

***Bacillus* sp. (BA-142) Bakterisinden Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Mehmet ÇİFTÇİ

Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Erzurum (ciftcim@atauni.edu.tr)

Ahmet ADIGÜZEL

Mustafa ERAT

Atatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Erzurum

Fikrettin ŞAHİN

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Erzurum

Geliş Tarihi : 25.12.2003

ÖZET: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD) *Bacillus* sp.(BA-142) bakterisinden homojenatın hazırlanması ve amonyum sülfat çöktürmesi vasıtasıyla kısmi olarak saflaştırıldı ve bazı kinetik özellikleri araştırıldı. Saflaştırma prosedürü iki basamaktan oluştu; homojenatın hazırlanması ve amonyum sülfat çöktürmesi. Bu iki basamak sonucunda 0,23 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip enzim % 79 verimle 82 kat saflaştırıldı. Enzim için optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık değerleri bulundu. Ayrıca, NADP⁺ ve glukoz 6-fosfat (G6P) için K_M ve V_{max} değerleri tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, saflaştırma

Partially Purification Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From *Bacillus* sp. (BA-142) And Investigation Of Some Kinetic Properties

ABSTRACT: Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) was purified from *Bacillus* sp.(BA-142) bacterium cells, and some characteristics of the enzyme were investigated. The purification procedure was composed of two steps: homogenate preparation, and ammonium sulfate precipitation. After two consecutive steps, the enzyme, specific activity was 0.23 EU/mg protein, was purified with a yield of 79% and 82 fold purification. Optimal pH, stable pH, optimal temperature, K_M and V_{max} values for NADP⁺ and glucose 6-phosphate (G 6 P) were also determined for the enzyme.

Key Words : *Bacillus* sp., Glucose 6-phosphate dehydrogenase, purification.

GİRİŞ

Bacillus sp. azot fikse edici bir bakteri olup, Çakmakçı ve arkadaşlarının 2001 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, 2 yıl boyunca arazi koşulları altında şeker pancarı ve arpa tohumlarına tatbik edildiğinde, bu bakterinin bitkilerin hem ürün bileşenlerinde hem de ürün kalitesinde önemli derecede artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalardan *Bacillus* sp. uygulanan bitkilerle, N₂ uygulanan bitkilerin ürün veriminin birbirine eşit olduğu ortaya konulmuştur. *Bacillus* sp. ilk olarak biberde bulunmuştur. Bu bakteri katalaz aktivitesi gösterirken oksidaz aktivitesine sahip değildir. Ayrıca pigment oluşturmayan, nitratı indirgeme özelliği gösteren, nişastayı hidroliz eden, 36°C'de üreyen, nitrat ihtiva eden temel besi yerlerinde üreyen gram pozitif bir bakteridir. Bu bakımdan bu bakteride antioksidan bir enzim olan G6PD enziminin çalışılması oldukça önemlidir (Çakmakçı vd., 2001).

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (E.C.1.1.49; G6PD) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizleyen anahtar bir enzimdir. Bu enzim NADP⁺ varlığında glukoz 6-fosfatın, 6-fosfoglukonata dönüşümünü sağlar ve hücreler için son derece önemli olan NADPH oluşur (Lehninger vd., 1993; Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Canlılarda NADPH oluşumu için pentoz fosfat metabolik yolu çok önemlidir ve G6PD eksikliğinde NADPH önemli ölçüde azalır. NADPH'in en önemli rolü ise okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesini sağlamaktır. Bu reaksiyon glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir. Glutatyonun indirgenmiş formu (GSH), serbest tiyol grubu ihtiva eden bir tripeptiddir. Serbest tiyol grubu, proteinleri indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür; aynı zamanda hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek detoksifikasyon olaylarında rol alır (Yüreğir vd., 1988; Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Yoshida ilk defa 1966 yılında G6PD enzimini insan eritrositlerinden saflaştırmıştır (Yoshida ve Huang, 1966).

