

AKÜ FEMÜBİD 19 (2019) 011003 (15-21)

AKU J. Sci. Eng. 19 (2019) 011003 (15-21)

Doi: 10.35414/akufemubid.463776

Araştırma Makalesi / Research Article

Bacillus pumilus Y7 Katalaz (*katX2*) Geninin Klonlanması ve AçıklanmasıYonca Yüzügüllü Karakuş¹, Günce Göç²¹Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kocaeli²Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AnaBilim Dalı, Kocaelie-posta: yonca.yuzugullu@kocaeli.edu.tr. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0286-8711>

Geliş Tarihi: 25.09.2018 ; Kabul Tarihi: 04.03.2019

Öz

Katalazlar antioksidan metalloenzimler sınıfına dahil olup başlıca işlevleri hidrojen peroksidin (H₂O₂) su ve moleküler oksijene parçalanmasıdır. Temel fonksiyonlarının yanında düşük seviyede peroksidaz ve (ya) oksidaz aktivitesi göstererek izoniazid (antitüberküloz ilacı) sentezi gibi tıbbi öneme sahip bazı bileşiklerin sentezini destekledikleri bilinmektedir. Yakın bir geçmişte *Bacillus pumilus* tarafından üretilen 'Fe/hem' grubu içeren bir enzimin katalaz, peroksidaz ve penisilin oksidaz aktiviteleri gösterdiği yayınlanmıştır. Bunun üzerine bu enzimin hem diğer katalaz, peroksidaz ve katalaz-peroksidazlar ile karşılaştırılması hem de ikincil peroksidaz/oksidaz özelliğinin ayrıntılı olarak irdelenebilmesi için enzimi kodlayan *katX2* geninin klonlanması ve *Escherichia coli*'de üretimi gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız gerçekleştirilen klonlama tekniğinde ilk olarak *B. pumilus* Y7'den elde edilen *katX2* geni kimerik primerler (5'*katX2*; 3'*katX2*) ile bir araya getirilerek megaprimere oluşturulmuş ve sonrasında bu megaprimere ekspresyon vektörüne başarılı bir şekilde aktarılmıştır. 510 amino asitten oluşan olgun proteini kodlayan *katX2* genini taşıyan pET28aTEV vektörü *E. coli* BL21 (DE3 star) hücrelerine transforme edilmiştir. Transformantlarda katalaz aktivitesi için en yüksek değer (8000 µmol mg⁻¹ dak⁻¹) 30°C'de, IPTG (0.1 mM) varlığında, 120 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütüldüğü ekspresyon koşullarında ulaşılmıştır.

Anahtar kelimelerKatalaz; Peroksidaz;
Oksidaz; *Bacillus pumilus***Cloning and Expression of Catalase Gene (*katX2*) from *Bacillus pumilus* Y7****Abstract**

Catalases belonging to a class of antioxidant metalloenzymes function to decompose hydrogen peroxide (H₂O₂) to dioxygen and water. Besides their major activity, they are known to support the synthesis of certain compounds of medicinal importance such as izoniazid (antituberculosis agent) with their peroxidase and/or oxidase activity at low level. Recently, it has been published that a Fe/heme containing enzyme produced by *Bacillus pumilus* presents catalase, peroxidase and penicillin oxidase activities. This report led us to investigate the enzyme for comparison with other catalase, peroxidase and catalase peroxidases and for elaboration its secondary peroxidase/oxidase activity. For this purpose, catalase encoding gene (*katX2*) obtained from *B. pumilus* Y7 was cloned by restriction free cloning technique and expressed in *Escherichia coli*. In this technique, the megaprimer was produced by assembling the *katX2* with the chimeric primers (5'*katX2*; 3'*katX2*) and followed by its integration into the expression vector. Then, the pET28aTEV vector carrying the *katX2* gene that encodes mature protein consisting of 510 amino acids was transformed into *E. coli* BL21 (DE3 Star) cells. Catalase activity of the transformants reached at their highest level (8000 µmole mg⁻¹ min⁻¹) when cells were expressed at 30°C and 120 rpm for 24 hours in the presence of IPTG (0.1 mM).

