

Elina Kaivonen

Teollisen entsyymin kiteytymen menetelmän optimointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

25.5.2016

Tekijä(t) Otsikko	Elina Kaivonen Teollisen entsyymin kiteytysmenetelmän optimointi
Sivumäärä Aika	49 sivua + 5 liitettä 25.5.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	Lehtori Mikko Halsas Formulaatioteknologiapäällikkö Katja Palmunen Tutkimusinsinööri Mirikka Perkkalainen
<p>Kiteytyksellä on pitkät perinteet proteiinien, erityisesti entsyymien puhdistuksessa. Menetelmä on optimoitu sekä tehokas että edullinen tapa erottaa haluttuja entsyymejä liuoksesta. Lisäetuina kiteytys mahdollistaa väkevien entsyymiformulaatioiden valmistamisen, stabiilimman entsyymin ja yleensä helpon siirtymisen suurempaan mittakaavaan (scale-up).</p> <p>Työn tavoitteena oli löytää yhdelle valitulle entsyymille sellaiset olosuhteet, joissa kiteytyminen olisi mahdollisimman tehokasta; tarkoituksena oli käyttää kiteytystä entsyymin puhdistamiseen suoraan fermentointiliemestä. Työn aikana ilmenneiden haasteiden vuoksi alustavaa suunnitelmaa jouduttiin muokkaamaan työn edetessä, minkä seurauksena yhden entsyymin sijasta kiteytysolosuhteiden optimointia tehtiin lopulta neljälle entsyymille. Syitä tähän olivat ennalta-arvaamattomat entsyymin kiteytymiseen ja aktiivisuuden analysointiin liittyvät ongelmat. Salassapidon vuoksi käytettyjä entsyymejä ei voida työssä tarkemmin esitellä vaan niihin viitataan ainoastaan entsyymeinä, jotka on eroteltu toisistaan koodilla (A, B, C ja D).</p> <p>Entsyymien kiteytyvyyttä tutkittiin ensin hanging drop -menetelmällä ja myöhemmin pienen mittakaavan panoskiteytyskokeina. Lisäksi kiteiden liukoisuutta tutkittiin pH:n, lämpötilan ja saostinpitoisuuden funktiona. Tulosten perusteella entsyymille D saatiin piirrettyä liukoisuuskäyriä, joiden avulla nähtiin kyseiselle entsyymille optimaalisimmat kiteytysolosuhteet.</p> <p>Entsyymille D saadaan lähes 100 %:n laskennallinen kidesaanto pH-välillä 7,1—7,6, kun suolapitoisuus (Na-K-fosfaattipitoisuus) on välillä 0,6—1,0 M tai vaihtoehtoisesti pH-välillä 6,0—6,4, kun suolapitoisuus on 1 M. Selvitetyt kiteytymisolosuhteet eivät ole vielä riittävät varsinaista kiteytysprosessia varten, mutta tarjoavat hyvän pohjan lisätutkimukselle.</p>	
Avainsanat	Entsyymi, kiteytys, teollinen kiteyttäminen, proteiini, liukoisuuskäyrä

Author(s) Title	Elina Kaivonen Optimization of the crystallization of an industrial enzyme
Number of Pages Date	49 pages + 5 appendices 25 May 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Mikko Halsas, Senior Lecturer Katja Palmunen, Head of Formulation Technology Mirkka Perkkalainen, Research Engineer
<p>Crystallization has long traditions in purification of proteins, especially enzymes. When optimized, crystallization is an efficient and inexpensive way to separate desired enzymes from a solution. Crystallization also enables highly concentrated formulation products, more stable enzyme and usually easy scale-up, which can be considered as additional benefits.</p> <p>The purpose of this thesis was to find as optimized circumstances as possible to crystallize the desired enzyme. The plan was to use crystallization as a purification method straight from the fermentation liquid. Due to challenges, which occurred during the experiments, the original plan had to be modified. As a result, four enzymes were submitted to crystallization experiments instead of one. Main reasons for this were unexpected complexities in enzyme crystallization and enzyme activity analysis. The used enzymes will not be further introduced, but they will be referred as enzymes with letter codes (A, B, C and D) on account of the confidentiality contract.</p> <p>The crystallization of the enzymes were first examined by the hanging drop method and later as small scale batch crystallization experiments. Also the solubility of the crystals was examined as a function of pH, temperature and precipitant concentration.</p> <p>The computational crystal yield, almost 100%, is reached when the pH is between 7.1—7.6, when the salt concentration (sodium potassium phosphate concentration) is between 0.6—1.0 M, or, optionally, when the pH is between 6.0—6.4 and the salt concentration is 1 M. The examined crystallization circumstances are not adequate enough to create a final crystallization process, but they supply a good base for further research.</p>	
Keywords	enzyme, crystallization, industrial crystallization, protein, solubility curve

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Entsyymit	2
3	Entsyymien käyttö teollisuudessa	4
4	Proteiinien/entsyymien kiteyttäminen	5
4.1	Kide ja kiteytyminen	5
4.2	Entsyymien kiteytys	6
4.3	Biologiset makromolekyyliset kiteet vs. pienimolekyyliset kiteet	6
4.4	Entsyymikiteytyksen parametreja	7
4.4.1	Puhtaus	7
4.4.2	Liukoisuus ja ylikylläisyys	8
4.4.3	Saostimet	9
4.4.4	Lämpötila	10
4.4.5	pH ja puskurointi	11
4.4.6	Siemennys	11
5	Entsyymikiteytyksen optimoinnin kuvaus	12
5.1	Työn kulku ja rakenne	12
5.2	Työturvallisuus	14
5.3	Entsyymit A, B, C ja D	14
5.4	Menetelmät	15
5.4.1	Hanging drop -menetelmä	15
5.4.2	A280-mittaus	16
5.4.3	SDS-PAGE	16
5.4.4	Entsyymin aktiivisuusanalyysi	17
5.4.5	Ultrasuodatus	18
6	Hanging drop -kokeet	18
7	Kiteytys- ja liukoisuuskokeet	22
7.1	Kiteytyskoe 1, kidemassan kerääminen	22

7.1.1	Kiteiden värjäys	22
7.1.2	Kiteiden pesu	23
7.2	Liukoisuuskoe 1, pH:n vaikutus	23
7.2.1	SDS-PAGE	24
7.2.2	A280-mittaus	26
7.2.3	Kiteiden liuotus	26
7.3	Kiteytyskoe 2, kiteytyslämpötilan nostaminen	26
7.4	Kiteytyskoe 3, suolalisäyksen vaikutus	28
7.5	Kiteytyskoe 4, kidemassan kerääminen ja suolalisäys	30
7.6	Liukoisuuskoe 2, lämpötilan ja suolapitoisuuden vaikutus	31
7.7	Kiteytyskoe 5, suolalisäyksen vaikutus	34
7.8	Kiteytyskoe 6, Na-K-fosfaatin vaikutus	36
7.9	Kiteytyskoe 7, pH:n vaikutus	37
8	Aktiivisuusmääritykset	39
8.1	Liukoisuuskoe 1	39
8.2	Lähtönäyte, emäliuos ja konsentroimaton näyte	41
8.3	Kiteytyskoe 6	41
8.4	Kiteytyskoe 7	46
9	Tulosten yhteenveto	47
	Lähteet	49
	Liitteet	
	Liite 1. EK1-boksin mikroskopointikaavake	
	Liite 2. Liukoisuuskoe 2:n ohje	
	Liite 3. A280-mittausten tulokset	
	Liite 4. Kiteytyskoe 6:n ohje	
	Liite 5. Aktiivisuusanalyysin tulokset	

Lyhenteet

HCl	Vetykloridihappo, suolahappo.
NaOH	Natriumhydroksidi.
M	Pitoisuuden yksikkö, kertoo aineen moolipitoisuuden litraa kohden.
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi.
PEG	Polyetyleeniglykoli.
MPD	Heksyleeniglykoli.
E.C.	Entsyymien luokittelujärjestelmä.

1 Johdanto

Insinööriyön aiheena oli teollisen entsyymien kiteytyksen optimointi. Toimeksianto opin-
näytetyölle tuli bioteknologia-alan yritykseltä, Roal Oy:ltä, joka valmistaa teollisuudent-
syynejä Rajamäellä. Opinnäytetyö toteutettiin Roalin tutkimus- ja tuotekehitysosastolla
formulointiyksikössä.

Tavoitteena oli löytää yhdelle valitulle entsyymille sellaiset olosuhteet, joissa kiteyty-
minen olisi mahdollisimman tehokasta; tarkoituksena oli käyttää kiteytystä entsyymien
puhdistamiseen suoraan fermentointiliemestä. Salassapidon vuoksi käytettyjä entsyy-
mejä ei voida työssä tarkemmin esitellä, vaan niihin viitataan ainoastaan entsyymeinä,
jotka on eroteltu toisistaan koodilla.

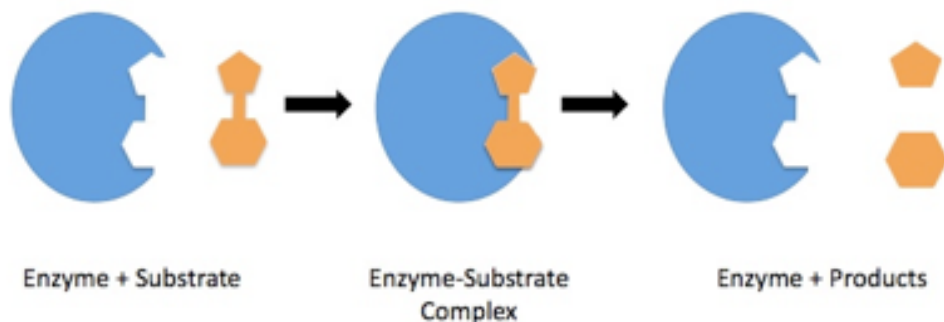
Työ koostuu sekä kirjallisesta että käytännön osuudesta. Kirjallisessa osuudessa käsi-
tellään yleisesti entsyymejä sekä niiden käyttöä teollisuudessa; lisäksi käydään läpi
entsyymien kiteytystä ja siihen vaikuttavia parametreja. Käytettyjen menetelmien teoria
käydään läpi käytännön osuudessa.

Käytännön osuudessa entsyymien kiteytyvyyttä tutkittiin aluksi hanging drop -
menetelmällä ja myöhemmin pienen mittakaavan panoskiteytyskokeina, joissa käytet-
tiin ensisijaisesti kirjallisuudessa mainittuja saostimia. Lisäksi kiteiden liukoisuutta tutkit-
tiin pH:n, lämpötilan ja saostinpitoisuuden funktiona.

2 Entsyymit

Entsyymit ovat biologisia katalyyttejä, useimmiten proteiineja, jotka nopeuttavat kemiallisia reaktioita. Ne ovat täysin biohajoavia ja niitä löytyy kaikkialta luonnosta. Entsyymit pystyvät alentamaan substraattiin kohdistuvaa aktivaatioenergiaa, mihin niiden kyky katalysoida kemiallisia reaktioita perustuu. Entsyymien rooli korostuu erityisesti elävissä systeemeissä, joissa lähes kaikki reaktiot ovat entsyymien katalysoimia. Näin ollen niitä voidaan kutsua elämän katalyyteiksi, sillä ilman niitä elämän kannalta tärkeät reaktiot etenisivät liian hitaasti. Esimerkiksi on arvioitu, että jos solussa tapahtuva reaktio etenee entsyymien läsnä ollessa 0,01 sekunnissa alusta loppuun, veisi sama reaktio ilman entsyymiä ainakin vuorokauden. [1, s. 52; 2; 3, s. 104–105; 4.]