G6PD düzeyinin azalması ile hücrelerde NADPH ve GSH eksikliği olur. Enzim eksikliği olan hücrelerde GSH rejenerasyonu azalır. Bundan dolayı membran proteinlerindeki sülfhidril gruplarının oksidasyonu membran fonksiyonunu bozar ve membranda çok ciddi problemler meydana gelir (Deutsch, 1983; Weksler vd., 1990).

MATERYAL VE METOD

Materyal

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. NADP⁺ ve G6P Sigmadan, diğer kimyasallar ise Sigma veya Merck'ten alındı.

Bakterilerin Üretimi

Litresinde 28 gr nutrient agar (International Diagnostic Group Plc.) ihtiva eden besi yeri otoklavlanıp soğutuldu ve petrilere döküldü. Daha sonra derin dondurucuda -80 °C'de muhafaza edilen BA 142 kodlu bakteri petri plaklarına steril koşullar altında çizgi ekim yöntemiyle aktarıldı. Petriler 36°C ye ayarlanmış inkübatörde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bu bakteriler bir öze dolusu alınarak, 121°C 'de 15 dakika otoklavlanıp soğutulan ve litresinde 8 gr nutrient broth içeren sıvı besiyerine steril kabin ortamında aktarıldı. Sıcaklığı 28°C 'ye ayarlanmış çalkalayıcıda 1 gece inkübasyona bırakılarak bakterilerin üremesi sağlandı.

Homojenatın Hazırlanması

Sıvı besi yerinde yetiştirilen bakteri hücreleri 15.000xg de santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Elde edilen bakteri hücreleri havada sıvı azot ile muamele edilerek mümkün olduğunca ezildi ve toz haline getirildi. Böylece bakteri hücreleri parçalandı. Daha sonra toz haline getirilmiş bakteri hücreleri numuneleri 1 M Tris-HCl (pH 8,0) tamponunun mümkün olan en küçük hacminde süspanse edildi. Karışım daha sonra 15.000xg de santrifüj edilerek çökelek atıldı. Böylece homojenat hazırlanmış oldu. Bütün bu işlemler +4°C'de gerçekleştirildi.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Homojenatta değişik amonyum sülfat doyumluklarında çöktürme yapılarak, en uygun doyumluk konsantrasyonu % 0-60 arasında tespit edildi. Bu aralıkta katı amonyum sülfatla çöktürülen enzim, 5.000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Elde edilen çökelek, 100 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8,0) çözüldü. Enzim çözeltisi diyaliz torbalarına konarak 2'şer saat süreyle 2 defa değiştirilmek suretiyle 50 mM K-asetat/ 50 mM K-fosfat (pH 7,0) tamponuna karşı diyaliz edildi. Bütün bu işlemler +4°C'da yapıldı (Morelli vd., 1978; Delgoda vd., 1990; Ninfali vd., 1990; Shreve ve Levy, 1997).

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi ölçümü

Enzim aktivitesi spektrofotometrede 25°C'de Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metod NADP⁺'nin indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'nin 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır (Beutler, 1971).

Protein Miktarının Hesaplanması

Protein miktarı spektrofotometrik olarak 595 nm de Bradford metoduna göre yapıldı. Ölçümde bovin serum albümin proteini standart olarak kullanıldı (Bradford, 1976).

pH'nin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH'yı (optimum pH) bulmak için enzim aktivitesi çeşitli pH'lardaki tampon çözeltiler içinde ölçüldü (pH'ları 7,2 ile 8,9 arasında değişen 0,1 M Tris-HCl ile pH'ları 4,9 ile 8,0 arasında değişen 0,1 M Fosfat tamponları kullanılarak).

