

Anoxybacillus thermarum A4 Suşunun Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi ve Tam Hücre İmmobilizasyonu [*]

Barbaros DİNÇER^{1*} Murat DURMAZ¹ Ahmet ADIGÜZEL²

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Rize, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye

*[id](https://orcid.org/0000-0001-9591-5411): <https://orcid.org/0000-0001-9591-5411>, [id](https://orcid.org/0000-0001-5061-9483): <https://orcid.org/0000-0001-5061-9483>, [id](https://orcid.org/0000-0001-8848-6647): <https://orcid.org/0000-0001-8848-6647>

Received date: 15.11.2019

Accepted date: 27.12.2019

Atf yapmak için: Dinçer, B., Durmaz, M. & Adıgüzel, A. (2019). *Anoxybacillus thermarum* A4 Suşundaki Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi ve Tam Hücre İmmobilizasyonu. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 581-588.

How to cite: Dinçer, B., Durmaz, M. & Adıgüzel, A. (2019). Investigation of Catalase Activity from *Anoxybacillus thermarum* A4 Strain and Whole Cell Immobilization. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(2), 581-588.

Öz: Yapılan bu çalışma ile *Anoxybacillus thermarum* A4 suşunun, katalaz enzimini üretebilme kapasitesi ve üretilen enzimin bazı kinetik verileri incelendi. Bununla birlikte *A. thermarum* A4 suşunun tam hücre immobilizasyonu agar ve agarose ortamlarında gerçekleştirilerek, katalaz aktivitesi karakterize edildi. A4 suşunun yüksek katalaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. A4 suşu katalazının en yüksek aktivitesini pH 7,0 ve 50°C'de gösterdiği belirlendi. A4 suşu özütü katalazının 17,5±2,2 mM K_m değerine ve 250 000±980 U mg protein⁻¹ V_{maks} değerine sahip olduğu belirlenirken, tam hücre immobilizasyonu sonrası K_m değeri 200±28 mM ve V_{maks} değeri 50.000±413 U g jel⁻¹ olarak belirlendi. *A. thermarum* A4 suşundan elde edilen katalazın sodyum azid, potasyum siyanür, civa (II) klorür ve 3-amino-1,2,4-triazol gibi bilinen katalaz inhibitörleri ile inhibe olduğu belirlendi. Bu çalışma sonucunda, materyal olarak kullanılan *A. thermarum* A4 suşu yüksek bir katalaz aktivitesine sahip olmasından dolayı hidrojen peroksidin kullanıldığı endüstri alanları için bir potansiyel katalaz kaynak olabileceği öngörüldü.

Anahtar sözcükler: Hidrojen peroksit oksidoredüktaz, katalaz, termofilik bakteri.

Investigation of Catalase Activity from *Anoxybacillus thermarum* A4 strain and Whole Cell Immobilization

Abstract: In this study, the capacity of *Anoxybacillus thermarum* A4 strain to produce the catalase enzyme and some kinetic data of the produced enzyme were investigated. In addition, *A. thermarum* A4 strain was performed immobilization of its whole cell in agar and agarose environments, and their catalase activities were characterized. It was determined that A4 strain had high catalase activity. The highest activity of A4 strain catalase was determined at pH 7.0 and 50 °C. While catalase of A4 strain extract was determined to have 17.5 ± 2.2 mM K_m and 250,000 ± 980 U mg protein⁻¹ V_{max}, after whole cell immobilization, K_m value was determined as 200 ± 28 mM and V_{max} was 50,000 ± 413 U g gel⁻¹. The catalase obtained from *A. thermarum* A4 strain was inhibited by known catalase inhibitors such as sodium azide, potassium cyanide, mercury (II) Lys and 3-amino-1,2,4-triazole. As a result of this study, it was envisaged that the *A. thermarum* A4 strain used as material could be a potential catalase source for the industrial areas where hydrogen peroxide was used because of its high catalase activity.

Keywords: Catalase, hydrogen peroxide oxidoreductase, thermophilic bacteria.

GİRİŞ

Katalaz (KAT) (Hidrojen Peroksit; Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz, E.C. 1.11.1.6), H₂O₂' in su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen, tetramerik demir porfirin içeren, yüksek molekül ağırlıklı bir antioksidan enzimdir (Brown-Peterson & Salin, 1995; Gonçalves vd., 1999; Grigoros, 2017).