Tässä yhteydessä substraatilla viitataan molekyyliin, johon entsyymi sitoutuu muodostaen entsyymi-substraatti-kompleksin. Substraatti kiinnittyy entsyymiin aktiiviseen kohtaan, joka on yleensä hyvin substraattispesifinen. Substraatti muuntuu entsyymien katalysoimana reaktiotuotteeksi tai -tuotteiksi, jotka irtoavat entsyymistä, minkä jälkeen entsyymi on valmis tarttumaan uuteen substraattiin. Substraatti on siis reaktion lähtöaine. Entsyymireaktion kulkua on havainnollistettu kuvassa 1. Vaikka teoriassa katalyytti ei kulu, entsyymien teho kuitenkin heikkenee sen katalysoitua tietyn määrän reaktioita toimintaolosuhteiden muuttuessa. Toimintaolosuhteilla voidaan tarkoittaa esimerkiksi lämpötilaa, pH:ta ja substraatti-/lopputuotepitoisuutta. [2; 3, s. 107.]



Kuva 1. Yksinkertaistettu kuvasarja entsyymien katalysoimasta reaktiosta. [5]

Substraattispesifisyyden lisäksi entsyymeillä on myös reaktiospesifisyyttä. Tällä tarkoitetaan sitä, että yksi molekyyli voi toimia substraattina useammalle entsyymille, mutta kustakin reaktiosta syntyy eri lopputuotteet. Esimerkkinä tästä mainittakoon glukoosi,

joka glukoosi-isomeraasi-entsyymin toimesta muuttuu fruktoosiksi, mutta glukoosi-oksidaasi-entsyymiin sitoutuessaan taas glukonihapoksi. [2; 3, s. 107; 6, s. 17.]

Entsyymin aktiivinen keskus, johon substraatti sitoutuu, ei yleensä pysty sellaisenaan sitomaan substraattia vaan tarvitsee avuksi orgaanisen molekyylin tai metalli-ionin. Näitä kutsutaan kofaktoreiksi tai prosteettisiksi ryhmiksi. Esimerkiksi rauta, magnesium, kupari tai sinkki voivat toimia kofaktoreina. Orgaanisia kofaktoreita kutsutaan koentsyymeiksi; nämä ovat yleensä vitamiinien johdannaisia. [1, s. 54; 2; 3, s. 106.]

Entsyymin aktiivisuudeksi kutsutaan entsyymin toimintaa reaktion katalyyttinä. Aktiivisuutta käytetään entsyymin määrän mittana, ja se kertoo entsyymin katalysoimien reaktioiden lukumäärän aikayksikössä. Entsyymin aktiivisuuteen vaikuttavat sille spesifisten inhibiittorien ja substraattien konsentraatiot sekä mahdolliset entsyymiä aktivoivat molekyylit. Inhibiittorit ovat entsyymin toimintaa estäviä aineita, esimerkiksi N,N-dimetyylipropargylamiini inhiboi monoamiinioksidaasi-entsyymin toimintaa estämällä tarvittavan kofaktorin sitoutumisen entsyymin aktiiviseen keskukseen. Myös ympäristön olosuhteet vaikuttavat entsyymiaktiivisuuteen, kuten pH, lämpötila ja liuoksen sisältämät suolat sekä ionivahvuus. [1, s. 53; 7 s. 50; 8.]

Entsyymit voidaan luokitella eri ryhmiin niiden katalysoiman reaktion perusteella. Pääluokkia on kuusi:

1. oksidoreduktaasit
2. transferaasit
3. hydrolaasit
4. lyaasit
5. isomeraasit
6. ligaasit

Tämän lisäksi jokaisessa pääluokassa on useita alaluokkia. Pääluokka kertoo entsyymin katalysoiman reaktion reaktiotyyppin ja alaluokka taas kertoo tarkasti entsyymin katalysoiman reaktion. Tämän lisäksi entsyymeillä on oma E.C.-järjestelmänsä; entsyymin katalysoima reaktio ja reaktio-olosuhteet selviävät entsyymin nelinumeroisesta E.C.-numerosta. Esimerkiksi hiilihappoanhydraasin E.C.-koodi on 4.2.2.1. [3, s. 105—106; 9, s. 4—6, 10.]

3 Entsyymien käyttö teollisuudessa

Katalyyttisen luonteensa vuoksi entsyymit aikaansaavat mittavia energiasäästöjä teollisuudessa. Lisäksi entsyymien käyttö vaikuttaa epäsuorasti laitehankintojen hintoihin alentavasti, kun tuotantoprosessissa ei tarvita kalliimpia korkeaa painetta tai korroosiota kestäviä laitteita. Tämä johtuu siitä, että entsyymit toimivat pääsääntöisesti miedommassa olosuhteissa verrattuna kemikaaleihin. Entsyymit ovat myös kemikaaleja spesifisempiä, jolloin vältytään monilta sivutuotteilta, joita tuotannossa tavallisesti syntyy. Suurin osa teollisuudessa käytetyistä entsyymeistä on hydrolyyttisiä entsyymejä, jotka kykenevät pilkkomaan erilaisia kemiallisia yhdisteitä. [11; 12; 13, s. 61; 1, s. 113.]

Jo ennen ajanlaskun alkua entsyymejä on käytetty mm. oluen, viinin, juuston ja nahkatavaroiden valmistukseen. Tuolloin käyttö perustui valmistusprosessissa luontaisesti esiintyvien mikro-organismien tuottamiin entsyymeihin tai raaka-aineessa luontaisesti esiintyviin entsyymeihin. Esimerkiksi juuston valmistuksessa maidon saostamiseen käytetty juoksutin sisältää kymosiini-entsyymiä, jota on perinteisesti eristetty vasikan mahalaukusta. Nykyään entsyymejä voidaan tuottaa teollisesti mikro-organismien avulla suuressakin mittakaavassa, jolloin entsyymituotteista saadaan tasalaatuisempia, tehokkaampia ja puhtaampia. [13, s. 105; 14, s. 345; 15.]

Entsyymejä käytetään laajalti elintarvike-, panimo- ja rehuteollisuudessa. Esimerkiksi amylaasilla, ksylanaasilla ja proteaasilla voidaan vaikuttaa leivonnaisten rakenteeseen ja säilyvyyteen, kun taas juomateollisuus käyttää pektinaaseja mehun puristuksen tehostamiseen ja juoman sameuden säätämiseen. [12; 9, s. 99, 111—112.]

Rehuteollisuudessa entsyymejä käytetään rehujen ravintoarvojen ja sulavuuden parantamiseen: esimerkiksi fytaasin avulla voidaan kasviperäiseen rehuun orgaanisesti sitoutunut fosfori vapauttaa tuotantoeläimen käyttöön ja näin välttyä lisäfosforin lisäämiseltä rehuun [1, s. 115; 12].

Entsyymejä käytetään myös pesuaine-, metsä- ja tekstiiliteollisuudessa. Pesuaineissa entsyymejä käytetään tehoaineina pilkkomaan erilaisia tahroja ja huoltamaan tekstiilien pintaa. Pesuaineiden entsyymit voivat toimia matalissakin lämpötiloissa, jolloin puhdistaa pyykkiä saadaan entistä ympäristöystävällisemmin. Tekstiiliteollisuus käsittelee esimerkiksi denim-kankaita perinteisen kivipesun sijasta entsyymeillä, mikä lyhentää pesuprosessia ja on vähemmän kuormittavaa pesussa käytettäville koneille. Metsäteolli-

suus voi entsyymien avulla vähentää valkaisukemikaalien käyttöä ja energiankulutusta. [12; 16.]

4 Proteiinien/entsyymien kiteyttäminen

4.1 Kide ja kiteytyminen

Kiteille ominaista on niiden rakenteen järjestäytyneisyys; kiteisessä muodossa olevat aineet ovat yleensä kauniita, geometrisia partikkeleita, joilla on terävät reunat ja säännöllinen muoto. Myös atomit, ionit, molekyylit ja molekyyliryhmät ovat järjestäytyneet säännöllisiksi kolmiulotteisiksi rakenteiksi kiteisessä muodossa. Monet kiteistä ovat lisäksi läpinäkyviä ja kimaltavia ja niillä on kyky diffraktoida röntgensäteitä ja neutroneita. Kiteisen aineen vastakohta on amorfinen aine, jossa aineen rakenneyksiköillä ei ole tarkkaa järjestystä. Riippuen olosuhteista monet aineet voivat muodostaa sekä kiteistä että amorfista rakennetta. [17, s. 1—2.]

Useimmat alkuaineet ja niiden yhdisteet voivat muodostaa kiteitä. Tästä esimerkkinä voidaan mainita esimerkiksi suolakiteet, joita muodostuu suolasta ylikylläiseen liuokseen. Edellä kuvatun kaltaiset kiteet ovat pienimolekyyllisiä kiteitä, mutta myös biologiset makromolekyylliset kiteet, esimerkiksi proteiinien muodostamat kiteet, ovat mahdollisia. [17, s. 2; 7, s. 335.]

Kiteytymisen käynnistää nukleaatio, jossa kiteytysliuokseen alkaa muodostua ensimmäisiä järjestäytyneitä ryhmittymiä. Nukleaatio siis mahdollistaa ylikyllästystilassa olevien molekyylien kerääntymisen yhteen, jotta ne voivat muodostaa järjestäytyneitä rakenteita, kidealkioita. Seuraava vaihe on kiteiden kasvu, joka jatkuu niin kauan kun systeemissä vallitsee ylikylläinen, termodynaaminen epätasapaino. Sekä nukleaatio että kiteiden kasvu vaativat ylikylläisyystilan, mutta nukleaatio vaatii kiteiden kasvua suuremman ylikylläisyyden. Ylikylläisyyden kasvaessa myös kidealkioiden muodostuminen kiihtyy. Näin ollen nukleaation aikaansaaminen on yksi kiteytyksen hankalimmista haasteista ja sen toistuminen jatkokokeissa ei ole itsestäänselvyys. [17, s. 9—10; 18, s. 258—259.]