Enzimin Stabil Olduğu pH'nın Belirlenmesi

Bu amaçla eşit hacimde enzim çözeltisi ile çeşitli pH'lardaki tampon çözeltileri (pH'ları 7.2 ile 8.9 arasında değişen 0,1 M Tris-HCl ile pH'ları 4.9 ile 8.0 arasında değişen 0,1 M Fosfat tamponları kullanılarak) karıştırıldı ve +4°C'de buzdolabında inkübe edildi ve 8 saat ara ile 24 saat boyunca enzim aktivitesi ölçüldü.

Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesi 10 ile 70°C arasındaki sıcaklıklarda ölçülerek enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık tespit edildi.

Kinetik Çalışmalar

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması için Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Bu amaçla sabit G6P (6 mM) konsantrasyonunda ve 5 farklı NADP⁺ konsantrasyonunda (0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 mM) ve sabit NADP⁺ (2 mM) ve 5 farklı G6P konsantrasyonunda (0,0375, 0,075, 0,15, 0,3, 0,6 mM) enzim aktivitesi ölçüldü. Daha sonra 1/V ye karşı 1/[S] grafikleri çizildi ve bu grafiklerden hem G6P hemde NADP⁺ için K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Bütün kinetik çalışmalar 25 °C ve pH 8,0'de 100 mM'lık Tris-HCl tamponu kullanılarak yapıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Bacillus* sp. bakterisinde bulunan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi ilk defa kısmen saflaştırıldı ve bazı kinetik özellikleri tespit edildi. Saflaştırma prosedürü homojenatın hazırlanması ve amonyum sülfat çöktürmesi şeklinde iki basamaktan oluştu. Amonyum sülfat çöktürmesi proteinlerin kısmi saflaştırılmasında kullanılan etkili bir metottur.

Tablo 1 spesifik aktivitesi 0,23 EÜ/ml olan enzimin %79,19 verimle 82,14 kat olarak kısmi saflaştırıldığını gösterir. Görüldüğü gibi enzimin spesifik aktivitesi başlangıca göre 82 kat artmıştır.

Tablo 1. G6PD enziminin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	% Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,042	20	14,78	0,84	0,0028	100	1
Amonyum sülfat Çöktürmesi (% 0-60)	0,32	2	1,39	0,64	0,23	79,19	82,14

Elde edilen bakteri homojenatlarında sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80, %80-90 doygunluk aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak G6PD enziminin %0-60 amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktüğü belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri çeşitli bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metodudur. Bu metod vasıtasıyla numune içerisindeki bir çok safsızlıklar elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir. Diyalizin yapılması ise ortamdaki amonyum sülfat ve enzim aktivitesini etkileyen diğer iyonların uzaklaştırılması açısından önemlidir.

