelenmesi denemelerinde TPP sistemi ile kısmen saflaştırılmış enzim kullanılmıştır. Optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için enzim aktivite

ölçümleri 30 ila 70°C arasında değişen sıcaklıklarda yapılmıştır. En yüksek aktiviteler 50-60°C arasında ölçülmüş olup maksimum aktivite değerine 50°C'de ulaşılmıştır (Şekil 4A).



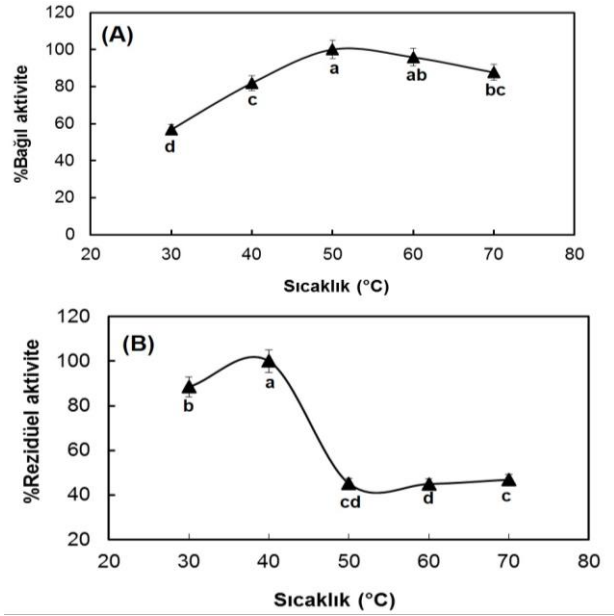
**Şekil 3.** *A. niger*'den TPP ile saflaştırılan katalazın SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (marker) (Bio-Rad Unstained SDS-PAGE Standards, Amerika); 1, %80 (w/w)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konsantrasyonunda, 1:1.5 ham ekstrakt/t-butanol oranında ve pH 7.0'da hazırlanmış sistemden izole edilen katalaz örneği.

Termal kararlılık testlerinde ise enzim yukarıda belirtilen sıcaklık aralığında yaklaşık 60 dak inkübe edildikten sonra örnekler 25°C'ye (aktivite ölçüm sıcaklığı) soğutulmuş ve aktivite ölçümleri standart koşullarda (pH 7.0, 25°C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4B'de görüldüğü üzere enzim 40°C'de aktivitesini korumaktadır. Ancak 40°C'den sonra aktivitede %53-55 oranında kayıp gözlenmiştir.

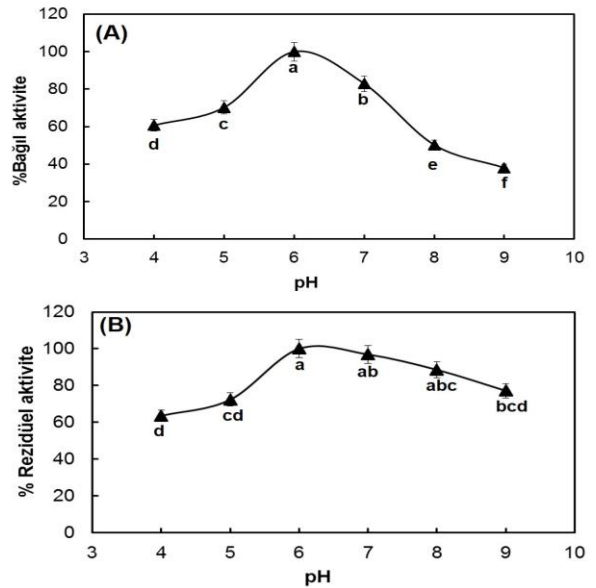
### 3.5.2. Ortam pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Katalaz enzimi için optimum reaksiyon pH değeri 6.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 5A). Diğer yandan pH 7.0'da, pH 6.0'da ölçülen aktiviteye göre yaklaşık %82'sinin, pH 5.0'da ise %70'inin korunduğu gözlenirken 8.0 ve üzerindeki pH değerlerinde ise aktivitede hızlı bir düşüş olduğu görülmüştür.

Enzimin pH kararlılığını tayin etmek için saflaştırılmış örnek pH'sı 4.0'dan 9.0'a kadar değişen farklı tampon çözeltilerde yaklaşık 60 dak bekletildikten sonra standart koşullarda (pH 7.0, 25°C) aktivite analizleri yapılmıştır. Buna göre, katalaz enziminin aktivitesini en iyi koruduğu pH değeri 6.0'dır (Şekil 5B). Bu değer üzerinde rezidüel aktivitede pH artışına bağlı olarak kademeli bir düşüş gözlenirse de bu düşüş en fazla %77-97 arasındadır. Benzer şekilde düşük pH değerlerinde de aktivitenin %63'ünden fazlasının korunduğu görülmektedir.