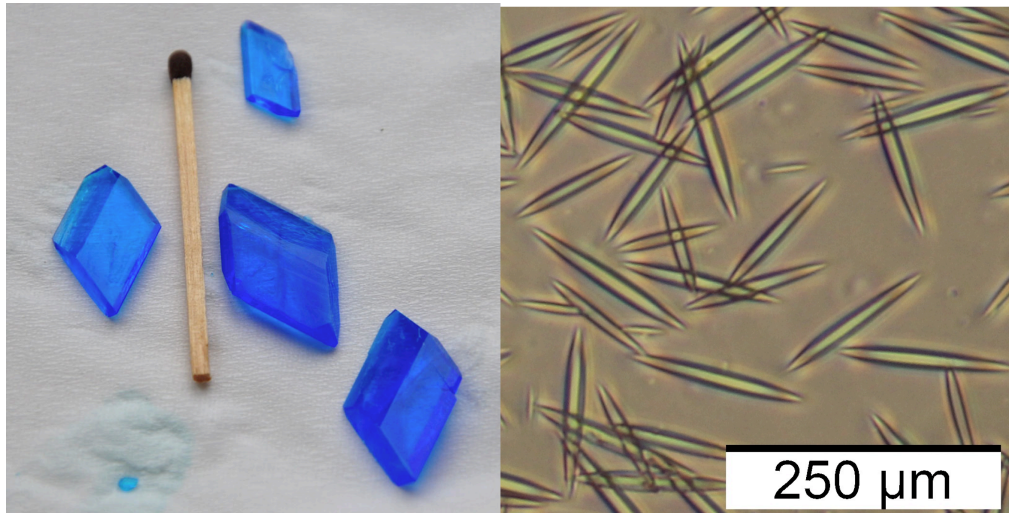
4.2 Entsyymien kiteytys

Kiteytystä on käytetty pitkään proteiinien, erityisesti entsyymien puhdistamisessa. Menetelmä on edullinen ja optimoituina tehokas tapa erottaa haluttuja entsyymejä liuoksesta. Kiteinen olomuoto on yleensä myös varsin stabiili, joten sitä voidaan käyttää parantamaan entsyymin säilyvyyttä varastoinnin aikana. Kiteytyksestä on hyötyä myös entsyymituotteen formuloinnissa; kite on proteiinin tiivistynein muoto, jolloin erittäin väkevien entsyymituotteiden formulointi on mahdollista. [7, s. 335; 19, s. 1; 20, s. 104—106.]

Kun kiteytysprosessi on optimoitu ensin pienemmässä mittakaavassa, on scale-up eli mittakaavan kasvattaminen yleensä helppoa. Proteiinien kiteytyksessä pätevät samat periaatteet kuin esimerkiksi suolan kiteytyksessä, mutta proteiinien monimutkaisen rakenteen vuoksi niiden kiteyttäminen ei ole yhtä yksinkertaista vaan esimerkiksi vaadittavat ylikyllästystilat ovat suurempia. Lisäksi kiteiden kasvu on hitaampaa. [7, s.335; 19, s. 1; 20, s. 104—106.]

4.3 Biologiset makromolekyyliset kiteet vs. pienimolekyyliset kiteet

Koko on yleensä yksi selkeimmistä eroista biologisten makromolekyylisten kiteiden ja pienimolekyylisten kiteiden välillä: proteiinikiteet ovat yleensä pieniä verrattuna suolaki-teisiin, jotka voivat kasvaa todella suuriinkin mittoihin. Esimerkiksi kuvan 2 siniset kuparisulfaattikiteet ovat jo sen kokoisia, että niitä voidaan tarkastella paljaalla silmällä. Vie-ressä on vertailun vuoksi mikroskooppikuva entsyymikiteistä mittakaavan kera. Proteiinikiteet saavuttavat harvoin yli 10 mm³:n tilavuuden ja niiden tarkasteluun tarvitaan usein mikroskooppi. [17, s. 3—4.]



Kuva 2. Kauniin sinistä kuparisulfaattia on mahdollista kiteyttää helposti paljain silmin nähtäviksi kiteiksi. Oikealla puolella näkyvät entsyymikiteet ovat huomattavasti pienempiä. [21]

Eroja on myös kiteiden mekaanisissa ominaisuuksissa: proteiinikiteet ovat hauraita niiden korkean liuotinpitoisuuden ja kidehilassa olevien heikkojen vuorovaikutusten takia ja lisäksi ne ovat herkkiä ulkoisille olosuhteille. Herkkyys ulkoisille olosuhteille näkyy erityisesti siinä, että proteiinikiteytymiseen vaikuttavat samanaikaisesti useat eri parametrit. Suolakiteet ovat useimmiten vahvoja ja kestävät paremmin mekaanista rasitusta ja ulkoisten olosuhteiden muutosta. Korkeasta liuotinpitoisuudesta johtuen proteiinikiteet tulisi säilyttää liuotin-tyllästeisessä ympäristössä, jotta vältetään kiteiden dehydraatiolta, jossa kiteisiin muodostuu halkeamia ja ne saattavat tuhoutua. [17, s. 3—4.]

4.4 Entsyymikiteytyksen parametreja

4.4.1 Puhtaus

Kiteytettävän makromolekyylisen liuoksen puhtaudella on suuri merkitys kiteytyksessä. Makromolekyylit eristetään usein monimutkaisista biologisista yhdisteistä, jotka saattavat häiritä kiteytymistä. Kiteytyminen on kuitenkin mahdollista myös puhdistamattomasta liuoksesta, mutta tällä on monesti vaikutusta kiteiden laatuun. Kiteet voivat olla tällöin pienempiä, epäsäännöllisemmän muotoisia ja saattavat muodostaa yhteen liittyneitä kidemassoja. Kiteen hyvällä laadulla on kuitenkin merkitystä lähinnä proteiinin molekyylirakennetta määrittävissä röntgenkristallografiakokeissa, ei niinkään teollisuuskäyt-

töön tarkoitettujen entsyymien kiteytysprosesseissa. Entsyymien kiteytyminen puhtaana epäpuhtauksia sisältävästä liuksesta edellyttää myös, että epäpuhtaudet eivät ole ylikyllästyneessä tilassa. [17, s. 8; 7, s. 336.]

Riittämätön puhtaus saattaa kuitenkin olla syy liuksessa olevan entsyymien kiteytymättömyyteen. Epäpuhtauksilla tarkoitetaan häiritsevien yhdisteiden, muiden proteiinien ja mikrobiologisten kontaminaatioiden lisäksi myös denaturoituneita entsyymejä tai entsyymejä, joilla on erilainen rakenne esimerkiksi aminohapposekvenssin suhteen. Parhaimmillaan kiteytystä voidaan kuitenkin käyttää edullisena puhdistusmenetelmänä joko suoraan kasvuliuksesta tai siitä tehdystä tiivisteestä, jos kyseisen entsyymien kiteytymiseen vaikuttavat parametrit tunnetaan ja hallitaan. [17, s. 8; 18, s. 263.]

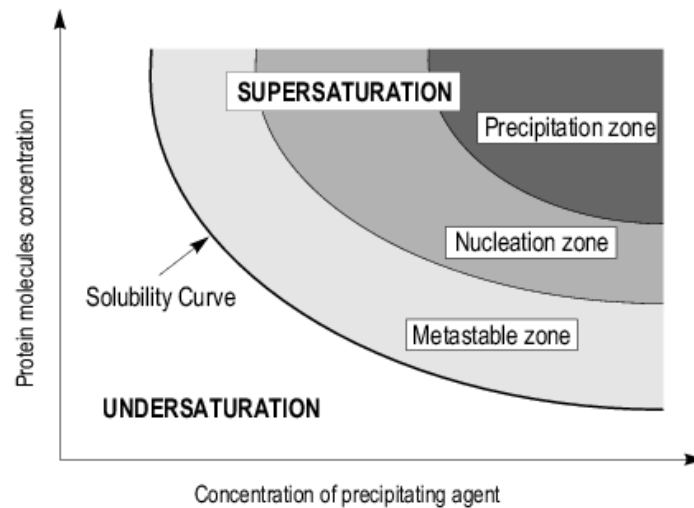
Teollisten entsyymien puhtausaste eroaa paljon esimerkiksi lääketieteelliseen käyttöön tarkoitettujen entsyymien puhtaudesta; teollisuudessa käytetyt entsyymit ovat harvoin kemiallisesti puhtaita tai vain yhtä proteiinia sisältäviä tuotteita. Koska entsyymien hinta määräytyy aktiivisuuden eikä esimerkiksi painon mukaan, halutaan mahdolliset aktiivisuutta häiritsevät epäpuhtaudet poistaa. Käyttökohteesta riippuen esimerkiksi elintarvikkeikäyttöön tarkoitetut entsyymit eivät saa myöskään sisältää toksisia yhdisteitä. [22, s. 427, 442—443.]

4.4.2 Liukoisuus ja ylikylläisyys

Jotta kiteytyminen olisi mahdollista, kiteytettävien molekyylien tulee olla ylikylläisessä, termodynaamisesti epätasapainoisessa tilassa. Kun systeemin tila palautuu tasapainoon, entsyymi saattaa muuntua kiteiseen tai amorfiseen muotoon. Ylikyllästystila on toteutettavissa esimerkiksi liuottimen hitaalla haihduttamisella tai höyrystämällä, entsyymiliuoksen ultrasuodattamisella proteiinipitoisuuden nostamiseksi tai lisäämällä liuokseen saostinta. Myös pH:n tai lämpötilan muuttaminen voi vaikuttaa. Ylikyllästystilan saavuttaminen tarpeeksi hitaasti on avainasemassa kiteiden muodostumiselle. [17, s. 9; 7, s. 336; 19, s. 14.]

Kuvassa 3 on esitetty faasidiagrammina proteiinin liukoisuutta saostimen konsentraation funktiona. Proteiinin liukoisuuskäyrä jakaa kuvan kahteen osaan: alikylläiseen ja ylikylläiseen. Ylikylläisellä alueella kiteiden muodostuminen ja kasvaminen on mahdollista kun taas alikylläisellä alueella kiteitä ei muodostu tai aikaisemmin saadut kiteet liukenevat. Ylikylläinen alue voidaan lisäksi jakaa kolmeen osaan riippuen ylikyllästy-

sen asteesta. Ylikylläisin alue on kaikkein epästabiilein, ja siellä proteiinit esiintyvät yleensä amorfisena sakkana. Myös geeliä tai neste-neste-erottumista saattaa esiintyä. Tämän jälkeen on labiili ylikylläisyyden alue, jossa tapahtuu sekä nukleaatiota että kiteiden kasvua. Viimeisenä tulee metastabiili alue, jossa vain kiteiden kasvu on mahdollista. Kiteytyminen jatkuu kunnes systeemi saavuttaa tasapainotilan, jossa proteiinin liukoisuus on pienimmillään vallitsevissa kemiallisissa ja fysikaalisissa olosuhteissa. [20, s. 108; 23.]



Kuva 3. Proteiinin liukoisuus esitettyä saostimen konsentraation funktiona. [23]

4.4.3 Saostimet

Saostimia voidaan käyttää apuaineina entsyymikiteytyksessä. Ideana on, että saostin vaikuttaa proteiini-liuotin- tai proteiini-proteiini-kontakteihin, minkä seurauksena proteiini saostuu erilleen kiteytysliuoksesta joko kiteiksi tai amorfiseksi sakaksi. Sopiva saostin löytyy yleensä vain kokeilemalla, yleisesti käytettyjä saostimia (kuten ammoniumsulfaatti tai PEG eli polyetyleeniglykoli) on listattu runsaasti alan kirjallisuudessa. [24, s. 41.]

Listauksen kärkipäähän on vakiintunut ryhmä saostimia, joita käytetään selkeästi eniten. Listauksen häntäpäässä taas on eksoottisempia saostimia, joiden käyttö on yleisellä tasolla vähäistä. Vähäinen käyttö ei kuitenkaan kerro saostimen tehottomuudesta. Proteiinien kiteytysoppaissa kehoitetaan kokeilemaan ennakkoluulottomasti myös harvinaisempia saostimia. Saostimen käyttö ei ole kuitenkaan aina tarpeen, esimerkiksi

kun kyse on höyrydiffuusiosta vettä tai matalaionivahvuista puskuria vasten. [24, s. 41, 46.]

