

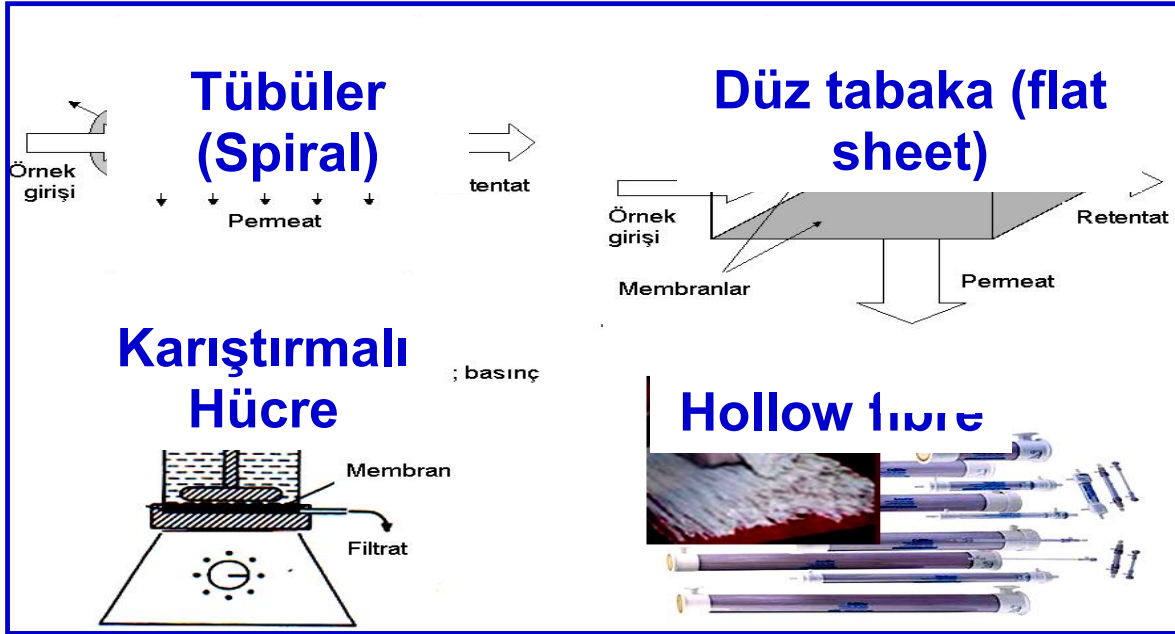
6. Hafta: Ultrasantrifüj ve Tuzların Ekstraksiyonu: Diyaliz, Salting out, Salting in, Organik çözücülerle ve Organik Polimerlerle Çöktürme

Prof. Dr. Şule Pekyardımcı

Ultrasantrifüj

Proteinler, hidrostatik basınç ve santrifüj kuvvetlerinin etkisiyle molekül büyüklüklerine göre hızlı bir şekilde ve yüksek bir verimle fraksiyonlanabilir.

Bu işlemde membran por çapları 0,001-0,02 µm arasındadır. Molekül şekli de porlardan membran geçişini etkiler. Molekül kütlesi 100 000 Dalton olan globüler protein 100 000 NMWC olan bir membrandan geçemez, ancak doğrusal moleküller geçebilir. NMWC deki azalmayla membran akış hızı azalır. Bu durumda daha uzun işlem süresine veya daha yüksek basınca gerek vardır.



Mikrofiltrasyon

Bu yöntemde yarı geçirgen membran filtresine uygulanan hidrostatik basınçla çözünmüş moleküller ve su filtre edilirken hücre, hücre organelleri ve hücre kalıntılarının tutulma ve

yoğunlaşma işlemi steril koşullarda gerçekleştirilir. Membran por çapları, mikrofiltrasyonda 0,02 µm, ultrafiltrasyonda 0,001-0,02 µm, hiperfiltrasyon veya ters osmozda ise 0,0001-0,001 µm arasındadır. Mikrofiltreler, derin filtreler ve membran filtreleri şeklinde kullanılır. Filtrasyonda verimlilik önemlidir. Filtrelere uygulanan basınç farkı uygun akış hızını ve kütle transferini sağlayacak değerde olmalıdır. Basınç farkı belli bir değerin üstünde olursa kirlilik tabakası sıkıştığı için akış hızı azalır. Derin filtrelerde ölü son, membran filtrelerinde ise çapraz akış tarzında filtrasyon başarılı sonuçlar verir.

Mikrofiltrasyonun farklı uygulamaları:

- ⇒ Biyoreaktörlerden hücrelerin toplanması
- ⇒ Solüsyonlardan virüs uzaklaştırılması
- ⇒ Meyva suyu ve meşrubatların berraklaştırılması
- ⇒ Hücrelerin fermentasyon ortamından uzaklaştırılması
- ⇒ Su saflaştırılması
- ⇒ Hava filtrasyonu
- ⇒ Sterilizasyon

DİYALİZ

Diyaliz, küçük molekülü bileşenlerin ve iyonların genellikle tuzların uzaklaştırılmasında ve tampon değişiminde kullanılır. Özellikle, amonyum sülfat çöktürmesi sonrası iyon değişim kromatografi yöntemi uygulanacaksa, düşük iyon şiddetindeki bir tamponla tuzun uzaklaştırılması gerekir. Ayrıca, diyalizle ATP gibi küçük moleküller de ortamdan uzaklaştırılabilir.