KeywordsCatalase; Peroxidase;
Oxidase; *Bacillus pumilus*

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

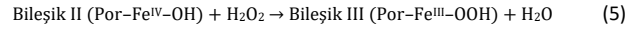
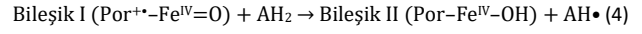
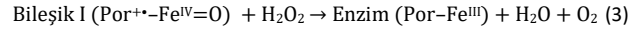
1. Giriş

Katalazlar (EC 1.11.1.6), doğada yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. Katalazları filogenetik olarak üç

gruba ayırabiliriz: monofonksiyonel Fe/hem (heme, haem) grubu içeren katalazlar, Fe/hem grubu içeren katalaz-peroksidazlar (KatG) ve demir/hem içermeyip Mn içeren katalazlar (Nicholls, 2012). Oksijenli solunum yapan birçok prokaryotik

organizma, bu katalaz gruplarından en az birini üretebilme yeteneğine sahiptir; ancak sentezlenen katalaz enziminin sayısı ve çeşidi organizmalar arasında büyük farklılık göstermektedir. Örneğin, *Mycobacterium* cinsi bakterilerin sadece katalaz-peroksidaz enzimi ürettiği gözlenirken, *Escherichia coli*'de katalaz enzimi (HPH, Hidrojenperoksidaz II) yanında katalaz-peroksidaz enzimi (HPI, Hidrojenperoksidaz I) de üretilebilmektedir (Díaz *et al.* 2012). Buna karşın *Bacillus subtilis* bakterisinden üç farklı Fe/hem grubu içeren monofonksiyonel katalaz enzimini kodlayan gen izole edilmiştir. Ökaryotik organizmalardan memeliler (tek tip Fe/hem-katalaz), bitkiler (dört farklı Fe/hem-katalaz) ve mantarlarda (Fe/hem-katalaz ve katalaz-peroksidaz) da farklı sayıda ve tipte katalaz enziminin varlığı literatürde yer almaktadır (Nicholls *et al.* 2001). Buradan katalazların tüm aerobik organizmalarda yaygın olarak bulunabildiği anlaşılmaktadır.

Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya dönüştürerek, hücreleri hidrojen peroksidin olumsuz etkilerinden korumaktadır (1). Katalazlar tarafından gerçekleştirilen katalitik reaksiyon iki basamaktan meydana gelmektedir (Chelikani *et al.* 2004). İlk basamakta bir hidrojen peroksit molekülünün ferrik enzimi (Fe/hem grubunu) oksiferril formuna (Cpd I, Bileşik I) çevirmesiyle ortaya su (H_2O) çıkmaktadır (2). İkinci basamakta ise başka bir H_2O_2 molekülünün Bileşik I'i indirgemesiyle enzim tekrar ilk haline dönüşmektedir (3). Alternatif olarak, düşük hidrojen peroksit koşulları altında, Bileşik I düşük molekül ağırlıklı alkollerini okside ederek Bileşik II (Cpd II)'ye dönüşebilir (4). Bileşik II ise başka bir H_2O_2 ile reaksiyona girerek enzimin inaktif formu olan Bileşik III (Cpd III) oluşumuna sebep olabilir (5). NAD(P)H (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağlayıcı katalazlarda kofaktörün enzimi Bileşik II veya III oluşumuna engel olarak koruduğu öne sürülmüştür (Sevinc *et al.* 1999, Putnam *et al.* 2000, Nicholls, 2012).



Katalazlarla yaklaşık yüzyıldır çalışılmasına rağmen bu enzimlerle ilgili günümüzde yeni bulgular elde edilmektedir. Yakın bir geçmişte yayınlanan bir bulguda mezofilik bir toprak bakterisi olan *B. pumilus* tarafından üretilen katalazın β -laktam oksidaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Sangar *et al.* 2012). Katalazlarda gözlenen bu ikincil aktivitenin varlığı memeli hücresi (Vetrano *et al.* 2005), *Scytalidium thermophilum* (Yuzugullu *et al.* 2013), *Thermobifida fusca* (Loncar and Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus*'dan (Chen *et al.* 2017, Teng *et al.* 2016) izole edilen katalazlarda da tanımlanmıştır. Buradan, ikincil aktiviteye sahip katalaz türü enzimlerin çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada, *B. pumilus* Y7 (Sertel, 2016) katalazının ikincil (peroksidaz/oksidaz) aktivitesi hakkında detaylı bilgiye ulaşabilmek için yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarını gerçekleştirmek üzere enzimi kodlayan genin klonlanması hedeflenmiştir. Klonlama sırasında genomik DNA konsantrasyonu, primer bağlanma sıcaklık aralığı, polimeraz enzim tipi, vektör:megaprimer oranı, reaksiyon döngü sayısı ve koşulu başta olmak üzere birçok parametre test edilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Plazmid ve mikroorganizmalar