**Şekil 4.** Sıcaklığın *A. niger* katalaz (0.022 mg protein/ml) aktivitesi ve kararlılığına etkisi. Enzim aktivite ölçümlerinde 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 100 mM Sodyum fosfat tampon çözeltisinden (pH 7.0) oluşan karışım kullanılmıştır. (A) Farklı reaksiyon sıcaklığı değerlerinde ölçülen bağlı aktivite grafiği (B) Farklı sıcaklıklarda enzimin 60 dak inkübasyon sonrası standart aktivite (pH 7.0, 25°C) ölçümlerine dayalı rezidüel aktivite grafiği. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 5.** Ortam pH'sının *A. niger* katalaz (0.022 mg protein/ml) aktivitesi ve kararlılığına etkisi. Enzim aktivite ölçümlerinde 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 100 mM Sodyum fosfat tampon çözeltisinden (pH 7.0) oluşan karışım kullanılmıştır. (A) Farklı reaksiyon pH değerlerinde ölçülen bağlı aktivite grafiği (B) Farklı pH değerlerinde hazırlanan tampon çözeltilerde enzimin 60 dak inkübasyon sonrası standart aktivite (pH 7.0, 25°C) ölçümlerine dayalı rezidüel aktivite grafiği. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ( $p < 0.05$ ).



### 3.5.3. Organik çözücülerin etkisi

Biyotransformasyon uygulamalarında çoğunlukla organik çözücüler kullanılmaktadır [31]. Bu nedenle, biyokatalizör olarak katalazın bazı organik çözücüler varlığında aktivitesinde meydana gelebilecek olası değişiklikleri analiz etmek üzere enzim aktivite ölçümleri etanol, metanol, aseton ve DMSO varlığında yapılmıştır. Bulgular Tablo 5'de gösterilmektedir.

Organik çözücülerin eklendiği reaksiyon ortamlarında genel olarak çözücü konsantrasyonunun artışına bağlı olarak aktivitede kademeli olarak azalma gözlenmiştir. Kullanılan çözücüler içinde katalaz enzimini olumsuz yönde en fazla etkileyen asetonur. %5 (v/v) ve üzeri konsantrasyonlarda aktivite tamamen inhibe olmuştur (Tablo 5). Diğer yandan etanol enzim aktivitesi üzerinde %7.5'e (v/v) kadar önemli düzeyde bir azalmaya sebep olmamıştır. Fakat, %10 (v/v) derişiminde reaksiyon ortamına eklendiğinde kontrole göre (çözücü eklenmemiş ortam) aktivitenin yaklaşık %56 kadarı kaybolmuştur. Metanol ve DMSO eklenmesi ise %2.5'lük (v/v) derişimlerinde aktivitenin yaklaşık yarısının kaybolmasına sebep olurken %10'da (v/v) metanol enzimi tamamen inhibe etmiştir.

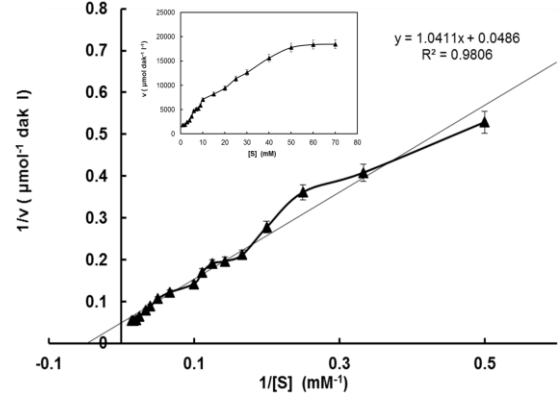
### 3.5.4. $K_m$ ve $V_{max}$ tayini

*A. niger* katalazına ait  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması için oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 6'da verilmiştir. Enzimin hızını ve substratına olan afinitesini belirten bu değerlerin hesaplanması amacıyla katalaz enziminin substratı olan  $H_2O_2$ 'nin 0.1 - 70 mM aralığındaki konsantrasyonlarında aktivite tayini yapıldı. Lineweaver-Burk diyagramından ( $1/S$ 'ye karşı  $1/V$ )  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 21.4 mM ve 20.000  $\mu\text{mol/dak/l}$  olarak belirlendi.

### 3.5.5. Oksidatif/Peroksidatif substratların belirlenmesi

*A. niger* katalazında diğer katalazlarda [15, 28, 30, 32, 33, 34, 35] olduğu gibi peroksitten bağımsız ikincil aktivitenin varlığını araştırmak üzere farklı peroksidaz ve oksidaz substratlarına karşı aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular

Tablo 6'da gösterilmiştir. Buna göre *A. niger*'den izole edilen katalazın polifenol oksidaz (substrat ilgisi: 4-metil katekol>katekol) aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.