ÇÖKTÜRMEYLE DERİŞTİRME VE SAFLAŞTIRMA

Proteinlerin çökmesi, pH, iyonik kuvvet, organik çözücü veya polimer ilavesi gibi değişen faktörlerle protein moleküllerinin agregasyonu sonucu meydana gelir.

Çöktürme yöntemleri herhangi bir analiz öncesi veya uygun saflaştırma adımı sonrası proteinlerin konsantre edilmesinde ve/veya izolasyonunda kullanılırlar.

Çöktürmede kullanılan madde izleyen saflaştırma adımlarında ve ölçüm yöntemlerinde (protein, aktivite vb.) girişim yapabilir. Bu nedenle çözünen preparat; diyaliz, ultrafiltrasyon veya jel filtrasyon gibi yöntemler ile uzaklaştırılmalıdır.

İyonik Kuvvetin Azalmasıyla Çöktürme (Salting-in)

İyonik kuvvetteki azalma su ilavesiyle olur ve çözelti seyreltik hale gelir, konsantrasyon azalır, çözünürlük artar. Protein üzerindeki yük etkileşimleri korunur. Böylece protein agregasyonu önlenir.

Tuz konsantrasyonunun azaltılması sonucu meydana gelen agregatlaşmalar, diyalizle tuzların uzaklaştırılması sırasında proteinler arasında artan iyonik etkileşimlerle meydana gelir.

İyonik Kuvvetin Artmasıyla Çöktürme (Salting-out)

Nötral tuzların ilavesiyle proteinlerin çöktürülerek ayrılması yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çöktürülen proteinlerin aktivitesi pelletin tekrar çözünmesiyle geri kazanılır. Proteinler, nötral tuzların ilavesiyle denatürasyon, proteoliz ve bakterial kontaminasyona karşı kararlı hale getirilir. Çökmenin nedeni, protein yüzeyindeki hidrofobik bölgelerin özellikleri ile ilgilidir.

Hidrofobik gruplar, genelde proteinin iç kısımlarında bulunur, ancak yüzeyde de bölgesel olarak dağılmıştır. Ortamda bulunan su molekülleri bu gruplarla etkileşerek onları içe doğru sıkıştırır. Ortama tuz ilave edildiğinde tuz iyonlarına ayrışır, artan tuz konsantrasyonu, su molekülleri proteinin yüzeyinden uzaklaşır ve proteinin hidrofobik bölgeleri açıkta kalır. Daha sonra protein moleküllerinin yüzeyinde bulunan hidrofobik bölgeler birbirleriyle etkileşerek agregatlaşmalar meydana gelir.

Proteinlerin çöktürülmesinde oldukça yaygın kullanılan tuzlardan birisi amonyum sülfattır. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ kullanımının avantajları şunlardır.

1. Doygunluk konsantrasyonu (20°C da 4,0M) gibi yüksek bir değer olduğundan bu konsantrasyonda birçok protein çöker.
2. Çözünme ısısı düşük olduğu için kolaylıkla çözünür.
3. Doygun $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ çözeltisinden proteinin santrifüjle uzaklaştırılması diğer tuzlara göre daha kolaydır.

4. Bu tuzun doygun çözeltilisi birçok bakterinin büyümesini önler veya sınırlandırır.
5. Amonyum sülfat birçok proteinin denatürasyonunu önler. Bu nedenle, saflaştırılmış proteinler genellikle doygun $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltilerinde süspansiyon halinde depolanır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi ekstraktın pH sını çok hafif asidik bölgeye kaydırır. pH değerini 6,0-7,5 arasında tutmak için 50 mM lık bir tampon kullanılması yeterlidir.

Organik Çözücülerle Çöktürme

Proteinlerin çoğu, aseton ve etanol gibi organik çözücülerle çöktürülebilir. Organik çözücü ilavesiyle bir proteinin çökmesi izoelektrik çöktürmeye benzer. Organik çözücü bu proteinlerin hidrofobik bölgelerindeki su molekülleriyle yer değiştirerek çözünmesini artırır.

Protein çözeltilisine organik çözücülerin ilavesi, suyun dielektrik sabitini ve dolayısıyla çözme gücünü azaltır. Proteindeki hidrofobik bölgelerin çevresinde düzenli olarak bulunan su moleküllerinin yerini organik çözücü alır.

Denatürasyonla Çöktürme

Proteinleri denatürasyonla çöktürmede sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve organik çözücü faktörleri etkilidir. Denatürasyonda, proteinin tersiyer yapısının bozulmasıyla oluşan rastgele (random-coil) yapılar birbirine dolanarak agregatlaşma meydana getirir. Birçok bakteriyal proteinin pI değeri pH 5,0 civarındadır. Bu nedenle prokaryotlardaki rekombinant proteinlerin başlangıç saflaştırma basamağı ortamın pH'ı bu değere getirilerek yapılır.

Perklorik asit veya trikloroasetik asit gibi kuvvetli asitler aktivitenin önemli olmadığı analiz amaçlı çöktürmelerde kullanılabilir.

PROTEİNLERİN ORGANİK POLİMERLERLE ÇÖKTÜRÜLMESİ

Polietilen Glikolle Çöktürme

Organik polimerlerle proteinlerin çöktürülmesinde polietilen glikol (PEG) yaygın olarak kullanılır. Özellikle son yıllarda PEG ile çöktürmeye yönelik yoğun araştırmalar yapılmaktadır.