Günümüz endüstrisinde klasik kimyasal yöntemlerin yerini biyoteknolojik uygulamalar almaktadır. Endüstriyel enzimler arasında yer alan katalazlar; gıda, süt, tekstil, sağlık, kağıt gibi ağartma ve sterilizasyon işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında, hidrojen peroksidin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (Costa vd., 2001, Grigoros, 2017). Özellikle bu endüstri alanlarında H₂O₂'in ağartıcı olarak kullanımının artması, üretim aşamalarında bazı sorunlara sebep olabilmektedir (Weck, 1991). Bu aşamalarda, H₂O₂'in ortamdan uzaklaştırılması için ya aşırı miktarda su ile yıkanmakta ya da atık suda yüksek tuz konsantrasyonuna sebep olan sodyum bisülfid veya hidrosülfid ile indirgenmesi yöntemi kullanılmaktadır (Hillenbrand, 1999).

Katalazın kullanıldığı bazı endüstri alanlarında H₂O₂' in ortamdan uzaklaştırılması işlemi yüksek sıcaklık ve pH'larda gerçekleştirilmektedir. Bundan dolayı yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlı katalazların araştırılması oldukça ilgi çekmektedir (Thompson vd., 2003).

Enzim saflaştırma işlemleri oldukça zahmetli ve pahalı proseslerdir. Serbest enzimler bir kez kullanılabilir ve ortamda safsızlık oluştururlar. Endüstriyel açıdan bu durum uygun olmadığından immobilizasyon yöntemi tercih edilmeye başlanmıştır. İmmobilize enzim, enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi olarak adlandırılır. Sadece enzimleri değil hücre sel organelleri, mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal hücreleri de içeren immobilizasyon yöntemleri mevcuttur (Tischer & Wedekind, 1999). Ayrıca küçük yapıli substratları katalizleyen enzimlerin saflaştırılması yerine tüm hücrenin immobilizasyonu hem maliyet açısından hem de zaman açısından daha avantajlı olacaktır (Kourkoutas, 2004). Bu işlemler için uygun hücrenin seçimi de hücre özütlelerinde yapılacak olan detaylı kinetik çalışmalarla belirlenebilecektir.

Bu çalışmada, *Anoxybacillus thermarum* A4 suşundan endüstriyel öneme sahip olan katalaz enziminin karakterize edilmesi ve farklı materyallerle tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirilerek enzimin davranışlarındaki değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada materyal olarak kullanılan ve yeni bir termofilik bakteri olan *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu (GenBank Number: KC310455), Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından Erzurum Ilıca İlçesi kaplıcalarından izole ve karakterize edilmiştir (Adiguzel vd., 2009).

Termofilik bakterinin katalaz kapasitesinin belirlenmesi (petri testi): *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu Lauria Bertani (LB)-agar besi ortamının (pH 7,0) bulunduğu petri lerde 55 °C'de 12 saat boyunca büyütüldü. Petri lerde büyüyen bakterilerin üzerine 2' şer mL %3'lük H₂O₂ çözeltisi ilave edildi. 30 dakika sonra petri ler üzerinde hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlemlendi (Reiner, 2010; Durmaz, 2012).

Termofilik bakterinin sıvı besi ortamında büyütülmesi: *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu LB sıvı besi ortamında (pH 7,0, 500 mL) 55 °C' de 12 saat boyunca büyütüldü. Büyütülen kültür 10 °C ve 8.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelek (yaklaşık yaş ağırlığı 1 g) 5 mL özütleme çözeltisinde (pH 7,0'de, 50 mM potasyum fosfat tamponunda) süspansiyon edildi. Daha sonra çözelti, buz banyosu içinde 2 dakika sonifikasyona tabi tutuldu. Oluşan karışım 10.000 rpm' de 20 dakika santrifüjlendi ve elde edilen berrak süpernatant, hücre içi katalaz kaynağı olarak -20 °C'de saklandı (Durmaz, 2012).

Protein tayini: Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanıldı.