**Şekil 6.** Katalaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat [S]: Hidrojen peroksit,  $H_2O_2$ ) [29]. Ekli küçük resim,  $H_2O_2$  konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiğini göstermektedir. Hata çubukları, *Sigmaplot* 14.0 (Systat Software Inc.) kullanılarak hesaplanmış olup her bir verinin ortalamaya göre ne kadar uzaklıkta olduğunu göstermektedir.

**Tablo 6.** *A. niger* katalazının farklı oksidatif/peroksidatif substratlarına ilgisi ve *T. versicolor* lakkazı ile turp peroksidazıyla karşılaştırılması

Substrat (mM*)	%Bağıl Oksidatif/Peroksidatif aktivite		
	<i>A. niger</i> katalazı	<i>T. versicolor</i> lakkazı	Turp peroksidazı
4-Metil Katekol (100 mM)	100	3.4	-
Katekol (100 mM)	1.8	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 [22, 53] seçilmiştir.

**Tablo 5.** Organik çözücülerin katalaz aktivite üzerine etkisi

Organik çözücü	% v/v	Bağıl katalaz aktivitesi (%)	Organik çözücü	% v/v	Bağıl katalaz aktivitesi (%)
Negatif kontrol (organik çözücü yok)		100	Negatif kontrol (organik çözücü yok)		100
	2.5	98		2.5	59
	5	87		5	-
Etanol	7.5	81	Aseton	7.5	-
	10	44		10	-
	2.5	45		2.5	49
Metanol	5	25	DMSO	5	45
	7.5	29		7.5	33
	10	-		10	31

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Küfler doğada hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunan çok hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Bunlardan *Aspergillus*, nem içeren hemen her ortamda kolaylıkla gelişebilen ve yaklaşık 340 mantar türünden oluşmuş bir cinstir [36]. Doğadaki esas işlevi karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir, biyodegradasyonda da rol alır. *Aspergillus*'lar ekonomik, ekolojik ve tıbbi yönden önemlidirler [37]. Bunlardan *A. niger* ağırlıklı olarak büyük ölçekli enzim, organik asit ve biyoaktif bileşiklerin üretiminde kullanılmaktadır [36]. Bu nedenle *A. niger*, endüstriyel açıdan önemli bir suştur.

Genel olarak mantarlar tarafından üretilen katalazların kinetik ve biyokimyasal özellikleri hakkında literatürdeki bilgiler sınırlıdır. Son zamanlarda hidrojen peroksitin endüstride kullanımının artması, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin su ve oksijene dönüştürülmesini sağlayan ekonomik ve kararlı katalaz enziminin üretilmeye çalışılmasını gerekli kılmıştır [38]. Yakın bir geçmişte termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum* tarafından büyümeye paralel olarak üretilen ve monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olduğu kristal yapısı belirlenerek bulunan enzimin hidrojen peroksit yokluğunda çeşitli *orto-* ve *para-*difenolik bileşikler okside ettiği rapor edilmiştir [15, 39]. *Scytalidium* katalazında gözlenen bu ikincil aktivitenin varlığı memeli katalazı [30] başta olmak üzere, *Bacillus pumilus* [32], *Thermobifida fusca* [33] ve *Amaranthus cruentus* [34-35] gibi mikrobiyal ve bitkisel kaynaklı katalazlarda da vurgulanmıştır. Ayrıca *Corynebacterium glutamicum* ve insan eritrositleri gibi çeşitli kaynaklardan izole edilen ticari katalazlarda benzer oksidaz aktivite gözlenmiştir [15]. Buradan, ikincil aktiviteye sahip katalaz türü enzimlerin çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada, mezofilik bir ökaryot olan *A. niger*'de üretilen katalazın saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Buna göre öncelikle enzim kaynağı olarak kullanılan *A. niger*'in zamana bağlı katalaz üretimi analiz edildi. Elde edilen bulgular, *A. niger*'de büyümeye paralel olarak katalaz aktivitesinin arttığını; en yüksek değerine küfün durağan faza geçmesi ile ulaştığını göstermiştir (Şekil 1). Bu durum şaşırtıcı değildir; çünkü bilindiği gibi kesikli kültürlerde mikroorganizmalar substrat ve besin kaynakları ile oksijenin tüketilmesi sonucu durağan faza girerler. Bu sırada oksidatif stres varlığında çok sayıda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur [40, 41]. Katalazlar ise antioksidan enzimler olup esas işlevleri stres varlığında hücrede meydana gelen bu ROS'ları ortamdan uzaklaştırmaktır [3]. Bu nedenle hücre büyümesi sırasında radikal üretiminin artmasına bağlı olarak baş edebildiği sürece katalaz aktivitesinin artması beklenir [42]. Ayrıca *Escherichia coli* tarafından üretilen monofonksiyonel katalaz HP11

(Hidroperoksidaz II) enzim sentezinin durağan fazda arttığını gösteren rapor, çalışma bulgularımızı destekler niteliktedir [43].