Katalaz geninin (*katX2*) klonlanması ve ekspresyonu için Histidin etiketli pET28TEVCATPO vektörü (Yuzugullu *et al.* 2013) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *B. pumilus* Y7 izolatu (Sertel, 2006), LB (Luria Bertani) besiyerinde (%1 w/v tripton, %0.5 w/v maya ekstraktı, %1 w/v NaCl) 37°C'de 18 saat boyunca inkübe edilerek üretilmiştir. *E. coli* XL-1 Blue ve BL21 (DE3 star) suşlarının üretimi için aynı besiyerine 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamisin ilave edilmiştir (Yuzugullu *et al.* 2013).

2.2 Moleküler klonlama

B. pumilus Y7'den kromozomal DNA eldesi ticari izolasyon kiti (peqGOLDBacterial DNA Mini Kit) kullanılarak yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için 10X KOD Hot Start DNA Polimeraz Tamponu, 2 mM dNTP, 25 mM MgSO₄, 10 µM kimerik primer çifti, 1 U µl⁻¹ KOD Hot Start DNA polimeraz ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan DNA (6-12 ng µl⁻¹) konularak son reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su ile tamamlanmıştır. Kullanılan kimerik (hibrit) primerler, *katX2* geni ve pET28TEVCATPO plazmidinden toplamda yaklaşık 50 bazlık bir kısma sahip olacak şekilde tasarlanmıştır (Çizelge 1). Megaprimer sentezi için kullanılan PZR koşulları; 94°C'de 2 dak süren başlangıç denatürasyonunu takiben 94°C'de 35 sn hızlı denatürasyon, 55-60°C'de 30 sn primer bağlama ve 68°C'de 90 sn uzama basamaklarını içeren 30 döngü ile ardından 68°C'de 10 dak son uzama basamağı ile gerçekleştirilmiştir. Megaprimerin PZR ortamından saflaştırılmasında cam yünü tekniği kullanılmıştır (Sun *et al.* 2012). Saflaştırılan megaprimer, başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2 dak olacak şekilde 94°C'de 35 sn, 55-60°C'de 1 dak, 68°C'de ve 7 dak'da 15 döngü olmak üzere 68°C'de 10 dak son uzama basamağından oluşan polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef vektöre entegre edilmiştir. Bu aşamada kullanılan reaksiyon karışımında megaprimer:vektör oranının 1:6 olmasına dikkat edilmiştir. PZR ürünleri %1'lik (w/v) agaroz jelde 100 V'da 60 dakika yürütülmüş ve UV cihazı altında görüntülenmiştir.

Çizelge 1. Megaprimer oluşturulmasında kullanılan primerler

Primer	Nükleotit Dizisi*
5'katX2	5'-GCGGCGAGAACCTGTA CTTCAGGGC ACAAATTC AAATCATAAAAATTTGACAACG-3
3'katX2	3'-GCTCGAGTGCGGCCGAAGCTTGGG TTATTCATGTTTCCTTGAAGGTATGAGC-5

*Vektör sekansına ait nükleotitler koyu olarak gösterilmiştir

20 U *DpnI* (Biolab, İngiltere) enzimi ile muamele edilen 50 µl'lik PZR ürünü, kompetan yeteneğine sahip *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine transforme edilmiştir. Hücrelerin oluşturduğu kolonilerin kontrolü, pozitif (pET28TEVCATPO içeren) ve negatif