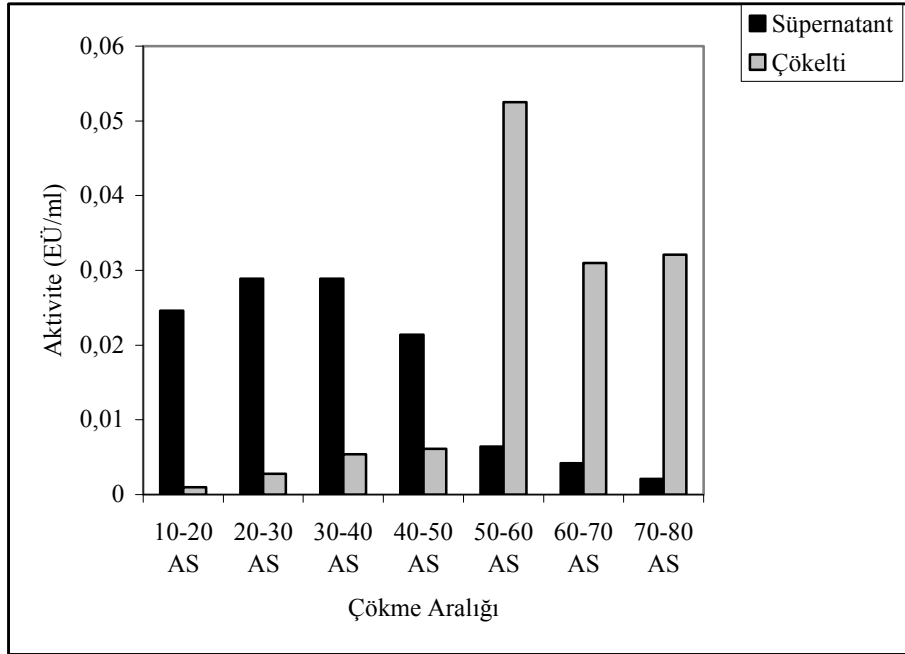
Enzimlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri ortamın pH'sıdır. Çünkü düşük ve yüksek pH'da enzim denatüre olur. Bundan dolayı optimum pH'nın bulunması oldukça önemlidir. Şekil 4 ve 5'teki grafiklerden görüldüğü gibi enzimin en aktif olduğu pH 100 mM Tris-HCl tamponunun kullanıldığı pH 8,0'dir. Bu pH değerinin daha önce aynı enzim için bulunan pH değerlerine yakın olduğu literatür çalışmalarından belirlendi (Okuno vd., 1985; Niehaus ve Mallet, 1994; Heise ve Opperdoes, 1999).

Enzim çalışmalarında kısmen yada tamamen saflaştırılan enzimin uzun süre aktivitesini koruması açısından enzimin stabil olduğu pH çok önemlidir. Bu çalışmada enzimin stabil olduğu pH, 100 mM Tris-HCl kullanılarak (Şekil 2 ve 3) pH 8,0 olarak hesaplandı. Bu pH değerinin daha önce aynı enzim için bulunan stabil pH değerlerine yakın olduğu literatür çalışmalarından belirlendi (Yılmaz vd., 2002; Çiftçi vd., 2003; Yılmaz vd., 2003).

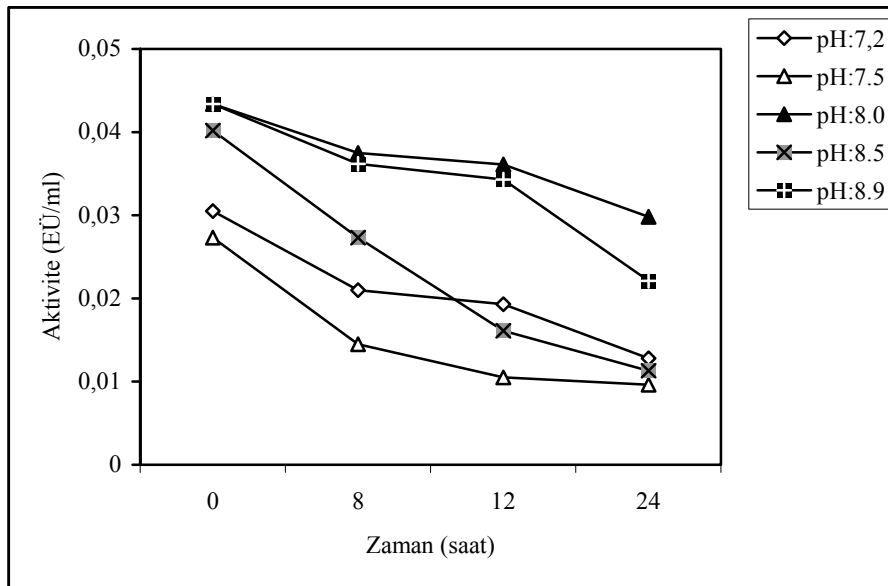
Enzim reaksiyonlarında sıcaklık arttıkça aktivite artar ancak 50°C'nin üzerinde proteinler hızla denatüre olduğundan dolayı aktivite gittikçe azalır ve daha yüksek sıcaklıklarda aktivite yok olur. Enzimlerin optimum sıcaklığı genelde 50°C civarındadır. Şekil 6'dan görüldüğü gibi G6PD enziminin aktivitesi 50°C'de en yüksektir. Dolayısıyla bu enzimin optimum sıcaklığı 50°C'dir. Okuno ve arkadaşları *Bacillus steorothermophilus*'tan saflaştırdıkları G6PD enzimi için optimum sıcaklığını 30-60°C arasında bulmuşlardır (Okuno vd., 1985).