*A. niger*'de katalaz üretimini arttırmak için ısı şoku ve oksidatif stres denemeleri gerçekleştirildi. Çünkü enzim üretiminin bazı *Aspergillus*'larda oksidatif stres veya ısı şokuna bağlı olarak hücrede artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı savunma amacıyla arttığına dair raporlar bulunmaktadır [44, 45]. Çalışmada elde edilen bulgular, en yüksek katalaz aktivitesinin 37°C'de büyütülen küfte ölçüldüğünü göstermektedir (Tablo 1). Bu sıcaklığın üzerinde aktivitede anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. 45°C'de aktivite optimum değere göre sadece %31 oranında azalırken 50°C ve üzerinde gelişme olmamasına bağlı olarak aktivite tamamen gelişmemiştir (Tablo 1). Mezofilik bir canlı olarak *A. niger*'in 50°C ve üzerinde büyümesinin durması beklenen bir durumdur. Literatürde katalaz kaynağı olarak kullanılan çeşitli *Aspergillus* suşlarıyla yapılan çalışmalarda sıcaklık olarak genellikle 30°C tercih edilirken [14], bu çalışmada daha yüksek sıcaklıklarda (37-45°C) katalaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda gelişen mikroorganizmalardan sıcaklığa dayanıklı enzimler üretilir [40]. Bu nedenle literatürde katalaz üreticisi olarak kullanılan *Aspergillus*'lara kıyasla daha yüksek sıcaklıkta büyütülebilen *A. niger*'in kullanılmasının ticari enzim uygulamalarında bir avantaj oluşturacağı önerilebilir.

Katalaz üretimi için oksidatif stres yaratmak üzere büyüme ortamına Bölüm 2.1'de belirtilen şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi. ROS olarak bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin test edilen hemen hemen tüm derişimlerinde negatif kontrole (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'siz ortam) göre daha düşük katalaz aktivitesi gözlemlendi (Şekil 2). Sadece 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin eklendiği an (t=0) katalaz üretiminde negatif kontrole göre %5'lik bir artış görüldü; ancak bu artış inkübasyonun ilerleyen zamanlarında kademeli olarak kayboldu. 1 mM derişimde diğer konsantrasyonlara göre aktivite daha yüksek ölçülmesine rağmen gözlenen bu artış negatif kontrolden daha düşük seviyededir. Bulgular, *A. nidulans* katalazı için rapor edilenden [45] farklı olarak, oksidatif stresin olumlu etkisinin olmadığını göstermektedir. Genel olarak peroksidaz aktivitesi gösteren katalazların oksidatif stres varlığında sentezinin tetiklendiği, diğer yandan monofonksiyonel katalazların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den etkilenmediği bilinmektedir [43]. Bu durum çalışmada kullanılan *A. niger* katalazının monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olabileceğine işaret etmektedir.

Katalaz enziminin *A. niger*'den saflaştırılmasında düşük maliyette ve yüksek verimle çalışan bir izolasyon yöntemi olarak tanımlanan TPP sistemi [6] kullanıldı. Bu sistemin tercih edilmesinin başlıca sebebi, enzimin ham örnekten tek basamakta saflaştırılmasını mümkün kılmasıdır. Literatürde katalaz enziminin saflaştırılması üzerine çok sayıda rapor mevcuttur. Ancak hepsinin ortak özelliği birden



fazla aşamadan oluşmasıdır ki bu durum verimi azaltırken maliyeti yükseltir. Örneğin, *Nerospora crassa* katalazı asetonla çöktürme, ardından amonyum sülfatla çöktürme ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Fenil Sefaroz Kolonu ile) olmak üzere üç basamakta saflaştırılmıştır. Benzer şekilde, *Septoria tritici* katalazı diyaliz işlemi takiben iyon değişim kromatografisi (DEAE-C, DietylAminoEtil Selüloz) ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi (Fenil Sefaroz Kolonu ile) kullanarak saflaştırılmıştır. *S. thermophilum* katalazının da yine üç basamakta (amonyum sülfatla çöktürme, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri) saflaştırıldığı rapor edilmiştir [14].

TPP sistemini etkileyen çok sayıda faktör bulunduğundan, proteinlerin karışık bir ortamdan etkili bir şekilde ayrılması için saflaştırma işlemi etkileyen her bir parametrenin ayrı ayrı incelenmesi gerekir [6]. Bu sebeple, katalaz enziminin ayrımını etkileyen parametreler (amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt:t-butanol oranı ve sistem pH'sı) sırayla incelendi. Hazırlanan sistemlerin hepsinde başlangıçta kullanılan örnekteki toplam protein miktarı 1 mg (79 U katalaz aktivitesi içeren) olarak belirlendi ve enzimin işlem sonunda seçici bir şekilde ara fazda dağıldığı görüldü. Sistem parametrelerinin saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanıma olan etkileri sırasıyla Tablo 2-4'de gösterilmektedir. Tablolardan görüldüğü üzere, tüm parametreler katalaz enziminin *A. niger*'den saflaştırılmasında etkin rol oynamaktadır.