(ddH₂O içeren) transformasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kolonilerin *katX2* genini içerip içermediklerinin kontrolü ise restriksiyon enzimleri (*EcoRI*, *PstI* ve *HindIII* (Thermo Fisher Scientific, Amerika)) kesim şablonlarına göre yapılmıştır. Nükleotid dizilimi analiz sonuçları NCBI gen bankasına kayıtlı *katX2* gen bölgesi (GenBank Erişim Numarası: WP_058014433) sekans dizileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.3 Ekspresyon optimizasyonu

Rekombinant protein ifadesini optimize etmek için, başta sıcaklık olmak üzere, inkübasyon süresi, IPTG (İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozit) miktarı, çalkalama hızı ve havalandırma (oksijen seviyesi) gibi parametreler test edilmiştir.

2.4 Enzim aktivite tayini

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür (Cary 60, Agilent). Reaksiyon karışımında 10 mM H₂O₂, 100 mM (pH 7.0) sodyum fosfat tamponu ve toplam hacim 1 ml olacak şekilde seyreltilen örnekler kullanılmıştır. 37°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda, substrat solüsyonu (tampon çözeltisinde hazırlanan H₂O₂) 1 dak inkübe edilmiştir. Hidrojen peroksidin kaybolma hızı 240 nm'de ölçülerek hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızı ve hidrojen peroksidin yok olma katsayı değeri (39.4 M⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak belirlenmiştir (Merle *et al.* 2007). Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µmol H₂O₂'in ayrışmasını katalize eden enzim miktarıdır.

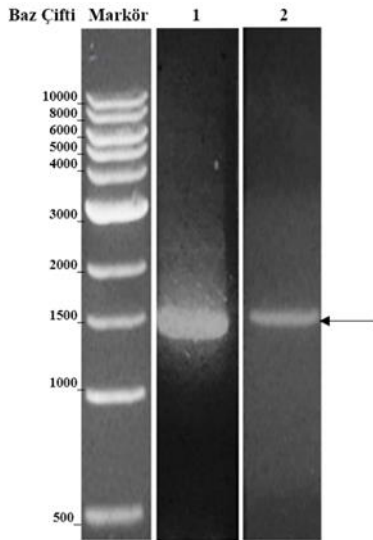
2.5 Elektroferez

Rekombinant protein üretiminden elde edilen üst faz örnekleri, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez) ile analiz edilmiştir. Buna göre %5 (v/v) yükleme jeli (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], %0,1 w/v SDS, %5 v/v Akrlamid ve TEMED) ve %15 (v/v) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], %0,1 w/v SDS, %15 v/v Akrlamid ve TEMED) hazırlandı (Laemmli, 1970). Bio-Rad Mini Protean (Amerika) sistemine yüklenen örnekler, 150 V'da 60 dak yürütüldü. Sonrasında jel sistemden çıkartılarak, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası ile boyanması gerçekleştirildi.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Megaprimerin amplifikasyonu

B. pumilus katalazını kodlayan *katX2* geninin, 5'katX2 ve 3'katX2 kimerik primerleri ile bir araya getirilmesiyle meydana getirilen megaprimerin çoğaltılması için kurulan reaksiyondan elde edilen ürün (1.5 kbç), agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 1). Stevenson ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmalarda, megaprimer ve vektör bir araya getirilmeden önce, megaprimerin amplifikasyonunda gerçekleşebilecek primer dimerlerin oluşması ya da spesifik olmayan bölgelerin de çoğaltılması gibi kirliliğe sebep olacak ihtimallere karşı, bu reaksiyon sonucunda elde edilen megaprimerin saflaştırılması gerektiği rapor edilmiştir. Buna göre, megaprimer PZR ile çoğaltıldıktan sonra cam yünü tekniği ile saflaştırılmıştır (Şekil 1). Saflaştırma sonrası yaklaşık $12 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ megaprimer elde edilmiştir.