Enzim aktivitesinin belirlenmesi: Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi. 1 mL'lik kuartz küvet içinde 25 °C'de 600 µL 30 mM H₂O₂ çözeltisi, 300 µL 50 mM fosfat (pH 7,0) tamponu ve 100 µL enzim

çözeltisi karışımının 240 nm'de ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Hildebrandt & Roots, 1975; Vatsyayan & Goswam, 2016) absorbansındaki azalma $\pm 0,001$ hassasiyetle kaydedildi (Hatchikian vd., 1972; Wang vd., 2017). Bir ünite enzim, 1 dakikada $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ' in bozunması için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlendi (Aebi, 1984). Özgün aktivite, mg protein başına aktivite olarak belirlendi.

Doğal elektroforez: Katalaz aktivitesini gösteren proteinlerin belirlenmesi için %10'luk poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanıldı (Laemmli (1970)). Elde edilen jel 3 kez 10^7 ar dakika saf suda bekletildikten sonra H_2O_2 çözeltisinde ($10 \mu\text{L } \%30$ 'luk H_2O_2 100 mL'ye saf su ile seyreltilmiş) 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolar dolmaz jelden H_2O_2 saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Doğal boyama için taze hazırlanmış %2'lik FeCl_3 ve %2' lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltilerinin karışımı kullanıldı. Jelde yeşil rengin görüldüğü an, jel saf su ile yıkandı. Jelde boyanmayan yerler katalaz aktivitesi olarak belirlendi (Woodbury vd., 1971; Wayne & Diaz, 1986).

Anoxybacillus thermarum A4 suşu katalazının spektroskopik özellikleri: Termofilik katalazların spektroskopik özelliklerinin belirlenmesi için doğal ve indirgenmiş hallerinin 350-600 nm arasındaki absorbansları tarandı. Enzim özütlerindeki katalazların (ortalama 0,5 mg protein), 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal hallerinin ve 100 mM NaOH, 100 mM piridin, 2 mM sodyum ditiyonattan oluşan çözelti karışımındaki indirgenmiş halleri ile 10 mM KCN çözeltisindeki hallerinin spektroskopik karakterleri 350-600 nm arası taranarak belirlendi.

pH ve sıcaklığın A4 katalaz aktivitesi üzerine etkisi: *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu'ndan elde edilen katalazın aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek için, 30 mM H_2O_2 substratı varlığında ve oda sıcaklığında pH'ı 4,0-9,0 arasında değişen tamponlardaki aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlendi. pH 4,0-5,0 arası için 50 mM asetat, pH 6,0-7,0 arası için 50 mM fosfat ve pH 8,0-9,0 arası için 50 mM Tris-HCl tamponları kullanıldı. Değişik pH'lardaki aktiviteler, en yüksek aktiviteyi gösteren pH'daki aktiviteye oranlanarak bağıl aktivite olarak hesaplandı. Sıcaklığın katalaz aktivitesi üzerindeki etkisi, en yüksek aktivitenin belirlendiği pH'da, sıcaklık 10-90 °C arasında değiştirilerek belirlendi. Değişik sıcaklıklardaki aktiviteler, en yüksek

aktiviteyi gösteren sıcaklıktaki aktiviteye oranlanarak bağıl aktivite olarak hesaplandı.

Termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın kinetiği: Çalışmada kullanılan *Anoxybacillus thermarum* A4 suşundan elde edilen katalazın, H_2O_2 substratına karşı davranışını ve ilgisini ortaya koyabilmek için optimize edilmiş şartlarda, H_2O_2 substratının konsantrasyonu 1-100 mM arasında değiştirilerek, katalaz aktivitesi ölçümü yapıldı. Michaelis-Menten eşitliği esas alınarak değişen substrat konsantrasyonu değerlerine karşı hiperbolik substrat doyma grafiği (Michaelis-Menten), bu değerlerin terslerinin alınmasıyla elde edilen lineer grafik (Lineweaver-Burk grafiği) çizilerek V_{maks} ve K_m değerleri hesaplandı.

Bazı kimyasal, deterjan, anyon ve katyonların enzim aktivitesi üzerine etkisi: *Anoxybacillus thermarum* A4 katalazının aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisini incelemek amacıyla, Ba^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan çözeltilerin karışımındaki konsantrasyonları 1-10 mM arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı ve IC50 değerleri hesaplandı.