Amonyum sülfat konsantrasyonu, TPP sisteminde kritik bir öneme sahiptir. Dolayısıyla karışımdan katalaz enziminin yeterli miktarda ayrımı için optimize edilmesi gerekir. Bunun için genellikle %20 (w/w) gibi minimum konsantrasyonda örnek çözeltilisinin hazırlanmasıyla başlanır ve yavaş yavaş konsantrasyon artırılarak istenilen protein ara fazda çöktürülmesi için optimizasyonu yapılır [6]. Tablo 2, farklı amonyum sülfat doyumluklarında hazırlanmış çözeltilerden (ham enzim ekstraktına eşit hacimde t-butanol eklenerek) ara faza ayrılmış olan katalaz enziminin saflaştırma analiz sonuçlarını göstermektedir. Buna göre, en yüksek saflaştırma katsayı (7.0) ve aktivite geri kazanım değeri (206) %80 amonyum sülfat doyumluğunda hazırlanmış sistemden elde edilmiştir. TPP sistemlerinde enzim aktivasyonuna sıklıkla karşılaşılmaktadır. Örneğin, pektinaz [8], peroksidaz [46], proteinaz K [47] ve tripsin inhibitör [48] gibi proteinlerin sulu üçlü-faz sistemlerinden saflaştırılmaları sırasında katalitik aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Bu durumun saflaştırma sırasında enzim molekülünün esnekliğinde meydana gelen artışla bağlantılı olabileceği açıklanmıştır. Düşük sulu çözeltilerde enzimin yapısında meydana gelen değişiklikler enzimin aktivasyonuna neden olabilmektedir [6].

Sisteme eklenen t-butanol miktarının da TPP'de önemli bir diğer faktör olması sebebiyle karışımdaki ham ekstrakt:t-butanol oranı optimize edildi. En iyi sonuçlar %80 (w/w) amonyum sülfat doyumluğunda hazırlanan ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1.0:1.5 olan sistemden ölçüldü (Tablo 3). %80 (w/w) amonyum sülfat içeren ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1.0:0.5, 1.0:1.0 ve 1.0:2.0 olacak şekilde hazırlanan sistemlerinden ise sırasıyla 2.0, 7.0 ve 5.9 kat enzim saflaştırılırken aktivite geri kazanım değerleri sırasıyla %121, %206 ve %204 şeklinde belirlendi. Enzimi saflaştırmak amacıyla kullanılan TPP sistemlerinde, t-butanol ayırmada en iyi sonucu verdiği için genelde yardımcı organik çözücü olarak seçilmektedir. Ayrıca, t-butanolun büyük ve dallanmış bir yapıya sahip olması sebebiyle katlanmış proteinin içine kolaylıkla giremeyeceği, dolayısıyla protein denatürasyonuna sebep olmayacağı düşünülmektedir [6]. Nitekim bu çalışmada t-butanolün katalaz aktivitesi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir.

Proteinlerin TPP sistemlerinde etkin bir şekilde çöktürülmesi sülfat konsantrasyonuna bağlı olduğu gibi proteinlerin net yüküne de bağlıdır. TPP sistemlerinde ham ekstrakt olarak farklı izoionik noktalara sahip bir protein karışımının kullanılması durumunda, pH'nın protein ayrımına etkisini tayin etmede pH'sı 3.0'den 7.0'ye kadar değişen sistemler hazırlanabilir [6]. Katalaz enziminin TPP sistemlerinde ayrımına pH'nın etkisi Tablo 4'te gösterilmiştir. Buna göre, pH 7.0'de hazırlanan sistemde katalaz karışımdaki diğer proteinlerden seçici bir şekilde ayrılarak ara faza geçmiştir. Diğer yandan, düşük ve yüksek pH'larda saflaştırma etkinliğinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, H<sup>+</sup> (asidik koşullarda) veya OH<sup>-</sup> (bazik koşullarda) iyonlarının aşırı miktarlarda bulunması ile açıklanabilir. Bu iyonlar ortamda yüksek seviyede bulunduğu karışımdaki katalaz enzimi ile yarışarak enzimin çözücü ile etkileşimini engelleyebilir ve sonuçta katalazın çözücünden uzaklaşarak orta faza geçmesini engellemiş olabilir [46].