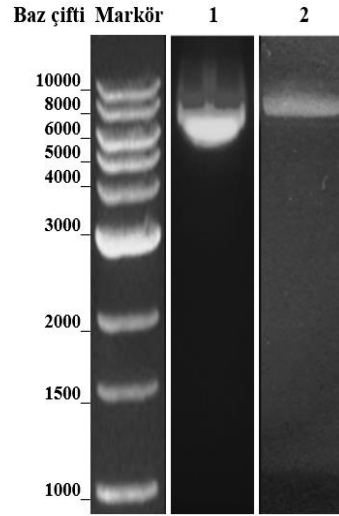


Şekil 1. Megaprimer amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Ok, 1500 bç uzunluğundaki megaprimerin çoğaltıldığı PZR ürünü; 2: Cam yünü tekniği ile saflaştırılan megaprimer

3.2 Megaprimerin hedef vektöre entegrasyonu

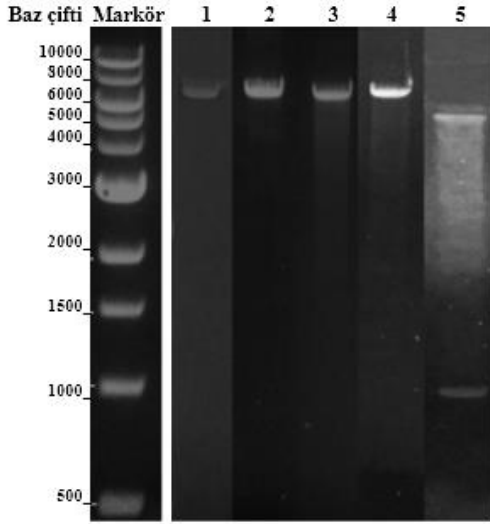
Megaprimer olarak elde edilen *katX2* geni, yaklaşık 7.4 kbç olan pET28TEVCATPO (Yuzugullu *et al.* 2013) plazmidindeki *catpo* geninin bulunduğu bölgeye başarıyla yerleştirilmiştir. 6.7 kbç büyüklüğündeki

plazmid pET28TEVKATX2 olarak adlandırılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Vektörün *katX2* geni içerdiğinin agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi. Markör: 10 kbç, Biolab, İngiltere; 1: megaprimer olarak elde edilen *katX2* genini içeren vektör DNA'sı (6.7 kbç); 2: pET28TEVCATPO vektörüne ait DNA (7.4 kbç)

Rekombinant vektörün *katX2* genini içerdiğinin doğrulanması amacıyla transformasyon sonrası elde edilen rekombinant klonlar restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Buna göre, eğer vektör *katX2* genini içeriyorsa *EcoRI* enzimi tarafından bir yerden, *PstI* ve *EcoRI* enzimleri tarafından bir yerden, *HindIII* ve *EcoRI* enzimleri tarafından ise iki yerden kesilmelidir. Ayrıca, *PstI* enziminin rekombinant plazmidi kesmemesi beklenmektedir. Diğer yandan geni içermiyorsa *EcoRI* enzimi tarafından tek yerden, *PstI* enzimi tarafından iki yerden, *PstI* ve *EcoRI* enzimleri tarafından üç yerden, *HindIII* ve *EcoRI* enzimleri tarafından ise tek yerden kesilmesi beklenmiştir. Şekil 3'te gözlendiği üzere transformasyon sonrası elde edilen koloniye ait plazmid DNA ($125 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) *EcoRI* ile kesildiğinde 6.7 kbç; *HindIII* ile 6.7 kbç; *EcoRI* ve *PstI* ile kesildiğinde yaklaşık 6.7 kbç büyüklüklerinde DNA bantları vermiştir. Aynı örnek, *EcoRI* ve *HindIII* ile kesildiğinde ise 5804 ve 923 kbç'lik iki farklı bant gözlenmiştir (Şekil 3). Elde edilen bulgular, *katX2* geninin başarılı bir şekilde klonlandığına işaret etmektedir.