Anoxybacillus thermarum A4 katalazının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla OH^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , N_3^- , CN^- , HPO_4^{2-} , $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, CO_3^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, NO_3^- anyonlarının sodyum tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan çözeltilerin karışımındaki konsantrasyonları 1-50 mM arasında olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı ve IC50 değerleri hesaplandı. Ayrıca β -merkaptotanol ve 3-Amino-1,2,4 triazolün (3-ATA) de aynı şekilde enzim aktivitesine üzerine etkisi incelendi ve IC₅₀ değerleri grafiklerden hesaplandı.

A. thermarum A4 suşunun tam hücre immobilizasyonu ve kinetik çalışmaları: *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu LB sıvı besiyeri ortamında 12 saat büyütüldükten sonra 5 000 rpm'de santrifüj edilerek 5 mL tampon (pH 7,0) içinde tekrar süspansiyon edildi. Elde edilen kültür çözeltisi, 25 mL %2'lik hazırlanan agar ve agaroz çözeltileri ile jel kıvamı oluşumuna kadar karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirildi. Hazırlanan agar ve agaroz çözeltileri kaynatılarak çözüldü ve kültür çözeltisi ilave

edilmeden önce kültürün bozulmaması için soğumaya bırakıldı. Aynı şekilde agar ve agaroz jellerinin kültür ilave edilmeden kontrolleri hazırlandı. Agar ve agaroz jellerinin kontrolleri ile immobilizasyon gerçekleştirilen jeller aynı miktarda saf suyla yıkanarak, yıkama sularının 600 nm absorbanları ölçüldü ve aralarındaki farktan serbest hücre miktarı belirlendi. Agar ve agaroz hücre ile uyumlu ve % 2 lik konsantrasyonda en az hücre kaçığının elde edildiği en düşük konsantrasyon olduğu için tercih edildi.

Tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra iki farklı matriksten 0,1'er gram alınarak 5 mL 30 mM H₂O₂ çözeltisi içinde 10-100 °C arasında sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyondan sonra 240 nm'de katalaz aktivitelerinin absorban azalışları her bir sıcaklığın körüne karşı ölçüldü.

Kinetik çalışmalar için hazırlanmış olan agar ve agaroz ortamlarından 0,1'er g alındı. 10-60 mM arasında hazırlanmış olan H₂O₂ çözeltilerinin 5'er mL'leriyle 30 dakika muamele edilerek 240 nm'de absorban azalışları her bir konsantrasyonun körüne karşı ölçüldü.

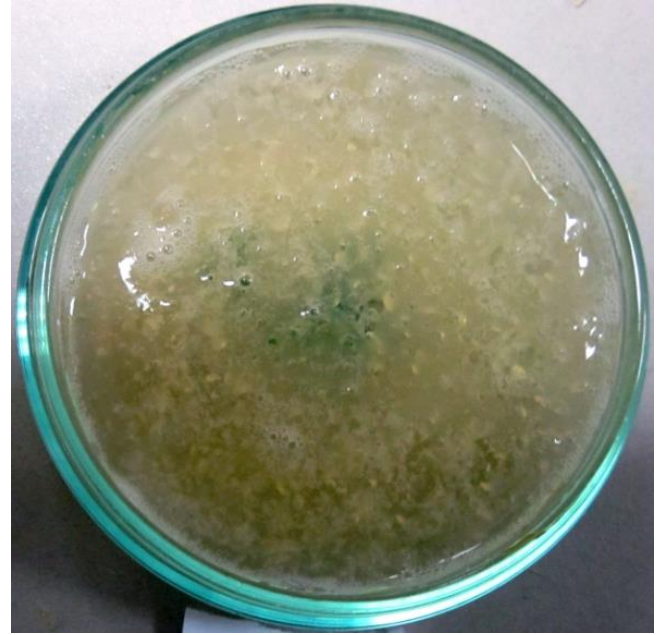
A4 suşunun tam hücre immobilizasyonunun yapılmış olduğu agar ve agaroz ortamlarında katalaz kaynağı olarak tekrar kullanımını belirlemek için matrikslerden 0,1'er g alınmış ve pH 7,0'de 5 mL 30 mM H₂O₂ çözeltisinde oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 30 dakika inkübasyondan sonra 240 nm'deki absorban değeri köre karşı okundu. Matrikslerden H₂O₂ fazlası yıkanarak uzaklaştırıldı. Aynı matrikslerle aktivite ölçümü, aktive düşünceye kadar tekrar edildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Anoxybacillus thermarum A4 suşunun LB ortamında büyütülmesi ile yapılan petri testinde H₂O₂ varlığında gaz kabarcıklarının oluşması katalaz aktivitesinin bir göstergesidir (Şekil 1).