Kantitatif protein tayinleri ise Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem; fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie brilliant blue G-250 reaktifıyla kompleks oluşturması esasına dayanır. Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Proteinin bağlanması kırmızı formun ($\lambda_{\max}=465\text{ nm}$) mavi forma ($\lambda_{\max}=595\text{ nm}$) dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein boya kompleksinin çözeltisinde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır (Bradford, 1976).

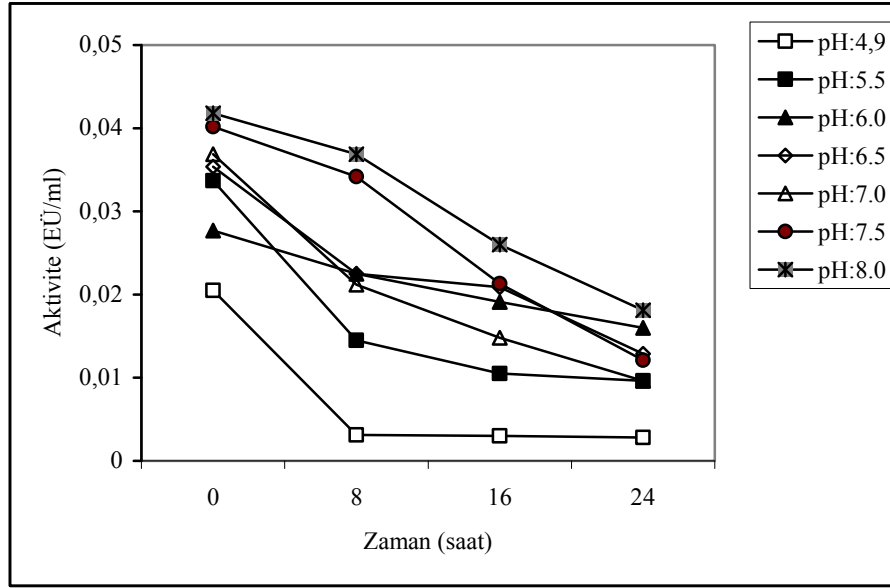
G6PD enziminin doğal substratları NADP^+ ve G6P'dir ve bu substratlar için bulunan K_M ve V_{\max} değerleri sırasıyla 0,0827 mM, 0,0025 EÜ/ml 0,297 mM, 0,0028 EÜ/ml ve şeklindedir. Görüldüğü gibi NADP^+ için elde edilen K_M değeri daha düşüktür. Dolayısıyla NADP^+ 'nin enzime ilgisi daha yüksektir. Bu durum literatürle uygunluk göstermektedir (Okuno vd., 1985; Scopes vd., 1985; Reuter vd., 1990; Niehaus ve Mallet, 1994; Heise ve Opperdoes, 1999).