Sopiva saostinkonsentraatio tulee testata yksilöllisesti kullekin kiteytettävälle proteiinille. Liikkeelle kannattaa kuitenkin lähteä oppaiden taulukoista, joissa kuvataan syntyneiden proteiinikiteiden määrää saostimen pitoisuuden funktiona. Esimerkiksi ammoniumsulfaattilla syntyvien kiteiden lukumäärä on suurempi 1,1–2,5 M:n pitoisuuksissa, kun taas MPD:llä eli heksyleeniglykolilla tarvitaan 50–60 %:n pitoisuus suurempaan kidesaantoon. Taulukot ovat kuitenkin vain suuntaa antavia, ja lopullinen optimaalinen saostinpitoisuus tulee selvittää kokeellisesti. [24, s. 42–44.]

Saostinaineet voidaan pääosin jakaa neljään kategoriaan:

1. suolat
2. orgaaniset liuottimet
3. polymeerit
4. pinta-aktiiviset aineet.

Ammoniumsulfaatti on saostinaineista käytetyin, myös polyetyleeniglykolia (PEG) molekyyllipainovälillä 4000–8000 käytetään usein. Saostimia voidaan käyttää yhdessä, esimerkiksi suoloja käytetään tavanomaisesti yhdessä PEG:n kanssa. [24, s. 42–44.]

4.4.4 Lämpötila

Lämpötila on tärkeä parametri, sillä proteiinien liukoisuus vaihtelee lämpötilan funktiona. Erityisesti matalissa ionivahvuuksissa joillakin proteiineilla lämpötilan vaikutus kiteytymiseen on suuri. Yleisimmät käytetyt kiteytyslämpötilat ovat joko +4 °C tai huoneenlämpö, kuitenkin kiteytyshavaintoja on raportoitu välillä 0–65 °C. [24, s. 65.]

Kiteytyslämpötilan ei tarvitse olla vakio, vaan se voi vaihdella kiteytysprosessin aikana. Tätä on käytetty esimerkiksi subtilisiini-entsyymin kiteytyksessä, kun vesipohjaiseen entsyymiliuokseen on lisätty natriumsulfaattia ja kiteytyksen on annettu tapahtua nousevassa lämpötilassa välillä 10–60 °C. Tuloksena oli suurempi kidesaanto, jossa kidemuotona oli matalan ja korkean lämpötilan kidemuotojen hybridejä. [19, s. 60; 25.]

4.4.5 pH ja puskurointi

Yksi merkittävimmistä yksittäisistä tekijöistä proteiinien liukoisuuteen on pH. Tämän takia on järkevää valita kiteytyskokeissa pH ensimmäisiin tutkittaviin parametreihin. Proteiinkiteytysoppaissa on taulukoituna proteiinkiteiden määriä pH:n funktiona. Taulukon mukaan pH 7,0 olisi optimaalisin useimmissa kiteytyskokeissa. Kiteyttämistä on raportoitu tapahtuvan pääosin pH-alueella 2—10, mutta 90 % tehdyistä kiteytyksistä tehdään pH-alueella 4—9. Viimeksi mainittu pH-alue onkin kiteytysoppaiden mukaan mainio liikkeelle lähdetessä. Aluksi tulisi tehdä karkea pH-optimin etsintä noin 1—1,5 yksikön välein, minkä jälkeen aluetta tarkennetaan vähitellen. [24, s. 53, 56.]

Puskuriliuosten avulla entsyymiliuoksen pH voidaan stabiloida halutulle tasolle; puskuroitujen näytteiden pH ei muutu helposti. Käytettävällä puskuriliuksella voi olla suuri vaikutus kiteen muotoon. Kun muut olosuhteet, kuten pH ja lämpötila, on saatu optimoitua, voidaan puskuriliuoksen vaihdolla mahdollisesti saada uudenmuotoisia kiteitä. Puskurien valinnassa täytyy kuitenkin käyttää harkintaa, sillä monet puskurit saattavat toimia inhibiittoreina kiteytettävälle entsyymille. Epäorgaaniset puskurit saattavat myös lisätä todennäköisyyttä suolakiteiden muodostumiselle. Lisäksi työturvallisuutta tulee pohtia valittaessa myrkyllisiä puskureita, esimerkiksi kakodylaattipuskurit. [24, s. 54—55.]

4.4.6 Siemennys

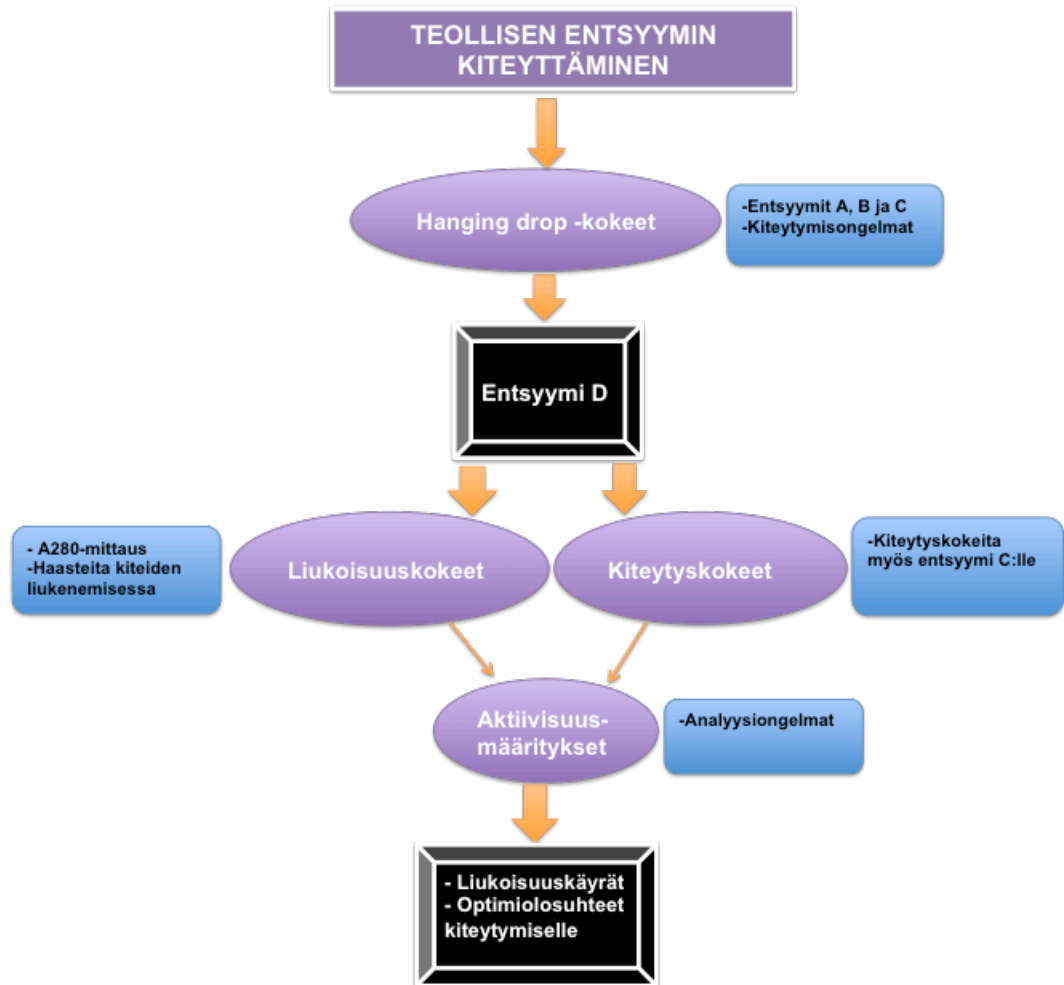
Kiteytystä voidaan usein nopeuttaa siementämällä kiteytettävää, ylikylläistä liuosta aikaisemmin tuotetuilla kiteillä. Siemenkide tarjoaa templaatin eli alustan, johon muut molekyylit voivat asettua ja oikeissa olosuhteissa siemenen kiinnittynyt molekyyliyhteenliittymä laajenee kiteeksi. Siemenkiteiden lisääminen alentaa kiteytymiseen tarvittavaa ylikyllästymistilaa. Siemenkiteitä pyritään yleensä hienontamaan siementämisen tehostamiseksi. Siementämällä aikaansaadun kiteen koko ei riipu siemenkiteen koosta, mutta kiteen muut ominaisuudet voivat riippua käytetystä siemenkiteestä. [24, s. 141—142]

5 Entsyymikiteytyksen optimoinnin kuvaus

5.1 Työn kulku ja rakenne

Käytännön osuutta varten oli laadittu valmis suunnitelma jo ennen insinööriyön aloittamista. Insinööriyössä ilmenneiden haasteiden vuoksi suunnitelmaa jouduttiin kuitenkin muokkaamaan työn edetessä. Yhden entsyymin sijasta kiteytysolosuhteiden optimointia tehtiin lopulta yhteensä neljälle entsyymille. Syynä tähän olivat ennalta-arvaamattomat entsyymin kiteytymiseen ja aktiivisuuden analysointiin liittyvät ongelmat, joita ei pystytty lopullisesti ratkaisemaan insinööriyölle varatun työajan puitteissa. Kuitenkin näiden ongelmien esilletulo oli sinällään jo yrityksen kannalta arvokas tieto.

Entsyymin vaihtaminen koettiin yrityksen näkökulmasta mielekkäämmäksi vaihtoehdoksi kuin kiteyttämisen yrittäminen keinolla millä hyvänsä; kiteyttämisen optimointia ei välttämättä olisi voitu viedä kovin pitkälle, vaan insinööriyöstä olisi tullut suhteellisen suppea. Työn kulkua on havainnollistettu kuvassa 4.



Kuva 4. Kaaviokuva työn etenemisestä.

Alkuperäisessä suunnitelmassa oli tarkoitus löytää optimaaliset kiteytysolosuhteet entsyymille A. Ensimmäiseksi entsyymien A kiteytyvyyttä lähdettiin tutkimaan hanging drop -menetelmällä. Kun kiteytymistä ei tapahtunut, otettiin hanging drop -kokeisiin mukaan ensin entsyymi B ja lopulta myös entsyymi C. Kiteytymisongelmien jatkuessa aloitettiin suuremman mittakaavan panoskiteytyskokeet entsyymille D, josta oli jo aikaisempia kiteytymishavaintoja.

Kiteytyskokeiden tarkoituksena oli selvittää pH:n, lämpötilan ja saostimen vaikutusta kiteytymiseen sekä kerätä kidemassaa liukoisuuskokeita varten. Myös entsyymi C:n kiteytymistä testattiin muutama otteeseen kiteytyskokeissa. Liukoisuuskokeiden avulla voitiin tutkia pH:n, lämpötilan ja saostimen vaikutusta kiteiden liukoisuuteen. Kiteytys- ja liukoisuuskokeiden näytteistä analysoitiin entsyymiaktiivisuus aktiivisuusanalyysillä tai suhteellisen proteiinin osuus A280-mittauksella. Näiden tulosten avulla voitiin

piirtää entsyymi D:lle liukoisuuskäyriä, joiden avulla voitiin tarkastella suurelle kidesaannolle otollisia olosuhteita.