Şekil 3. Vektörün *katX2* geni içerdiğinin restriksiyon enzimleri ile doğrulanması. Markör: 10 kb, Biolab (İngiltere); 1: Rekombinant plazmidin *EcoRI* ile kesim sonucu; 2: Rekombinant plazmidin *PstI* ile kesim sonucu; 3: Rekombinant plazmidin *HindIII* ile kesim sonucu; 4: Rekombinant plazmidin *EcoRI* ve *PstI* ile kesim sonucu; 5: Rekombinant plazmidin *EcoRI* ve *HindIII* ile kesim sonucu

3.3 Rekombinant katalaz üretimi

Restriksiyon kesim ile *katX2* genini içerdiği gösterilen plazmid örneği sekans analizi ile klonlamanın gerçekleştiği doğrulandıktan sonra *E. coli* BL21 (DE3 star) hücrelerine aktarılmıştır. Rekombinant *B. pumilus* Y7 katalazının ifadesinin optimizasyonu için gerçekleştirilen denemelerin sonucu Çizelge 2’de gösterilmektedir. Buna göre, yüksek bağıl katalaz aktivite ($8000 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{dak}^{-1}$) indükleyici ajan (IPTG) varlığında, düşük havalandırmalı (2.5X), 30°C, 120 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütülen hücrelerin üst faz örneğinden elde edilmiştir. Genel olarak IPTG varlığının, rekombinant katalaz üretimini indüklediği gözlenmiştir. Sıcaklığın 30°C ve 37°C olduğu koşullardan alınan örneklerde, sıcaklığın 20°C olduğu koşullardan alınan örneklere göre daha yüksek bağıl katalaz aktivitesi elde edilmiştir. Benzer şekilde farklı koşullarda üretilen örnekler SDS-PAGE ile analiz edildiğinde, indükleyici ajanın kullanıldığı koşullarda 58.9 kDa civarında beklenen protein bantları daha yoğun olarak gözlenmiştir (Şekil 4).

Bu çalışmada katalaz enziminin üretimi rekombinant ekspresyon sistemi kullanarak *B. pumilus* Y7’nin kendi ürettiği enzime göre yaklaşık 20 kat artmıştır

(Çizelge 3). Literatürde *B. pumilus* katalazının rekombinant ekspresyon sistemi kullanılarak üretilmesine dair tek bir yayın mevcuttur (Philibert *et al.* 2016). Bu yayında Çin’de topraktan izole edilen *B. pumilus* ML413’e ait *katX2* geni *B. subtilis* 168 suşuna aktarılmış ve aktivitede 14 kat artış gözlenmiştir (Philibert *et al.* 2016). Bu çalışmada ise katalaz üretiminde daha yüksek verim elde edilmiştir. *B. subtilis* katalazı ile yapılan benzer bir çalışmada ise *katA* geninin aynı organizmada rekombinant olarak üretildiğinde enzim aktivitesinde 20 kat artışın gözlemlendiği vurgulanmıştır (Xu *et al.* 2014).

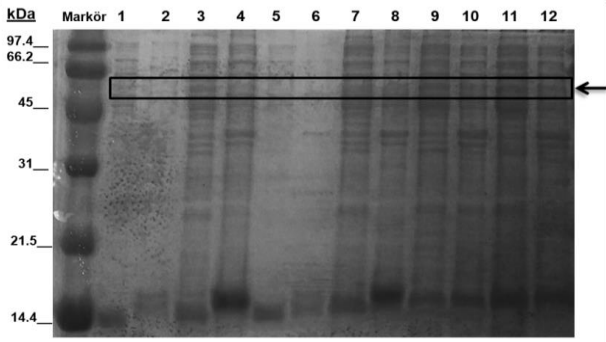
Çizelge 2. Farklı ekspresyon koşullarında üretilen katalaz enziminin aktivite sonuçları

Koşul*	Bağıl Katalaz Aktivite (%)	Koşul*	Bağıl Katalaz Aktivite (%)
Kontrol (XL1-Blue)	0	IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 16. saat	15
IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 16. saat	2	IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 16. saat	25
IPTG (+); 20°C; 120 rpm; 16. saat	-	IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 24. saat	18
IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 24. saat	-	IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 24. saat	64
IPTG (+); 20°C; 120 rpm; 24. saat	8	IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 16. saat	24
IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 16. saat	0.7	IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 16. saat	8
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 16. saat	12	IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 24. saat	26
IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 24. saat	10	IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 24. saat	64
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 24. saat	35	IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 16. saat	20
IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 16. saat	8	IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 16. saat	67
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 16. saat	58	IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 24. saat	21
IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 24. saat	13	IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 24. saat	93
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 24. saat	100		
120 rpm; 24. saat			