Anoxybacillus thermarum A4 suşundan elde edilen özütte yapılan doğal elektroforez sonucunda katalaz aktivitesi tespit edildi (Şekil 2). Literatürlerde birçok farklı termofilik kültürlerin özütlerinde yapılan doğal elektroforezlerde de benzer özellikler gözlenmiştir (Dinçer, 2005; Monti vd., 2003; Thompson vd., 2003).

Anoxybacillus thermarum A4 suşundan elde edilen özütteki suda çözünür protein miktarı, standart çalışma grafiğinden 0,13 mg mL⁻¹ olarak belirlendi. Bu özütte katalaz aktivitesi 30 mM H₂O₂ (pH 7,0) varlığında 2293,5 U olarak tespit edildi.



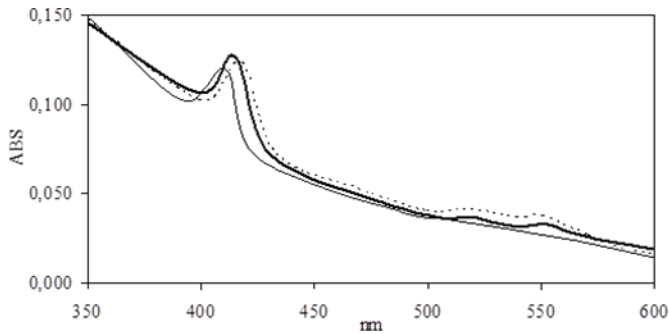
Şekil 1. A4 suşunun katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi.



Şekil 2. A4 suşu özütteki katalaz aktivitesi için yapılan doğal elektroforez jel görüntüsü.

Termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu özütünde mevcut olan katalazın doğal, pridin-ditiyonit çözeltisinde indirgenmiş ve KCN ile

muamele edilmiş durumundaki absorpsiyonları 350-600 nm arasında tarandı. Bu tarama sonucunda, katalazın doğal hali yalnızca 410 nm'de hem grubunu gösteren Soret (γ) pikini verirken, pridin hemokromojen analizinde 413, 518 ve 550 nm'lerde pik verdiği ve KCN ile muamele edildikten sonra 415, 520 ve 550 nm'lerde absorpsiyon gösterdikleri tespit edildi (Şekil 3). Bazı termofilik bakterilerin özütlerindeki katalazlar için yapılan spektrofotometrik çalışmalarda, 408-417 nm arasında Soret piki verdikleri, bu katalazların indirgenmesiyle Soret piklerinin görünür bölgeye doğru kaydıkları ve 520 ile 550 nm civarında pik verdikleri belirtilmiştir. Bununla birlikte, KCN ile α ve β bantlarına ait piklerin genişlediği ifade edilmiştir (Dinçer, 2005).



Şekil 3. A4 katalazının 350-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu (— 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, — 100 mM NaOH, 100 mM piridin ve 2 mM sodyum ditiyonit ile indirgenmiş katalaz, 10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz).

Anoxybacillus thermarum A4 suşundan elde edilen katalazın en yüksek aktiviteyi pH 7,0 ve 50 °C'de gösterdiği belirlendi. Dinçer (2005)'in *Anoxybacillus*'un farklı kültürlerinde yapmış olduğu katalaz çalışmasında katalazların en yüksek aktiviteleri pH 7,0 ve 40-60 °C sıcaklıkları arasında gösterdikleri belirtilmiştir. Ayrıca konuyla ilgili birçok literatürde de katalazların optimum pH değerlerinin genelde 7,0 olduğu ve 4,0-10,0 geniş bir pH aralığında da aktivite gösterdikleri ifade edilmektedir (Brown-Peterson & Salin, 1993; Terzenbach & Blaut, 1998; Zou & Schrempt, 2000; Akgöl vd., 2001; Hidalgo vd., 2004). *Thermoascus aurantiacus*'un UV radyasyonundaki mutantından (M-3) elde edilen termofilik katalazın 70 °C'de en yüksek aktivite gösterdiği (Wang vd., 1998) ve halofilik bir bakteri olan *Halobacterium halobium*'den elde edilen mezofilik katalazın

en yüksek aktiviteyi 40 °C'de gösterdiği (Brown-Peterson & Salin, 1995) belirtilmiştir. A4 katalazının literatür bilgileri ile kıyaslandığında mezofilik katalazlara göre daha yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebildiği, fakat bazı termofilik katalazlara göre ise daha düşük sıcaklıklarda aktivite gösterdiği tespit edildi. Agar ve agaroz ortamlarında immobilize edilmiş hücrelerin H₂O₂'i katalizleme hızının en yüksek 40 °C'de olduğu belirlendi.