5.2 Työturvallisuus

Työstettävät entsyymimateriaalit olivat soluvapaita suodoksia, joissa suurimman työturvallisuusriskin aiheuttivat entsyymit. Entsyymit voivat aiheuttaa herkistymisiä niille altistuneille, ja herkistymiset voivat näkyä esimerkiksi allergiana, astmana, ihottumana tai nuhana. Erityisen haitallisia ovat pölyävät jauhemaiset entsyymit, jollaisia ei tämän työn kokeellisessa osassa käytetty. [26, 27.]

Osassa työvaiheita oli mukana entsyymiliuosten säilöntäaineena käytettävää Proxel LV-liuosta. Se on teollisuudessa yleisesti käytetty biosidi, joka estää bakteerien, homeiden ja sienien kasvua ja jota käytetään pääsääntöisesti vesipohjaisissa tuotteissa. Kyseessä on myrkyllinen/ympäristölle haitallinen aine ja varsinkin laimentamatonta liuosta tulee käsitellä erityisellä huolellisuudella. [28, 27.]

Insinööriyötä tehdessä noudatettiin yrityksen tiukkoja työturvallisuuskäytäntöjä, kuten entsyymiä sisältävien liuosten käsittely vetokaapissa tai kohdepoiston alla mahdollisen aerosolialtistuksen välttämiseksi. Laboratorioissa oli myös tehokas ilmanvaihto ja ilmanlaatua tarkkailtiin säännöllisesti. Mikroskopointinäytteissä entsyymi eristettiin rasvakammion sisälle, jotta voitiin estää mahdollinen entsyymialtistus. Lisäksi entsyymejä käsiteltäessä käytettiin aina tilanteen vaatimia muita suojaimia kuten käsineitä, hihasuojia, laboratoriotakkia ja suojalaseja. [27]

5.3 Entsyymit A, B, C ja D

Ensimmäisenä tutkittavana materiaalina oli entsyymi A, joka oli esikäsitelty, soluvapaa suodos, johon oli lisätty säilöntäaineeksi 0,2 % Proxel LV -liuosta. Materiaalin kanssa aloitettiin kiteytyskokeet hanging drop -menetelmällä ja näytteenä käytettiin entsyymiliuoksen 2,5- ja 5-kertaisia konsentraatteja.

Entsyymi B oli konsentroimaton ja esikäsitelty, soluvapaa suodos, johon oli lisätty säilöntäaineeksi 0,35 % natriumbentsoaattia ja joka otettiin mukaan hanging drop -kokeisiin.

Entsyymi C oli esikäsitelty, soluvapaa suodos, johon oli lisätty säilöntäaineeksi 0,35 % natriumbentsoaattia. Entsyymiliuokselle tehtiin hanging drop- ja panoskiteytyskokeita. Näytteenä käytettiin 3,5-kertaista konsentraattia. Kyseessä on sama entsyymi kuin Entsyymi D, mutta tämä oli tuotettu kannalla 1.

Entsyymi D oli esikäsitelty, soluvapaa suodos, johon oli lisätty säilöntäaineeksi 0,2 % Proxel LV-liuosta. Entsyymiliuosta kiteytettiin panoskokeissa sekä konsentroimattomana että 3-kertaisena konsentraattina. Kyseessä on sama entsyymi kuin Entsyymi C, mutta tämä oli tuotettu kannalla 2.

5.4 Menetelmät

5.4.1 Hanging drop -menetelmä

Hanging drop -menetelmä on höyryn diffuusioon perustuva menetelmä. Siinä pieni pisara (2–10 mikrolitraa) proteiiniliuosta sekoitetaan peitinlasille yhtä suureen määrään kiteytysliuosta, joka voi koostua esimerkiksi puskurista, suolasta tai muusta saostimesta. Peitinlasi käännetään ylösalaisin ja suljetaan tiiviisti kiteytysnestettä (500–1000 mikrolitraa) sisältävän kaivon päälle. Kaivon ja peitinlasilla olevan pisaran eli dropin välillä on konsentraatioero, joka ajaa systeemin kohti tasapainotilaa höyryfaasin diffuusion avulla. Ideaalitulanteessa proteiini ylikyllästyy ja kiteitä alkaa muodostua, kun droppi ja kaivo ovat tasapainotilassa tai lähellä sitä. Menetelmässä kiteytyskaivoina voidaan käyttää yleisesti soluviljelyssä käytettäviä ns. 24-kuoppalevyjä. [24, s. 7; 7, s. 341.]

Tasapainotilan saavuttaminen riippuu mm. käytetystä kiteytysliuoksesta; suolaliuokset voivat tasapainottua muutamassa päivässä, kun taas polyetyleeniglykolia sisältävät liuokset voivat vaatia jopa 3–4 viikkoa tasapainotilan muodostumiseen. Höyrydiffuusio on herkkä lämpötilan vaihteluille, joten kokeita tehdessä pitää välttää lämpötilaeroja peitinlasin ja säiliöliuoksen välillä. Tämä tarkoittaa sitä, että kaivoja mikroskopoidessa tulee olla nopea sekä välttää lämpökaapin turhaa avaamista tai sijoittaa kuoppalevy

niin, että se ei altistu lämpötilanvaihteluille. Lisäksi kaivojen huolellinen sinetöinti esimerkiksi laboratoriorasvalla on tärkeää höyrydiffuusion kannalta. [24, s. 7, 10, 12.]

Rakennetutkimukseen keskittyvässä kirjallisuudessa dropin muoto on keskeisessä osassa, sillä se vaikuttaa kidealkioiden määrään ja sitä kautta kidekokoon. Tällöin pyöreä droppi olisi paras nukleaation kannalta, mikä aikaansaadaan helposti orgaanisten liuottimien tai detergenttien avulla. [24, s. 10.]

5.4.2 A280-mittaus

A280-mittaus on yleisesti käytössä oleva menetelmä, jolla voidaan mitata näytteen proteiinipitoisuutta. Menetelmä perustuu fenyylialaniinia, tryptofaania, histidiiniä ja tyrosiiniä sisältävien proteiinimolekyylien kykyyn absorboida UV-valoa aallonpituudella 280 nm. Kyseessä on erittäin nopea menetelmä proteiinipitoisuuden määrittämiseen, mutta sen tarkkuus kärsii muista näytteessä olevista molekyyleistä, jotka absorboivat UV-säteilyä samalla aallonpituudella. Lisäksi määritetty lopullinen pitoisuus on vain karkea arvio, koska eri proteiineilla on erilainen aminohappokoostumus. Kun halutaan piirtää suuntaa-antavia liukoisuuskäyriä, voidaan mahdollista mittausvirhettä pienentää käyttämällä näytteinä puhtaita proteiiniliuoksia ja määrittämällä samanaikaisesti sekä liukoista että kokonaisproteiinipitoisuutta, jolloin proteiinin liukoisuustulos voidaan ilmoittaa suhteellisena prosenttiosuutena [3, s. 182; 29; 7, s. 46.]

Mittauksessa näytteen absorbanssi mitataan aallonpituudella 280 nm. Saatu absorbanssi kerrotaan näytteen laimennoskertomella jolloin lukemasta voidaan laskea proteiinin määrä näytteessä. Näytteen tulisi olla laimennettu niin, että sen absorbanssi jää välille 0,1–1,0. Tällä välillä menetelmä toimii parhaiten. Proteiinimäärä saadaan selville käyttämällä Lambert-Beerin lakiin perustuvaa oletusta, että puhtaan proteiiniliuoksen (pitoisuus 1 mg/ml) absorbanssi aallonpituudella 280 nm on noin 1,0. [3, s. 182; 29; 7, s. 46.]

5.4.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE eli natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidi-geelielektroforeesi on yleisesti käytetty analyysi- ja erottelumenetelmä proteiinikemiassa. Menetelmän avulla proteiineja voidaan erotella niiden elektroforeettisen liikkuvuuden mukaan. [30; 3, s. 179.]

Menetelmässä proteiinia sisältävä näyte käsitellään SDS:llä (natriumdodekyylisulfaattilla), joka toimii anionisena detergenttinä. Tämän seurauksena proteiinin sekundaari- ja tertiäärirakenteet tuhoutuvat ja ne saavat negatiivisen varauksen, joka on suhteessa proteiinin molekyylipainoon. Lisäksi proteiininäytteitä kuumennetaan pelkistimen kanssa, jolloin myös proteiinin kvaternäärirakenne saadaan tehokkaasti hajoamaan. Proteiininäytteet voidaan värjätä, jotta elektroforeesin etenemistä voidaan seurata. [30; 3, s. 179.]

Käsitellyt, laimennetut näytteet ladataan geelielektroforeesiin tarkoitetulle polyakryyliamidigeelille, joka on asennettuna elektroforeesilaitteeseen sopivan puskurin kanssa. Geeliin ladataan myös ns. standardinäyte eli ladder, joka sisältää tunnetun kokoisia proteiinimolekyylejä. Geeliin johdetaan sähkövirtaa, jolloin negatiivisesti varautuneet proteiinimolekyylit lähtevät kulkeutumaan geelin toiseen päähän kokonsa mukaisesti; suuremmat proteiinimolekyylit kulkeutuvat geelillä hitaammin kuin pienemmät. Kun ensimmäiset proteiinimolekyylit ovat kulkeutuneet geelin toiseen päähän, ajo lopetetaan ja geeli värjätään sekä kuivataan. [30, 3, s. 179.]

Geeliltä voidaan tarkastella proteiinimolekyylien muodostamia viivoja eli bändejä vertaamalla niitä rinnalla ajettuun standardiin. Proteiinien karkea koko voidaan arvioida tunnettujen standardin bändien avulla. Tässä insinööriyössä käytettiin SDS-PAGE:a varten Bioradin valmisgeeliä ja reagensseja. [30, 3, s. 179.]

5.4.4 Entsyymien aktiivisuusanalyysi

Aktiivisuusanalyysillä voidaan määrittää kunkin näytteen entsyymien aktiivisuus (pitoisuus). Tässä työssä käytetyissä analyyseissä näytteen sisältämä entsyymi hajottaa sille spesifistä substraattia pelkistäviksi yhdisteiksi, jotka voidaan määrittää spektrofotometrisesti. Kun tiedetään substraatin ja syntyneiden pelkistävien yhdisteiden määrä sekä reaktioaika, voidaan näytteen sisältämälle entsyymille laskea aktiivisuus. Entsyymien aktiivisuusanalyysiin käytettiin yrityksen valmista työohjetta, jonka mukaan analyysi suoritettiin.

Entsyymiaktiivisuutta seuraamalla voidaan varmistaa, että liuoksesta kiteytetty aines on entsyymiä itseään. Lisäksi voidaan tarkkailla, miten olosuhteiden muutos (pH, lämpötila) vaikuttaa entsyymien aktiivisuuteen. Entsyymikiteiden liukoisuutta tutkittaessa aktii-

visuusanalyysiä käytettiin laskettaessa liukoisen proteiinin suhteellista osuutta eri olosuhteiden funktiona. [7, s. 44.]

5.4.5 Ultrasuodatus

Ultrasuodatuksen avulla voidaan erottaa liuksen sisältämiä komponentteja toisistaan ajamalla liuosta paineen avulla puoliläpäisevän kalvon läpi. Kalvojen huokoskoot vaihtelevat käyttötarkoituksesta riippuen, ts. minkä kokoisia komponentteja liuksesta halutaan suodattaa. [31, s. 1; 7, s. 15.]