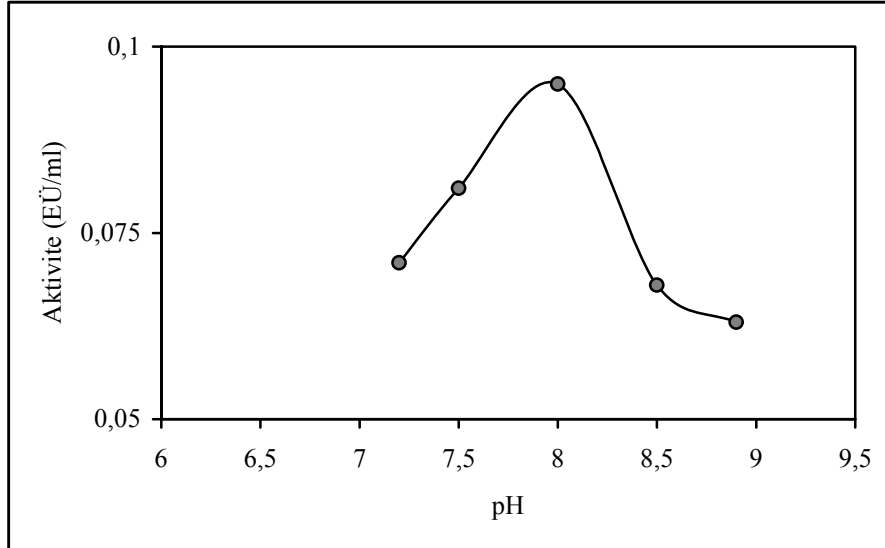
Şekil 1. G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği.



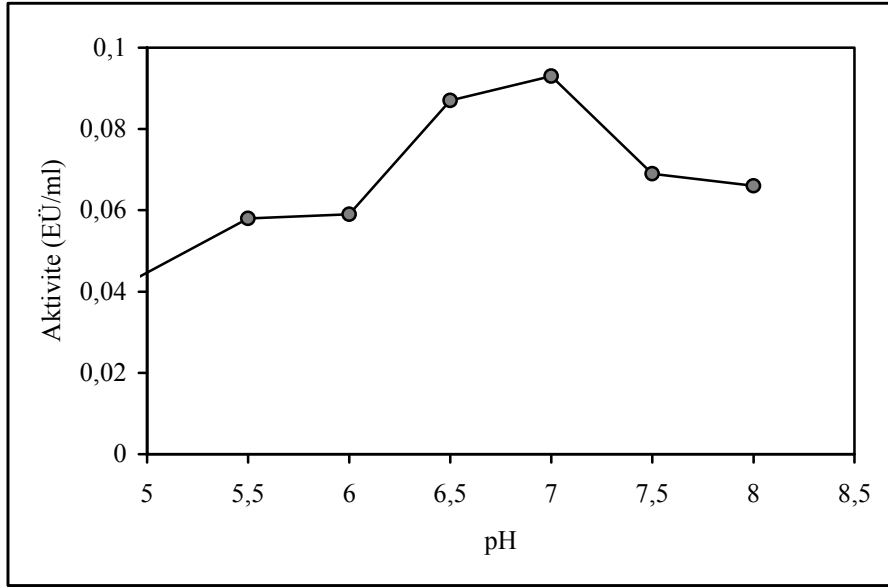
Şekil 2. 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak G6PD enziminin stabil pH'sı için çizilen zaman-aktivite grafiği.



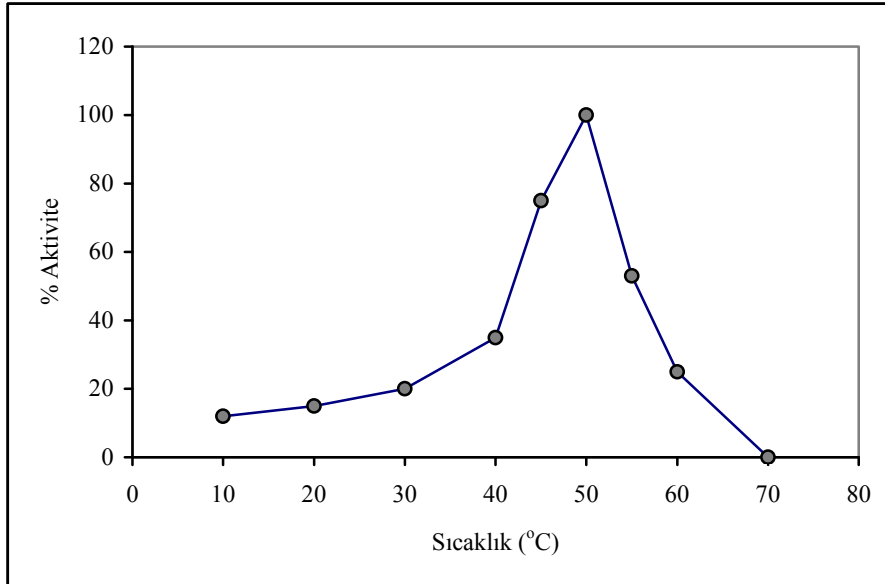
Şekil 3. 100 mM fosfat tamponu kullanılarak G6PD enziminin stabil pH'sı için çizilen zaman-aktivite grafiği.



