

ENZİM MÜHENDİSLİĞİ – Hafta 10

Prof.Dr.Zekiye Serpil Takaç

SANTRİFÜJ

Enzim gibi büyük moleküller yüksek santrifüj alanında ultrasantrifüj ile ayrılırlar. Sedimentasyon hızı molekülün boyut ve şekline, çözeltinin viskozitesine de bağlı olmasına rağmen molekül ağırlığı arttıkça hız da artar. Bu yöntem enzimleri birbirlerinden ayırmada çok kullanılmaz, çünkü ultrasantrifüjde sadece küçük hacimler (birkaç cm^3) işlem görebilir. Halbuki santrifüj, izolasyonda çökmüş veya çözünmez materyali uzaklaştırmada veya $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmüş enzimi uzaklaştırmada çok kullanılır. Bu durumda düşük santrifüj alanları (5000-50.000) x g gereklidir ve birkaç litreye kadar hacim uygundur.

ADSORPİYON

Bileşenlerin sıvı ortamdan katı yüzeyine adsorpsiyonu, fermentasyon ortamından çözünebilir materyalin ayrılmasında en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Adsorpsiyonda çeşitli mekanizmalar yer alabilir. Fiziksel adsorpsiyonda van der Waals kuvvetleri gibi zayıf bağlar baskındır. İyon değişim adsorpsiyonunda kuvvetli iyonik bağlar vardır. Adsorpsiyonda, çözünen bileşen sıvı fazdan katıya taşınır; kesikli işletimde bir süre sonra dengeye ulaşılır. Kullanılan adsorbentin türü uygulamaya bağlı olarak değişir. İyon değiştirici reçineler ve diğer polimerik adsorbentler protein veya küçük moleküllerin ayrılmasında kullanılır.

KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

JEL FİLTRASYON

Farklı moleköl ağırlığındaki enzimler dolgulu bir jeldeki dolguların gözeneklerine girme yeteneklerine göre ayrılırlar. En çok kullanılan jel türleri Sephadex, Bio-jel P, Sepharcyl ve Sepharose'dur. Jel ile doldurulmuş kolondan akarken dolguların gözeneklerine girebilen küçük moleküller jelde kalır, büyük moleküller ise kolonu terkeder. Gözeneklerin boyutları değiştirilerek ayrılacak moleköl ağırlığını belirlemek mümkündür. Örneğin Sephadex G-100, MA=4000-150.000 Da arasında olan küresel proteinleri ayırır. Enzim ile jel arasında spesifik olmayan etkileşimleri en aza indirmek için çok kuvvetli iyonik gerilimden kaçınmak gerekir. Jel filtrasyon büyük ölçekte yapılabilir, ancak büyük kolonların işletimi zaman alıcı ve doldurulacak jel de pahalı olduğu için bu yöntem uygulamasını küçük ölçekte bulur. Ayrıca HPLC'de de jel filtrasyon uygulamaları vardır.

İYON DEĞİŞİM KROMOTOĞRAFİSİ

Farklı yükteki tanecikler arasında elektrostatik çekme etkileşimlerine dayanır. İyon değiştirici reçineler selüloz, Sephadex gibi materyallerin modifiye edilmesi ile hazırlanır. Saflaştırma işleminde enzim genellikle düşük iyonik gerilimde ve enzim ile iyon değiştiricinin ters işaretli olduğu pH değerinde iyon değiştirici ile temas ettirilir. İyon değiştiriciye bağlanmış olan enzim desorpsiyonu, pH'ı yani yükleri değiştirerek veya daha çok uygulandığı gibi çözeltinin iyonik gerilimini derişimleri artan katyon ve anyonları iyon değiştiriciye bağlamak için yarışacak şekilde- artırarak yapılır. İyon değişim kromotografi büyük veya küçük ölçekte uygulanabilir.

Büyük ölçekte kesikli çalışmak uygundur. Günümüzde uygulaması çoktur; iyon değişimi temelli HPLC de vardır.

Kaynak:

- Bailey JE and Ollis DF, Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw Hill, Second Edition, 1986.
- Shuler ML and Kargı F, Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2. Baskı, Prentice Hall, 2001.
- Doran PM, Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, 1995.