Suodatuksessa tarvitaan painetta kuljettamaan liuos kalvoa vasten, jolloin riittävän pienet komponentit pystyvät kulkemaan kalvon huokosten läpi. Kalvon läpäisyyttä suodosta kutsutaan permeaatiksi ja ultrasuodatuslaitteistoon jäävää liuosvirtaa taas retentatiksi tai konsentraatiksi. Liuosta kierrätetään kalvon yli useita kertoja, jotta permeaattia saadaan menemään kalvon läpi mahdollisimman tehokkaasti ja halutun proteiinin pitoisuus riittävän suureksi. [31, s. 1; 7, s. 267.]

Ultrasuodatusta käytettiin tässä insinööriyössä nimenomaan konsentroimaan proteiiniliuosta. Käytössä oli VivaFlow 200 -laitteisto, johon kuuluu puoliläpäisevän kalvon sisältävä kasetti, painemittari ja liuksen kierrättämiseen tarvittavat letkut. Liuoksen pumppaamiseen käytettiin letkupumppua. Suodatuksen nopeuttamiseksi kasetteja oli käytössä kaksi rinnakkain kytkettynä.

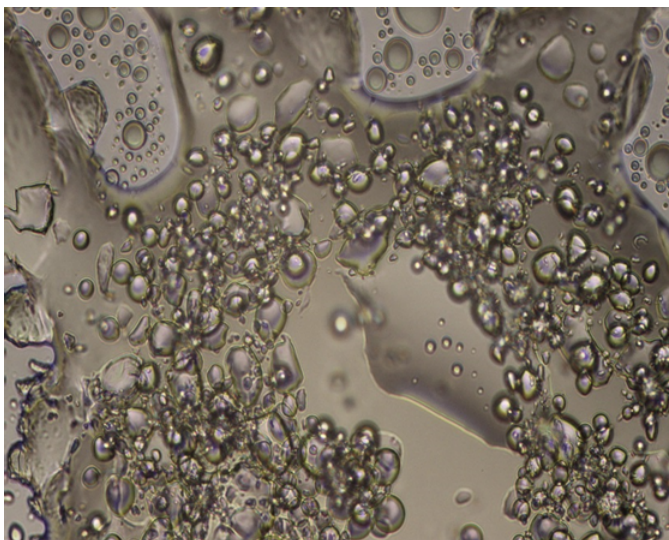
6 Hanging drop -kokeet

Entsyymien A kiteytyvyyttä testattiin eri suoloilla ja puskureilla eri pitoisuuksissa +8 °C:ssa. Kokeisiin käytettiin 24 kaivon kuoppalevyjä eli ”kiteytysbokseja”, jolloin yhteen boksiin saatiin 24 erilaista koeasetelmaa. Boksit mikroskoipoitiin sekä heti valmistamisen jälkeen että muutaman päivän välein. Valmistusvaiheessa seurattiin myös paljaalla silmällä havaittavia muutoksia, esim. droppien samentumista. Mikroskoopilla tarkasteltiin dropin muutoksia tarkemmin: mahdollista kiteiden muodostumista ja kiteiden muotoa, amorfista sakkaa, geeliä ja geelipartikkeleiden muotoa sekä neste-nesteerottumista. Kuvissa 5—7 on esitetty erilaisia mikroskopointikuvia dropeista.



Kuva 5. Mikroskooppikuva entsyymien A erästä dropista 25 päivän jälkeen. Nähtävissä muutamia neulamaisia kiteitä ja neste-neste-erottumista, joka näkyy kuvassa pyöreän muotoisina pisaroina.

Kiteytysboksien seuranta-aika oli noin 20—30 vuorokautta, sillä tässä ajassa tasapainotilan pitäisi olla saavutettuna. Tämän jälkeen bokseja saatettiin säilyttää joitakin päiviä poikkeavassa lämpötilassa, jotta nähtiin mahdolliset lämpötilan aiheuttamat muutokset. Tällä kertaa merkittäviä muutoksia ei kuitenkaan havaittu lämpötilan vaihdon yhteydessä.



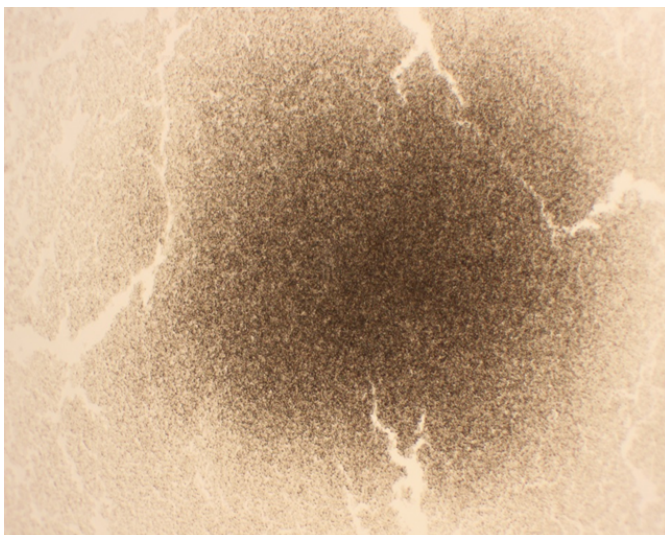
Kuva 6. Mikroskooppikuva entsyymien B erästä dropista 15 päivän jälkeen. Kuvassa näkyy runsaasti neste-neste-erottumista ja ehkä hieman geelimäistä olomuotoa. Pyöreän muotoiset pisarat ovat neste-neste-erottumista ja epäsäännöllisen muotoiset osiot taas viittaavat kyseessä olevan geeliä.

Tärkeimmät kiteytysbokseissa käytetyt reagenssit on listattu taulukossa 1. Testattavia reagensseja pipetoitiin kiteytyskaivoihin eri pitoisuuksina ja eri pH-alueilla optimaalisen yhdistelmän selvittämiseksi. Lisäksi kokeiltiin myös kaupallista valmisreagenssia (Tacsimate, Hampton Research). Kiteytysbokseja valmistettiin yhteensä 21 kappaletta.

Taulukko 1. Kiteytysboksien valmistuksessa käytettyjä reagensseja.

Käytettyjä reagensseja:
Ammoniumkloridi
Ammoniumsukkinaatti
Ammoniumsulfaatti
Etanoli
Glyseroli
Heksyleeniglykoli
Kalsiumasetaatipuskuri
Kalsiumkloridi
Natriumasetaatipuskurit
Natriumformiaattipuskuri
Natrium-kaliumfosfaattipuskuri
Natriumkloridi
Natriumsulfaatti
Polyetyleeniglykoli
Sinkkikloridi
Sukkiinihappo
Tacsimate (Hampton Research)
Tris-HCl-puskurit

Entsyymi A ei lähtenyt kiteytymään kunnolla missään testatuista olosuhteista, mikä oli poikkeavaa ennen insinöörityön aloittamista tehtyihin havaintoihin verrattuna. Droppeihin saatiin monesti näkyviin vain neste-neste-erottumisia tai amorfista sakkaa, joskus droppeihin ei ilmestynyt mitään. Dropin sisältämää amorfista sakkaa on nähtävissä kuvassa 7. Koska entsyymiä A ei saatu kiteytymään, niin sen rinnalle kokeisiin otettiin mukaan myös entsyymi B, josta ei ollut aikaisempia kiteytyshavaintoja, eikä sitä myöskään tämän työn aikana saatu kiteytymään.



Kuva 7. Mikroskooppikuva Entsyymi A:n eräästä dropista 3 päivän jälkeen. Droppiin oli muodostunut amorfista sakkaa.

Edellä mainittujen epäonnistumisten johdosta päätettiin ottaa kokeiluun entsyymi C, josta Roalilla oli myös tehty kiteytymishavaintoja aikaisemmin tehdyissä kokeissa. Entsyymi C ei kuitenkaan kiteytynyt lainkaan. Syy löytyi lopulta tuotantokantojen eroista: kiteytysbokseissa käytetty Entsyymi C oli tuotettu kannalla 1, kun taas aikaisemmissa kokeissa tehdyt kiteytymishavainnot oli tehty Entsyymillä D, joka oli tuotettu kannalla 2. Todettiin, että kannalla 1 tuotettu Entsyymi C ei käyttäydy samalla tavalla kuin Entsyymi D, vaikka kyseessä on sama entsyymi. Entsyymiliuoksen koostumus voi olla hyvin erilainen eri kannoilla tuotettuna, mikä saattaa vaikuttaa olennaisesti entsyymin kiteytymisominaisuuksiin. Syyn tarkempi selvittäminen vaatisi lisätutkimuksia, mutta alan kirjallisuudessa kiteytymiseen ja liukoisuuteen vaikuttavina tekijöinä on mainittu esimerkiksi entsyymiliuosten väliset erot ja jopa eräkohtaiset erot [17, s. 7].

Entsyymien A:n, B:n ja C:n hanging drop -kokeissa nähdyt kidemäärät olivat niin pieniä, ettei niiden jatkotyöstäminen tai testaaminen isommassa mittakaavassa olisi ollut mielekäästä. Sitkeällä yrittämisellä parempien kiteytysolosuhteiden löytäminen olisi voinut olla mahdollista, mutta työlle varattu aika asetti rajoituksia. Jatkamalla hanging drop -kokeiden parissa kiteytyksen optimointia ei todennäköisesti voitaisi viedä kovin pitkälle.

Kiteytysboksien mikroskopiointi ja tulosten kirjaaminen oli työlästä; jokainen droppi mikroskopiointiin ja erilliseen lomakkeeseen kirjattiin siitä tehdyt havainnot. Liitteessä 1 on esimerkkinä entsyymin A yhden boksen mikroskopiointimerkinnät. Kyseistä boksia seu-

rattiin yhteensä 41 päivää ja jokainen boksen 24 dropista mikroskojettiin seitsemään kertaan tuona aikana. Kiinnostavimmat dropit myös valokuvattiin. Hanging drop -kokeisiin kului paljon aikaa ja kun tulokset eivät näyttäneet lupaavilta, päätettiin siirtyä suoraan hieman suurempiin, laboratoriomittakaavan panoskokeisiin Entsyymi D:n kanssa ajan säästämiseksi. Näin ollen erilaisten saostimien ja kiteytysolosuhteiden systemaattiseen etsimiseen ei ollut enää samanlaista mahdollisuutta kuin hanging drop -kokeilla, vaan lähtökohtana jouduttiin käyttämään olosuhteita, joissa entsyymien oltiin havaittu spontaanisti kiteytyvän.

7 Kiteytys- ja liukoisuuskokeet

7.1 Kiteytyskoe 1, kidehapon kerääminen

Tarkoituksena oli aloittaa suuremman mittakaavan kiteytyskokeet kannalla 2 tuotetulla Entsyymi D:llä. Aikaisempien havaintojen mukaan Entsyymi D kiteytyy tarpeeksi korkeassa lämpötilassa itsestään ilman apuaineita.