Saflaştırılan katalaz enzim örneği SDS-PAGE ile analiz edildiğinde jel üzerinde tek bir bant gözlenmiş olup bu bant yaklaşık 87 kDa'ya denk gelmektedir (Şekil 3). Bu bulgu, çalışılan enzimin tipik bir monofonksiyonel katalaz olduğunu doğrular niteliktedir. Çünkü bu büyüklük değeri (87 kDa), büyük alt üniteli monofonksiyonel katalazlar için rapor edilen değer (>75 kDa) aralığında yer almaktadır [49].

Saflaştırılmış enzimin karakterizasyonu için enzim aktivitesini ve dayanıklılığını etkileyen bazı parametreler seçilerek bunların etkileri analiz edildi. Karakterizasyon sonuçları Şekil 4-6 ve Tablo 5-6'da verilmektedir.

Katalaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 30-70°C sıcaklık aralığında incelenmiş olup enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlendi (Şekil 4A). Ayrıca 40 ila 70°C gibi geniş sıcaklık aralığında aktivitenin %80'den fazlasının korunmuş olduğu gözlemlendi. Elde edilen bulgular literatürde katalaz için rapor edilen sıcaklık değerleri ile uyumludur. Genel olarak, farklı küf ve mayalardan izole edilen katalazlar için optimum reaksiyon sıcaklık aralığı 30 ila 85°C arasında değişmektedir [14].

Enzimin termal kararlılığı, substratı bulunmayan bir ortamda enzimin sıcaklığa karşı yapısının bozulmadan kalması için gösterdiği direnci yansıtmaktadır. Katalaz enziminin termal kararlılığını test etmek üzere enzim 30-70°C sıcaklık aralığında 60 dak süreyle inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra rezidüel aktivitesi ölçüldü. Sonuçta, katalazın yüksek düzeyde kararlı kaldığı sıcaklık değerinin 40°C olduğu gözlemlendi. Bu sıcaklık değerinin üzerinde ise aktivite hızlı bir şekilde optimum aktivite değerinin %45'ine kadar düşüş gösterdi. Diğer yandan 50-70°C sıcaklık aralığında aktivitede önemli bir değişiklik olmamakla birlikte belirtilen sıcaklık aralığında 40°C'de ölçülen aktivitenin %55'inin hala korunmuş durumda olduğu bulundu (Şekil 4B). Bulgular, literatürle daha önceden yayınlanan raporlar ile uyumludur [14].

Katalaz aktivitesine pH'nın nasıl etki ettiğini gözlemlemek üzere ise saf enzim örneğinin pH'sı 4.0 ila 9.0 arasında değişen reaksiyon ortamlarında bağlı aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5A). Buna göre katalaz için optimum reaksiyon pH değerinin 6.0 olduğu belirlendi. Ayrıca 4.0-7.0 pH aralığında enzimin oldukça aktif olduğu görüldü; bu aralıkta enzimin başlangıç aktivitesinin %50'sinden fazlası korunmuştur. *A. niger* katalazı için bulunan optimum pH değeri (6.0), bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonad* EF'den, mantarlardan ise *Septoria tritici*'den izole edilen katalazlarla benzerlik göstermektedir [14].

Enzimin pH kararlılığı analizi için saf enzim örneği pH'sı 4.0 ila 9.0 arasında değişen tampon çözeltilerde yaklaşık 60 dak inkübasyon bırakıldı ve akabinde bağlı aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5B). Buna göre enzimin 6.0-7.0 pH aralığında oldukça aktif olduğu gözlemlendi. Belirtilen bu aralıkta başlangıç aktivitesinin %96'dan fazlası korunmuştur. Ayrıca, pH 9.0'da başlangıçtaki aktivitenin %77'si, pH 4.0 ve 5.0'te ise sırasıyla %64 ve %72'si korunmuştur. Buradan enzim aktivitesinin test edilen tüm pH'larda %60'dan fazlasının korunduğu, dolayısıyla oldukça geniş bir pH aralığında enzimin bozulmadan kalabildiği görülmektedir. Enzimin farklı pH'larda kararlı özellik göstermesi endüstriyel uygulamalar açısından önemlidir. Süreçlerin uzamasından kaynaklı olarak ortam pH'sına uzun süre maruz kalabilecek bir enzim için bu parametre önem arz etmektedir [47].

Organik çözücüler proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Genelde proteindeki kovalent olmayan bağlar, iyonik gruplar ve dipoller, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi özellikleri değiştirirler. *A. niger* katalazının organik çözücülere olan dayanıklılığı Etanol>DMSO>Metanol>Aseton şeklindedir (Tablo 5). Etanol, %7.5'lük (v/v) derişime kadar reaksiyon ortamına konulabilirken diğer çözücüler aktivitede daha büyük kayıplara sebep olmaktadır.

Enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 21.4 mM ve 20,000  $\mu\text{mol/dak/l}$  (Şekil 6) olarak hesaplandı. Benzer  $K_m$  değeri *Neurospora crassa*'dan (maya, 21.7 mM) izole edilen katalazda da ölçülmüştür [50]. Ayrıca bakterilerden *Methanosarcina barkeri* ve *Oceanobacillus oncorhynchi* katalazlarında  $K_m$  değerleri sırasıyla 25 ve 24 mM olarak bulunmuştur [51, 52]. Katalaz enziminin çeşitli oksidaz/peroksidaz substratlarına olan ilgisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen spektrofotometri analizlerinde hidrojen peroksit yokluğunda 4-metil katekol ve katekolü okside edebildiği görüldü (Tablo 6). Diğer yandan guaiakol, hidrokinon, pirogallol, ABTS ve L-tirozin üzerinde herhangi bir etki gözlenmedi. Bu durum *A. niger* katalazının özellikle *orto*-difenolik bileşikler üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir [22, 28, 39].

Basit, hızlı ve ekonomik bir yöntem olarak tanımlanan TPP sisteminin çeşitli endüstriyel uygulamalarda protein geri kazanımı açısından faydalı bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, TPP sistemi kullanılarak ilk kez katalaz enzimi *A. niger*'den tek basamakta başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Sistemden elde edilen katalaz enziminin geniş pH aralığında kararlı olması, etanole karşı göstermiş olduğu dayanıklılık ve ikincil oksidaz aktivite yetenekleri endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak işlev görebileceği sinyalini vermektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No:2017/90) tarafından desteklenmiştir. İstatistiksel analiz bulgularına katkılarından dolayı Dr. Arda Acemi'ye teşekkürlerimizi sunarız.

## Kaynakça

- [1] Switala, J., Loewen, P. C. 2002. Diversity of properties among catalases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 401, 145-154.
- [2] Calera, J. A., Sánchez-Weatherby, J., López-Medrano, R., Leal, F. 2000. Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. FEBS Letters, 475, 117-120.

- [3] Hansberg, W., Salas-Lizana, R., Domínguez, L. 2012. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525, 170–180.
- [4] Paris, S., Wyson, D., Debeaupuis, J-P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R. D., Latge, J-P. 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 71, 3551–3562.
- [5] Witteveen, C. F. B., Veenhuis, M., Visser, J. 1992. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1190–1194.
- [6] Dennison, C., Lovrien, R. 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression and Purification*, 11, 149–161.
- [7] Duman, Y., Kaya, E. 2014. Purification and recovery of invertase from potato tubers by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39, 443–448.
- [8] Sharma, A., Gupta, M. N. 2001. Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters*, 23, 1625–1627.
- [9] Duman, Y., Kaya, E. 2013. Purification, recovery, and characterization of chick pea  $\beta$ -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique. *Protein Expression and Purification*, 91, 155–160.
- [10] Saxena, L., Iyer, B. K., Ananthanarayan, L. 2007. Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry*, 42, 491–495.
- [11] Roy, I., Gupta, M. N. 2002. Three-phase affinity partitioning of proteins. *Analytical Biochemistry*, 300, 11–14.
- [12] Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H., Önal, S. 2011. Purification of  $\alpha$ -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. *Separation and Purification Technology*, 83, 130–136.
- [13] Roy, I., Sharma, A., Gupta, M. N. 2004. Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial purification of *Aspergillus niger* xylanase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1698, 107–110.
- [14] Sooch, B. S., Kauldhar, B. S., Puri, M. 2014. Recent insights into microbial catalases: isolation, production and purification. *Biotechnology Advances*, 32, 1429–1447.
- [15] 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. 2013. Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*. *Acta Crystallographica Section D*, 69, 398–408.
- [16] Kacem-Chaouche, N., Destain, J., Meraihi, Z., Dehimat, L., Haddoum, T., Wathelet, J. P., Thonart, P. 2013. Optimization of extracellular catalase production from *Aspergillus phoenicis* K30 by a linear regression method using date flour as single carbon source and purification of the enzyme. *African Journal of Biotechnology*, 12, 2646–2653.
- [17] Tian, Y. S., Xu, H., Peng, R. H., Yao, Q. H. 2013. Heterologous expression and initial characterization of the peroxisomal catalase from the methylotropic yeast *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 507–513.
- [18] Garay-Flores, R. V., Segura-Ceniceros, E. P., De Leon-Gamez, R., Balvantin-Garcia, C., Martinez-Hernandez, J. L., Betancourt-Galindo, R., Ramirez, A. R. P., Aguilar, C. N., Ilyina, A. 2014. Production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* free and immobilized in alginate-polyvinyl alcohol beads. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60, 262–269.
- [19] Söyler, B. 2012. Characterization and analysis of the antioxidant capacity of functional phenolics oxidized by *Scytalidium thermophilum* catalase phenol oxidase (CATPO). Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- [20] Chang, Y. C., Tsai, H-F., Karos, M., Kwon-Chung, K. J. 2004. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 888–896.
- [21] Kawasaki, L., Aguirre, J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 183, 1434–1440.
- [22] Ögel, Z. B., Yüzügüllü, Y., Mete, S., Bakir, U., Kaptan, Y., Sutay, D., Demir, A. S. 2006. Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 853–862.
- [23] Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- [24] Alici, E. H., Arabaci, G., 2016. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties.