*Ekspresyon optimizasyonu için gerçekleştirilen büyüme denemelerinde indükleyici ajan olarak IPTG kullanılmıştır. Tercih edilen büyüme sıcaklıkları 20, 30 ve 37°C’dir. Çalkalama hızı olarak 120 ve 200 rpm seçilmiştir. Farklı havalandırma koşulları sağlamak üzere örnekler 2.5 ve 5 kat tepe boşluğuna sahip erlenlerde büyütülmüştür. İnkübasyon süresinin etkisini analiz etmek amacıyla 16 ve 24 saat süren büyüme denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. *B. pumilus* Y7 katalazının rekombinant ekspresyon sistemi ile ifadesi sonrası katalitik aktivitedeki değişim

Kaynak	Konak hücre	Spesifik aktivite ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{dak}^{-1}$)
<i>B. pumilus</i> Y7	<i>B. pumilus</i> Y7	400
<i>B. pumilus</i> Y7	<i>E. coli</i> BL21(DE3)star	8000



Şekil 4. Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu. Markör (Biorad Low Range, Amerika); 1: IPTG (+), 20°C, 200 rpm; 2: IPTG (-), 20°C, 200 rpm; 3: IPTG (+), 20°C, 120 rpm; 4: IPTG (-), 20°C, 120 rpm; 5: IPTG (+), 30°C, 200 rpm; 6: IPTG (-), 30°C, 200 rpm; 7: IPTG (+), 30°C, 120 rpm; 8: IPTG (-), 30°C, 120 rpm; 9: IPTG (+), 37°C, 200 rpm; 10: IPTG (-), 37°C, 200 rpm; 11: IPTG (+), 37°C, 120 rpm; 12: IPTG (-), 37°C, 120 rpm, (Hedef bant ok ile gösterilmiştir).

4. Sonuç

Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniği ile *B. pumilus* Y7'den katalaz geni başarılı bir şekilde klonlanmış ve *E. coli*'de 20 kat verimle üretilmiştir. Çalışmada kullanılan teknik, geleneksel klonlama yöntemlerine göre birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajların başında zaman tasarrufu, maliyet düşüklüğü ve güvenilir bir teknik olması gibi özellikler gelmektedir.

5. Kaynaklar

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 192–208.

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.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

Díaz, A., Loewen, P.C., Fita, I., Carpena, X., 2012. Thirty years of heme catalases structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**, 102–110.

Loncar, N., Fraaije, M.W., 2015. Catalases as biocatalysts in technical applications: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 3351–3357.

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.

Merle, P.L., Sabourault, C., Richier, S., Allemand, D., Furla, P., 2007. Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic anemone. *Free Radical Biology and Medicine*, **42**, 236–246.

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

Nicholls, P., 2012. Classical catalase: ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**, 95–101.

Philibert, T., Rao, Z., Yang, T., Zhou, J., Huang, G., Irene, K., Samuel, N., 2016. Heterologous expression and characterization of a new heme-catalase in *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **43**, 729–740.

Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, **296**, 295–309.

Sangar, S., Pal, M., Moon, L.S., Jolly, R.S., 2012. A catalase-peroxidase for oxidation of β -lactams to their (R)-sulfoxides. *Bioresource Technology*, **115**, 102–110.

Sertel, A., 2016. İzmit ve çevresindeki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması ve biyokimyasal karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 94.

Sevinc, M.S., Mate, M.J., Switala, J., Fita, I., Loewen, P.C., 1999. Role of the lateral channel in catalase HPII of *Escherichia coli*. *Protein Science*, **8**, 490–498.

Stevenson, J., Krycer, J.R., Phan, L., Brown, A.J., 2013. A practical comparison of ligation-independent cloning techniques. *PLoS ONE*, **8**, 1–7.

Sun, Y., Sriramajayam, K., Luo, D., Liao, D.J., 2012. A quick, cost-free method of purification of DNA fragments from agarose gel. *Journal of Cancer*, **23**, 93–95.

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.

Xu, S., Guo, Y., Du, G., Zhou, J., Chen, J., 2014. Self-cloning significantly enhances the production of catalase in *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**, 2152–2162.

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.

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.