Entsyymi D:n 3-kertaista konsentraattia kiteytettiin +37 °C:ssa. Kahden päivän kuluttua kiteitä voitiin havaita mikroskoopilla. Lupaavan alun jälkeen kiteytystä jatkettiin +40 °C:ssa, sillä sen huomattiin nopeuttavan kiteytymistä. Kokonaiskiteytysaika oli 6 vuorokautta; kiteitä tarkasteltiin mikroskoopilla viiden ja kuuden päivän kohdalla. Eroina huomattiin kiteiden lukumäärän lisääntyminen ja kidekoon kasvu.

7.1.1 Kiteiden värjäys

Kiteitä värjättiin proteiineille tarkoitettulla valmisvärillä (Izit, Hampton Research), mutta lopputulos ei ollut kovin selkeä. Värjäyksen periaatteena on, että proteiinikiteet ovat huokoisempia kuin suolakiteet, jolloin väri pääsee imeytymään proteiinikiteisiin ja värjää ne kirkkaan sinisiksi. Suolakiteiden ei siis pitäisi värjäytyä. Aluksi väri ei ollut imeytynyt selkeästi kiteisiin, mutta seuraavana päivänä osa kiteistä oli värjäytynyt. Värjäystulosta ei voida pitää kovinkaan luotettavana enää vuorokauden jälkeen, mutta kiteiden värjäytymättä jääminen ei myöskään tarkoita kiteiden olevan jotain muuta kuin proteiinia: aikaisempien tutkimusten yhteydessä oli havaittu, että proteiinikiteiden värjäytymättä jääminen oli melko yleistä.

Värjäystulos jäi siis epäselväksi, mutta liukoisuuskokeen 1 yhteydessä tehdyn SDS-PAGE:n ja aktiivisuusanalyysin avulla selvitettiin, olivatko kiteet proteiinia vai jotain muuta ainetta. Värjäysnäyte oli säilynyt preparaattilla hyväkuntoisena eivätkä kiteet olleet lähteneet liukenemaan alhaisemmassa lämpötilassa. Tästä voitiin todeta, ettei kiteytyminen mahdollisesti ollut niin herkkä lämpötilan vaihteluille kuin aikaisemmin luultiin.

7.1.2 Kiteiden pesu

Kiteytettyä massaa pestiin liukoisuuskokeita varten 0,2-prosenttisella Proxel LV -liuksella ja pesun yhteydessä havaittiin, etteivät kiteet lienneet helposti. Tämä oli selkeä etu pesuvaiheessa, sillä pesu voitiin toistaa ilman merkittäviä kideastian menetysnäköisiä.

Emäliuokset kerättiin talteen lämpökokeita varten, joiden avulla voitiin tutkia, paljonko entsyymiä oli vielä liukoisessa muodossa kiteyttämällä emäliuosta edelleen huoneenlämpöä korkeammassa lämpötilassa. Emäliuoksesta analysoitiin myöhemmin myös entsyymiaktiivisuus ja siitä ajettiin SDS-PAGE.

7.2 Liukoisuuskoe 1, pH:n vaikutus

Liukoisuuskokeen tarkoituksena oli tutkia pestyjen kiteiden liukoisuutta 0,2-prosenttisella Proxel-liuksessa pH:n funktiona +37 °C:ssa. Pesujen jälkeen kidesuspensio laimennettiin 0,2-prosenttisellä Proxel LV -liuksella, jotta materiaalia olisi tarpeeksi. Kidesuspensio jaettiin kahteen koeputkeen, joiden pH säädettiin arvoihin 6,28 (putki A) ja 3,16 (putki B) 1M NaOH:lla ja 1M HCl:llä. Näistä putkista tehtiin seoksia, joihin sekoitettiin putkien A ja B kidesuspensioita eri suhteissa ja joiden pH mitattiin taulukon 2 mukaisesti. Tämän kokeen kidesuspensioita säilytettiin tasapainotilan saavuttamiseksi +37 °C:ssa 3 vuorokautta.

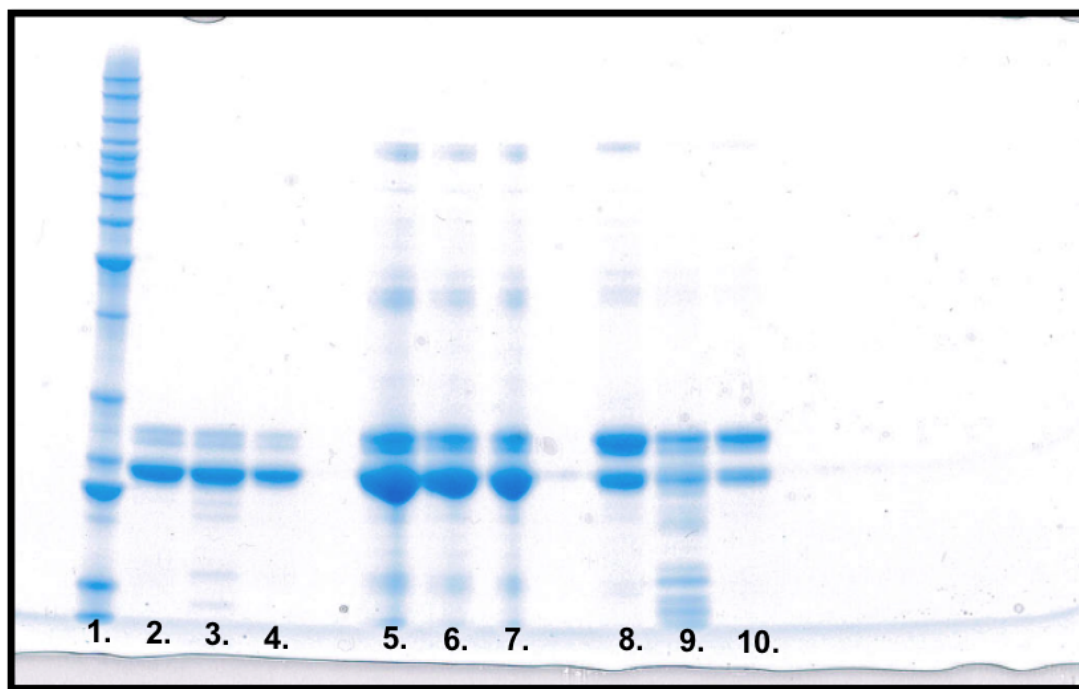
Taulukko 2. Liukoisuuskoe 1:n kokeet.

Koe	Putki A (µl)	Putki B (µl)	Mitattu pH
1	150	900	3,35
2	300	750	3,53
3	450	600	3,89
4	600	300	4,97
5	1000	0	6,42

3 vuorokauden jälkeen kidesuspensioista otettiin näytteet sekä kokonaisnäytteet että liukoiset näytteet entsyymin pitoisuuden määrittämistä varten. Kokonaisnäyte sisältää edustavasti sekä liukoista että kiteistä entsyymiä, kun taas liukoisessa näytteessä on vain liukoinen osa. Näytteet laitettiin kylmään odottamaan jatkomittauksia ja analyysia.

7.2.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE:a varten otettiin liukoisuuskoe 1:n näytteistä yksi kidemassanäyte analysoitavaksi. Määritykseen otettiin lisäksi emäliusnäyte ja lähtönäyte eli aikaisemmin pakastettu entsyymi D:n kolminkertainen konsentraatti. Kaikista näytteistä ajettiin kolme eri laimennosta, jotta voitiin varmistaa ainakin yhden laimennoksen ajautuminen siististi. Esimerkiksi liian väkevän näytteen bändeistä tulee pulleita, jolloin niitä on vaikeampi tulkita ja toisaalta liian laimeat näytteet näkyvät huonosti. Kuvassa 8 on kuva skannatusta SDS-PAGE-geelistä näyttenumeroineen.



Kuva 8. Skannattu SDS-PAGE-geeli.

Geelillä on 10 näytettä jotka ovat numerjärjestyksessä:

1. Ladder
2. Kidemassa, laimennos 1
3. Kidemassa, laimennos 2
4. Kidemassa, laimennos 3
5. Emäliuos, laimennos 1
6. Emäliuos, laimennos 2
7. Emäliuos, laimennos 3
8. Lähtönäyte, laimennos 1
9. Lähtönäyte, laimennos 2
10. Lähtönäyte, laimennos 3

Entsyymimolekyylien koko oli tiedossa. Näin ajeltua geeliltä nähtiin alustavasti, että näytteissä oli haluttua entsyymiä. Kidemassan näytteissä bändejä oli vähemmän, mikä osoittaa näytteen puhdistuneen emäliuokseen tai lähtönäytteeseen verrattuna; kide-

massa oli pestyä, kun taas emäliuos ja lähtönäyte sisälsivät epäpuhtautena myös muita proteiineja, jotka näkyvät geelillä.

7.2.2 A280-mittaus

Aikaisemmin otetut kokonais- ja liukoisuusnäytteet laimennettiin A280-mittauksia varten vedellä. Liukoisuusnäytteiden tulokset olivat melko loogisia, mutta kokonaisnäytteiden tulokset olivat satunnaisen näköisiä. Syyksi paljastui se, että kiteet eivät lienneet veteen, minkä takia näin saadut tulokset olivat vääriä. Jotta mittaukset saataisiin tehtyä ja jotta tulokset olisivat luotettavia, näytteiden tulisi olla täysin kirkkaita ja kiteiden tulisi liueta laimennosliuokseen.

7.2.3 Kiteiden liuotus

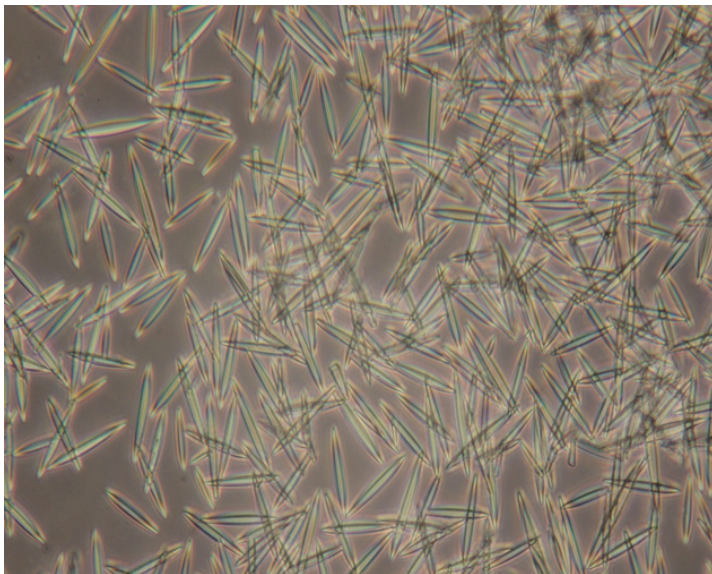
Kiteiden liuotusta kokeiltiin glyseroliin, natriumhydroksidiin, suolahappoon, sitraattipuskureihin ja natriumkloridiin eri pitoisuuksissa. Näistä vain suolahappo lähti liuottamaan kiteitä ja silloinkin vasta pitoisuudessa 100 mM. Myös hieman pienemmät pitoisuudet liuottivat kiteet pidemmän ajan kuluessa, mutta ajan säästämiseksi päädyttiin vahvempaan suolahappopitoisuuteen. Todettiin, että kiteet liukenivat erittäin huonosti ja tulevissa A280-mittauksissa tulisi käyttää 100 mM HCl:ää kiteiden liuottamiseksi. Liukoisuuskoe 1:n A280-mittauksia kokeiltiin uudelleen liukoisuuskoe 2:n mittauksien yhteydessä.