A4 suşundan elde edilen katalazın H₂O₂ substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri 250.000 U mg protein⁻¹ ve K_m değeri 17,5 mM olarak belirlendi (Tablo 1). Agar ve agaroz ile yapılan tam hücre immobilizasyonu sonucunda hücre katalazının V_{maks} değerinin 50.000 U g jel⁻¹ ve K_m değerinin 200,0 mM olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Immobilizasyon işlemi sonucunda, substrat ile enzimin etkileşiminin azaldığı ve sigmoidal bir davranış gösterdiği gözlemlendi. BLC'den elde edilen saf katalazla yapılan immobilizasyon çalışmasında, serbest enzim için V_{maks} değeri 236 000 U mg protein⁻¹, K_M değeri 16,5 mM ve immobilize edilmiş enzim için V_{maks} değeri 118.000 U mg protein⁻¹ ve K_m değeri 25,8 mM olarak bulunmuştur (Akgöl vd., 2001). Bir fototrofik bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1'den saflaştırılan katalazın K_m değerinin 40 mM ve V_{maks} değerinin 285.000 U mg protein⁻¹ olduğu hesaplanmıştır (Terzenbach & Blaut, 1998). *Thermus brockianus*'dan saflaştırılan katalazın H₂O₂ substratı varlığında V_{maks} değerinin 20,3 U mg protein⁻¹ olduğu ve K_m değerinin 35,5 mM olduğu belirtilmiştir (Thompson vd., 2003).

Bu çalışmada kullanılan katalazın saflaştırılmış olmamasına rağmen V_{maks} ve K_m değerlerinin literatürlerdeki V_{maks} ve K_m değerlerine yakın çıktıkları görülmektedir. Ayrıca A4 katalazının, literatürlerde yer alan birçok katalazdan daha düşük bir K_m değerine sahip olduğu ve H₂O₂ substratına oldukça ilgi duyduğu görülmektedir.

Tablo 1. A4 özütü ve immobilize edilmiş hücre katalazına ait bazı kinetik veriler.

Hücre	V_{maks}	K_m (mM)
A4	250.000±980 U mg protein ⁻¹	17,5±2,2
İmmobilize A4	50.000±413 U g jel ⁻¹	200,0±28

Bazı katyon ve anyonların *Anoxybacillus thermarum* A4 katalazı aktivitesi üzerine etkisinin belirlenerek Tablo 2 ve Tablo 3'deki IC₅₀ değerleri elde edildi. Çalışmada kullanılan termofilik *A. thermarum* A4 suşundan elde edilen katalazın NaN₃, KCN, HgCl₂ ve 3-amino-1,2,4-triazol gibi bilinen katalaz inhibitörleri ile inhibe olduğu görüldü. A4 suşundaki katalaz aktivitesinin NaN₃, KCN ile inhibe olması, bu suştaki katalazın hem grubu içerdiğini ve diğer hemokatalazlar ile uyum içinde olduğunu göstermektedir (Wang vd., 1998). *Thermoascus aurantiacus*'dan izole edilen katalazın 0,1 mM siyanür ve azid ile yaklaşık %90 oranında, 1 mM Ca⁺², Co⁺², Mn⁺², Ni⁺², Zn⁺² ve Hg⁺² metallerinin varlığında ise yalnızca Hg⁺² ile %70 oranında inhibe olduğu belirtilmektedir (Wang vd., 1998). *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1'den saflaştırılan katalazın inhibisyon çalışması sonucunda CN⁻, N⁻³, 2-merkaptotanol ve sodyum ditiyonit ile inhibe olduğunu ve bu verilerin bu katalazın tek işlevli katalaz olduğunu kanıtladığı belirtilmiştir (Terzenbach & Blaut, 1998).