- International Journal of Biological Macromolecules, 93, 1051–1056.
- [25] Yuzugullu Karakus, Y., Isik, S. 2019. Partial characterization of *Bacillus pumilus* catalase partitioned in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Preparative Biochemistry and Purification*, 49, 391–399.
- [26] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- [27] Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93–99.
- [28] Kocabas, D. S., Bakir, U., Phillips, S. E. V., McPherson, M. J., Ogel, Z. B. 2008. Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 407–415.
- [29] Lineweaver, H., Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, 56, 658–66.
- [30] Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., Laskin, J. D. 2005. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 35372–35381.
- [31] Carrea, G., Riva, S. 2000 Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie International ed. in English*, 39, 2226–2254.
- [32] Sangar, S., Pal, M., Moon, L. S., Jolly, R. S. 2012. A catalase-peroxidase for oxidation of  $\beta$ -lactams to their (R)-sulfoxides. *Bioresource Technology*, 115, 102–110.
- [33] Loncar, N., Fraaije, M. W. 2015. Not so monofunctional—a case of the thermostable *Thermobifida fusca* catalase with peroxidase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2225–2232.
- [34] Chen, N., Teng, X.-L., Xiao, X.-G. 2017. Subcellular localization of a plant catalase-phenol oxidase, AcCATPO, from *Amaranthus* and identification of a non-canonical peroxisome targeting signal. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–11.
- [35] Teng, X.-L., Chen, N., Xiao, X.-G. 2016. Identification of a catalase-phenol oxidase in betalain biosynthesis in red amaranth (*Amaranthus cruentus*). *Frontiers in Plant Science*, 6, 1228.
- [36] Park, H.-S., Jun, S.-C., Han, K.-H., Hong, S.-B., Yu, J.-H. 2017. Chapter Three - Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 161–202.
- [37] Asan, A. 2004. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89, 155–157.
- [38] Wang, H., Tokusige, Y., Shinoyama, H., Fujii, T., Urakami, T. 1998. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus auratiacus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85, 169–173.
- [39] Koclar Avci, G., Coruh, N., Bolukbasi, U., Ogel, Z. B. 2013. Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase–phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 661–672.
- [40] Bender, K. S. Buckley, D. H., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. 2017. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Çeviri Editörü: Çökmüş, C. Ondördüncü baskıdan çeviri, Palme Yayınevi, Ankara, ISBN: 9786053555964.
- [41] Lushchak, V. I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 153, 175–190.
- [42] Yüzüğüllü, Y., Ögel, Z. B., Bakır Bölükbaşı, U., Çoruh, N., Karakaş, G. 2011. Production of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase of *Scytalidium thermophilum* in the presence of phenolic compounds. *Turkish Journal of Biology*, 35, 697–704.
- [43] Mulvey, M. R., Switala, J., Borys, A., Loewen, P. C. 1990. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 6713–6720.
- [44] Noventa-Jordão, M. A., Couto, R. M., Goldman, M. H. S., Aguirre, J., Iyer, S., Caplan, A., Terenzi, H. F., Goldman, G. H. 1999. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology*, 145, 3229–3234.
- [45] Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 179, 3284–3292.
- [46] Yuzugullu Karakus, Y., Acemi, A., Işık, S., Duman, Y. 2018. Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three-phase partitioning and its biochemical characterization. *Separation Science and Technology*, 53, 756–766.
- [47] Singh, R. K., Gourinath, S., Sharma, S., Roy, I., Gupta, M. N., Betzel, C., Srinivasan, A., Singh, T.P. 2001. Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a

- modified serine proteinase at 1.5 Å resolution. *Protein Engineering*, 14, 307–313.
- [48] Wati, R. K., Theppakorn, T., Benjakul, S. Rawdkuen, S. 2009. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. *Process Biochemistry*, 44, 1307–1314.
- [49] Chelikani, P., Fita I., Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192–208.
- [50] Diaz, A., Rangel, P., Oca, Y. M., Lledias, F., Hansberg, W. 2001. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1323–1333.
- [51] Calandrelli, V., Gambacorta, R. I., Carratore, V., Lama, L. 2008. A novel thermo-alkali stable catalase–peroxidase from *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldaniensis*: purification and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2269–2275.
- [52] Shima, S., Netrusov, A., Sordel, M., Wicke, M., Hartmann, G.C., Thauer, R. K. 1999. Purification, characterization and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. *Archives of Microbiology*, 171, 317–323.
- [53] Tauber, H. 1953. Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 205, 395–400.