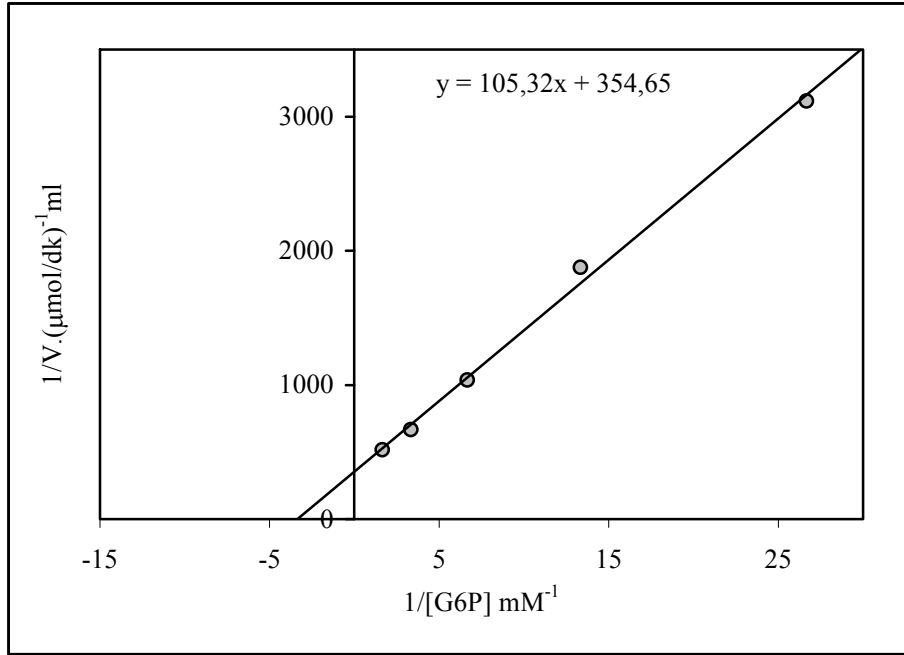
Şekil 4. 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak G6PD enziminin optimum pH'sı için çizilen pH-aktivite grafiği.