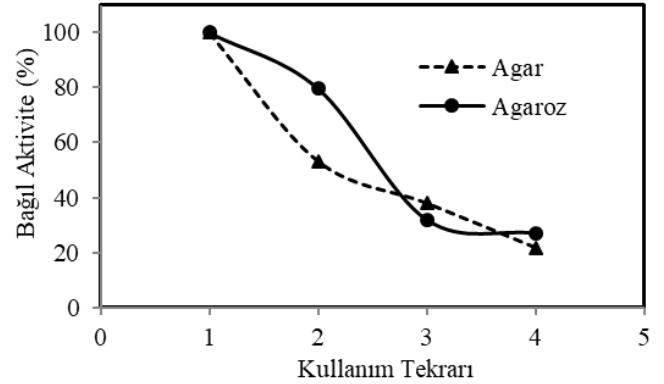
Tablo 2. Bazı katyonların varlığında *A. thermarum* A4 suşu katalazının inhibisyon çalışması sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri.

Katyon	IC ₅₀ Değerleri (µM)	Katyon	IC ₅₀ Değerleri (µM)
Ba ⁺²	1600,0	Ni ⁺²	26,0
Cu ⁺²	3,8	Zn ⁺²	24,0
Hg ⁺²	3,0	Fe ⁺²	2,4
Mg ⁺²	2600,0		

Çalışmada tam hücre immobilizasyonunda doğal polimerlerden agar ve agarozun %2'lik çözeltileri kullanıldı. Agar ortamında immobilize edilmiş hücrelerin, 1. kullarındaki katalaz aktivitesini 2. kez kullanımında %53, 3. kez kullanımında %38, 4. kez kullanımında %22 oranında, agaroz ortamında ise 2. kez kullanımında %80, 3. kez kullanımında %32, 4. kez kullanımında %27 oranında gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 4). Bu çalışma sonucunda enzim saflaştırılmadan da tam hücrenin bir katalaz kaynağı olarak kullanılabilceği ve H₂O₂'in ortamdaki uzaklaştırılması için aynı immobilize kaynağın tekrar kullanılabilceği belirlendi.

Tablo 3. Bazı Anyon ve bileşiklerin varlığında *A. thermarum* A4 suşu katalazının inhibisyon çalışması sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri.

Anyon/Bileşik	IC ₅₀ Değerleri (mM)	Anyon/Bileşik	IC ₅₀ Değerleri (mM)
OH ⁻	3,3	B ₄ O ₇ ⁻²	8,0
NO ₂ ⁻	2,5	CO ₃ ⁻²	5,5
NO ₃ ⁻	35,0	C ₂ O ₄ ⁻²	20,0
PO ₄ ⁻³	3,2	B-merkaptotanol	2,5
N ₃ ⁻	0,1	3-ATA	8,2
CN ⁻	0,5		



Şekil 4. A4 suşunun agar ve agaroz ortamlarındaki immobilize edilmiş halinin H₂O₂ varlığında tekrar kullanılabilirliği.

SONUÇLAR

Sonuç olarak, *Anoxybacillus thermarum* A4 suşu katalazı sıcaklık, pH, inhibisyon ve kinetik veriler bakımından literatürlerle uyumluluk göstermektedir. Bununla birlikte agar ve agaroz ortamlarında tam hücre immobilizasyonunun gerçekleştirilmesiyle enzimi saflaştırmaya gerek kalmadan bir katalaz kaynağı olarak kullanılabilceği belirlendi. Tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirilen *Anoxybacillus thermarum* A4 suşunun, katalazın kullanıldığı endüstri alanlarında verimli bir şekilde kullanılma potansiyeline sahiptir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi destekleriyle gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K. & Gulluce M., (2009). Identification and characterization of

- thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey, *Journal Microbiol Methods*, **79**, 321-328.
- Aebi, H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121-126.
- Akgöl, S., Kaçar, Y., Özkara, S., Yavuz, H., Denizli, A. & Arica, M.Y. (2001).** Immobilization of catalase via adsorption onto L-histidine grafted functional pHEMA based membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **15**, 197-206.
- Brown-Peterson, N.J. & Salin, M.L. (1993).** Purification of catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: Characterization of some unique properties of the halophilic enzyme. *Journal of Bacteriology*, **175**(13), 4197-4202.
- Brown-Peterson, N. & Salin, M.L. (1995).** Purification and characterization of mesohalic catalase from Halophilic Bacterium *Halobacterium halobium*. *Journal of Bacteriology*, **177**(2), 378-384.
- Costa, S.A., Tzanov, T., Paar, A., Gudelj, M., Gübitz, G.M. & Cavaco-Paulo, A. (2001).** Immobilization of catalases from Bacillus SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 815-819.
- Dinçer, B. (2005).** *Bazı termofilik bakterilerdeki katalaz aktivitesinin incelenmesi*. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 100s.
- Durmaz, M. (2012).** *Anoxybacillus gonensis Z4 suşundaki katalaz aktivitesinin incelenmesi ve tam hücre immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 75s.
- Gonçalves, V.M., de Cerqueira Leite, L.C., Raw, I. & Cabrera-Crespo, J. (1999).** Purification of catalase from human placenta, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **29**, 73-77.
- Grigoras, A.G. (2017).** Catalase immobilization-A review. *Biochemical Engineering Journal*, **117**, 1-20.
- Hatchikian, E.C., LeGall, J., Bruschi, M. & Dubourdieu, M. (1972).** Regulation of the reduction of sulfite and thiosulfate by ferredoxin, flavodoxin and cytochrome c3 in extracts of the sulfate reducer desulfovibrio gigas. *Biochimica et Biophysica Acta*, **258**, 701-708.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Mateo, C., Lopez-Gallego, F., Moreno, R., Berenguer, J., Guisan, J.M. & Fernández-Lafuente, R. (2004).** Purification of a catalase from *Thermus thermophilus* via IMAC chromatography: Effect of the support. *Biotechnology Progress*, **20**, 1578-1582.
- Hildebrandt, A.G. & Roots, I. (1975).** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reaction in liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **171**, 385-397.
- Hillenbrand, T. (1999).** Die abwasser situation in der deutschen papier-, textile-, und lederindustrie, GWF, *Wasser/Abwasser*, **140**(4), 267-273.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banatb, I.M., Marchant, R. & Koutinas, A.A. (2004).** Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, **2**, 377-397.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Monti, D., Baldaro, E. & Riva, S. (2003).** Separation and characterization of two catalase activities isolated from the Yeast *Trigonopsis variabilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 596-605.
- Reiner, K. (2010).** Catalase test protocol, *American Society for Microbiology*, 1-9.
- Terzenbach, D.P. & Blaut, M. (1998).** Purification and Characterization of a Catalase from the Nonsulfur Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and Its Role in the Oxidative Stress Response, *Archives of Microbiology*, **169**, 503-508.
- Tischer, W. & Wedekind, F. (1999).** *Immobilized enzymes: methods and applications*. Biocatalysis-From Discovery to Application, Springer, No: 200, Berlin-Almanya, 95-126p.

- Vatsyayan, P. & Goswami, P. (2016).** Highly active and stable large catalase isolated from a hydrocarbon degrading *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Enzyme Research*, 1-8.
- Wang, H., Tokusige, Y., Shinoyama, H., Fujii, T. & Urakami, T. (1998).** Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(2), 169-173.
- Wang, H., Wang, J., Wang, J., Zhu, R., Shen, Y. & Xu, Q. (2017).** Spectroscopic method for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid based on its inhibitory effect towards catalase immobilized on reusable magnetic Fe₃O₄-chitosan nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 247, 146-154.
- Wayne, L.G. & Diaz, G.A. (1986).** A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Analytical Biochemistry*, 157, 89-92.
- Weck, M. (1991).** Hydrogen peroxide-an environmentally acceptable textile bleaching agent, *Text Praxis International*, 2, 144-147.
- Woodbury, W., Spencer, A.K. & Stahmann, M.A. (1971).** An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, 44, 301-305.
- Zou, P. & Schrepf, H. (2000).** The heme-independent manganese-peroxidase activity depends on the presence of the C-terminal domain within the *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase CpeB. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2840-2849.

***Corresponding author's:**

Barbaros DİNÇER

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü, Rize, Türkiye.

✉E-mail: barbaros.dincer@erdogan.edu.tr

ORCID : <https://orcid.org/0000-0001-9591-5411>

GSM : +90 (535) 667 17 66

Telefon : +90 (464) 223 40 93

Faks : +90 (464) 223 40 19