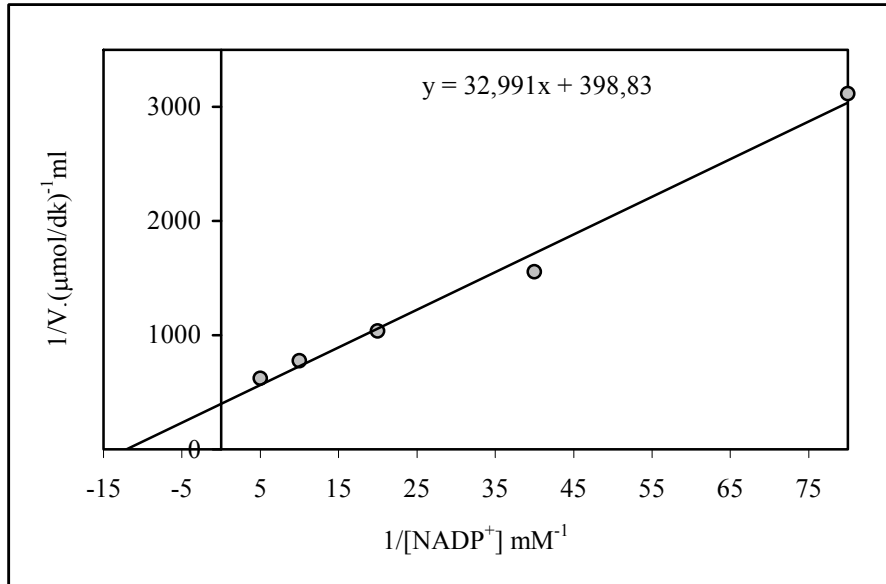
Şekil 5. 100 mM fosfat tamponu kullanılarak G6PD enziminin optimum pH'sı için çizilen pH-aktivite grafiği.



Şekil 6. G6PD enzimi için optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.



Şekil 7. 5 farklı G6P derişimi kullanılarak G6PD enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 8. 5 farklı NADP^+ derişimi kullanılarak G6PD enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

KAYNAKLAR

- Beutler E., 1971. Red cell metabolism manual of biochemical methods. p.19,68. Academic Press, London.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-251.
- Çakmakçı, R., Kantar, F., Şahin, F., 2001. Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 164: 527-531.
- Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Altukat, S., 2003. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (Bubalus bubalis) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Protein Expression and Purification*. 29: 304-310.
- Delgado C, Tejedor MJ, Luque J., 1990. Partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphofruktokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*, 498: 159-168.
- Deutsch J., 1983. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods of enzymatic analysis*, Edited by Bergmeyer HU and Bergmeyer J, 3:190-196.
- Heise, N., Oppendoes, F.R., 1999. Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 99: 21-32.
- Keha EE, Küfrevioğlu Öİ., 1997. *Biyokimya*, Şafak Yayınevi, Erzurum.
- Lehninger A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- Morelli, A., Benatti, U., Gaetani, G.F., De Flora, A., 1978. Biochemical mechanisms of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci.*, 75: 4-9
- Niehaus, W.G., Mallett, T.C., 1994. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans*: Identification as "Nothing dehydrogenase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313(2): 304-309.
- Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani, L., Rapa, S., 1990. Rapid purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Preparative Biochemistry*, 20:297-309.
- Okuno, H., Nagata, K., Nakajima, H., 1985. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Biochemistry*, 7: 192-201.
- Reuter, R., Naumann, P., Metz, P., Kopperschlager, G., 1990. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas* W6. *Biomed. Biochim. Acta* 49(7): 539-546.
- Scopes, P.K., Testolin, V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K., Algar, E.M., 1985. Simultaneous purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.*, 228: 627-634.
- Shreve, D.S., Levy, H.R., 1997. On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78:1369-1375.
- Weksler, B.B., Moore, A., Tepler, J., 1990. Hematology. In *Cecil essentials of medicine*, Edited by Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith LH, Jr., 2nd edn, Philadelphia: WB Saunders Company, 341-363.
- Yılmaz, H., Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Bakan Küfrevioğlu, 2003., Purification and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase from turkey erythrocytes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40: 62-65.
- Yılmaz H., Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Bakan E., 2002 Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from chicken erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 32 (3): 287-301.
- Yoshida, A., Huang, I.Y., 1986. Structure of human G6PD. Academic Press Inc Ltd, London.
- Yüreğir, T.G., Aksoy, K., Dikmen, N., Ünlükurt, İ., 1988. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden kısmi saflaştırılması ve enzimolojik özelliğinin incelenmesi. IX.Ulusal Biyoloji Kongresi, Genel Biyoloji, Nümerik Taksonomi ve Kantitatif Ekoloji Paneli bildiri, 1:125-130.