7.3 Kiteytyskoe 2, kiteytyslämpötilan nostaminen

3-kertaista entsyymikonsentraattia laitettiin kiteytymään +40 °C:seen, koska se oli aikaisemmassa kiteytyskokeessa havaittu toimivaksi. Samalla kiteytyskokeesta 1 otetun emäliuoksen kiteytyvyyttä testattiin aiempaa korkeammassa lämpötilassa säilyttämällä sitä edelleen +45 °C:ssa viikonlopun ajan. Ajatuksena oli tarkkailla, lähteekö emäliuos vielä kiteytymään ja miten korkeampi lämpötila vaikuttaa kiteytykseen.

3 päivää +40 °C:ssa säilytetty konsentraatti ei ollut vielä muodostanut näkyvää sakkaa tai kidettä eikä se ollut samentunut. Näin ollen vaikutti siltä, ettei kiteytyminen lähtenyt yhtä hyvin käyntiin +40 °C:ssa kuin +37 °C:ssa (vrt. kiteytyskoe 1). Kiteytyskokeesta 1 otettuun emäliuokseen oli muodostunut sakkaa, joka ei kuitenkaan ollut yhtä hienoja-

koista kuin aikaisemmin havaitut kidemassat. Sakka vahvistettiin neulamaisiksi kiteiksi mikroskopoimalla (Kuva 9), mikä viittaa siihen, että kiteytyminen kuitenkin etenee tässä lämpötilassa kunhan se on ensin saatu alkamaan. Vaikutti siltä, että lämpötilaa nostamalla kiteiden määrää saatiin kasvatettua.



Kuva 9. Mikroskooppikuva emäliuoksesta. Emäliuos oli jatkanut kiteytymistä ja liuokseen oli ilmestynyt runsaasti neulamaisia kiteitä. Emäliuosta oli säilytetty 3 päivää +45 °C:ssa.

Emäliuoksen kiteytystä jatkettiin +50 °C:ssa, johon laitettiin vanhan näytteen lisäksi uusi putki kylmässä säilytettyä emäliuosta. Päivän säilytyksen jälkeen +50 °C:ssa putkissa huomattiin silmämääräisen arvioinnin perusteella vaalean sakan lisäksi tummempaa sakkaa. Mikroskopoimalla selvitettiin, että väristään huolimatta sakka sisälsi vain kidettä, eikä esimerkiksi amorfista sakkaa. Ilmeisesti lämpötilan kasvaessa liukoisuus pienenee, koska kiteiden määrä ja koko oli kasvanut; lisäksi paljon uutta nukleaatiota oli havaittavissa.

Koska emäliuos kesti lämpökäsittelyn ja jatkoi kiteytymistä, jatkettiin kuumentamista +55 °C:ssa ja kahden vanhan putken lisäksi kuumennukseen laitettiin myös uusi emäliuosnäyte.

Konsentraatti oli lähtenyt kiteytymään varsin hitaasti +40 °C:ssa. Onnistuneiden emäliuos-lämpökokeilujen jälkeen konsentraatti päätettiin laittaa yöksi +50 °C:seen. Tämä

nähtävästi nopeutti kiteytymistä, mutta kiteet olivat tarttuneet säilytysastian seinämiin ja pohjaan. Syytä tähän ei keksitty, sillä esimerkiksi pH oli normaalilla tasolla. Kyseessä oli kuitenkin alun perin sama konsentraatti, mutta jota oli laimennettu hiukan vedellä. Näinkin pienellä erolla saattaa olla vaikutusta esimerkiksi kiteytymisnopeuteen ja kiteiden laatuun (vrt. Kiteytyskoe 1).

7.4 Kiteytyskoe 3, suolalisäyksen vaikutus

Kiteytyskokeessa 2 osittain kiteytynyt Entsyymi D:n konsentraatti siirrettiin kylmään ja siitä otettiin näytteet uutta koetta varten. Kokeessa oli tarkoituksena tutkia ammoniumsulfaatin ja Na-K-fosfaattipuskurin (natrium-kalium-fosfaattipuskuri) eli suolalisäyksen vaikutusta kiteytymiseen +50 °C:ssa. Valmistettiin yhteensä 10 koeputken sarja taulukoiden 3 ja 4 mukaisesti: näyteputkeen pipetoitiin 5000 µl 3-kertaista konsentraattia sekä joko 40-prosenttista ammoniumsulfaattia tai 4 M Na-K-fosfaattipuskuria (pH 6,5) taulukon osoittaman määrän verran. Tämän jälkeen mitattiin jokaisen putken pH. Osittain kiteytynyt konsentraatti saostui voimakkaasti ammoniumsulfaatin ja Na-K-fosfaatin lisäämisen yhteydessä, mutta sakka liukeni sekoittamalla.

Taulukko 3. Kiteytyskoe 3 ammoniumsulfaattilisäyksellä

Koe	3x kons. (µl)	40 % AS (µl)	Tutkittu AS-lisäys %	Mitattu pH
1	5000	50	0,4	4,28
2	5000	100	0,8	4,25
3	5000	150	1,2	4,25
4	5000	200	1,5	4,25
5	5000	250	1,9	4,26

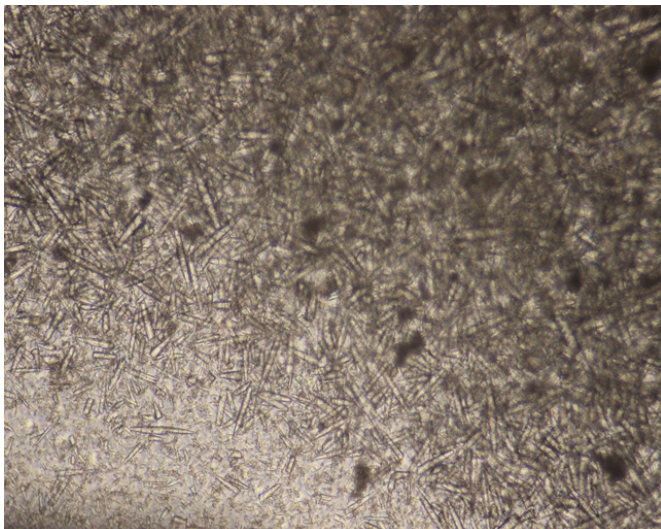
Taulukko 4. Kiteytyskoe 3 Na-K-fosfaattipuskurilisäyksellä

Koe	3x kons. (µl)	4 M Na-K-phos (µl)	Tutkittu Na-K-fosf-lisäys M	Mitattu pH
6	5000	50	0,040	5,16
7	5000	100	0,078	5,85
8	5000	150	0,117	6,08
9	5000	200	0,154	6,19
10	5000	250	0,190	6,24

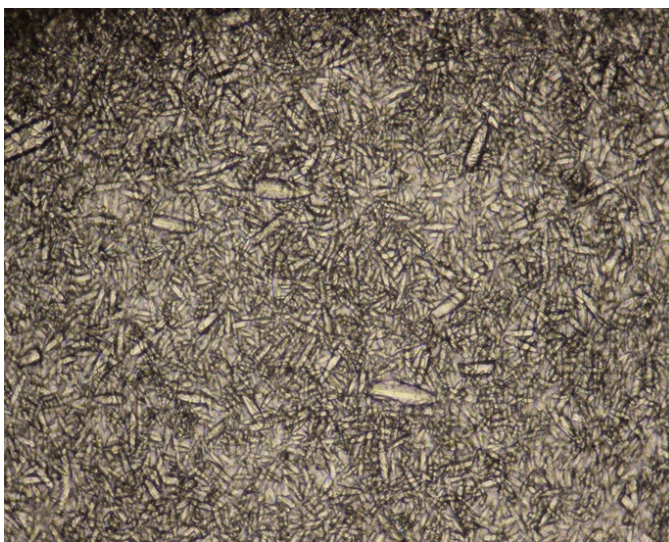
Koska entsyymi D:llä saatiin selvä saostumishavainto ammoniumsulfaattia lisättäessä, päätettiin testata myös entsyymi C:n kiteytystä tällä kertaa panoskokeena vastaavissa olosuhteissa. Entsyymi C:stä ei ollut saatu kiteytymishavaintoja aikaisemmissa hanging drop -kokeissa. Entsyymiliuoksessa on Proxel LV-liuoksen sijasta käytetty säilöntäaineena natriumbentsoaattia ja haluttiin selvittää, vaikuttaako suolalisäys kiteytymiseen. Entsyymi C:n liuosta otettiin kahteen koeputkeen, joiden pH säädettiin 2 M:lla rikkihapolla mahdollisimman lähelle arvoa 4,2, minkä jälkeen yhteen putkista lisättiin 40-prosenttista ammoniumsulfaattia niin, että loppupitoisuus oli 1 %. Toiseen putkista ei lisätty vertailun vuoksi suolaa ollenkaan. Putkia inkuboitiin +50 °C:ssa vuorokausi.

Vuorokauden jälkeen mikroskojoiitiin +50 °C:ssa olleet putket. Kannalla 1 tuotettu entsyymi C ei ollut suolalisäyksestäkään huolimatta lähtenyt kiteytymään, mutta molemmat putket olivat samentuneet ja niistä oli tullut viskoosimpia/geelimäisiä. Kahden päivän jälkeen muutoksia ei ollut tapahtunut, putket olivat pysyneet saman näköisinä, eikä niissä ollut kiteitä. Todettiin, että ammoniumsulfaatin lisääminen ei auttanut kyseisen entsyyminäytteen kiteytymisessä.

Na-K-fosfaatti- ja ammoniumsulfaattikokeen Entsyymien D kiteytysputkiin 1—10 oli muodostunut runsaasti sakkaa, jota oli eniten Na-K-fosfaattiputkissa. Mikroskojoiimalla sakka voitiin todeta kiteiksi ja huomattiin, että suolapitoisuuden noustessa kiteiden paksuus näyttäisi lisääntyvän. Lisäksi Na-K-fosfaatti-putkien kiteet näyttivät paksumman ja vahvemman näköisiltä (vrt. kuvat 10 ja 11). Kiteet olivat suurimmalta osin toisiinsa takertuneita, paikoittain kiteiden muodostamia klustereita. Kahden päivän jälkeen kiteiden määrä oli lisääntynyt, mutta muita muutoksia ei juurikaan havaittu.



Kuva 10. Kiteytyskoe 3, koe 5, jossa 1,9 % ammoniumsulfattia, pH 4,26. Kuvassa nähtävissä ainoastaan kiteitä.



Kuva 11. Kiteytyskoe 3, koe 7, jossa 0,078 M natriumkaliumfosfaattia, pH 5,85. Kuvassa nähtävissä ainoastaan kiteitä.

7.5 Kiteytyskoe 4, kidemassan kerääminen ja suolalisäys

Kiteytyskokeen 3 tuloksien johdosta päätettiin, että jäljellä olevalle Entsyymi D:n konsentraatille tehdään myös suolalisäys. Konsentraattiin lisättiin 40-prosenttista ammoniumsulfattiliuosta ja Na-K-fosfaattipuskuria (pH 6,5) niin, että lopulliset pitoisuudet olivat noin 0,2 M Na-K-fosfaattia ja 1 % ammoniumsulfattia. Konsentraatti ja suolako-

keissa käytetyt putket siirrettiin +40 °C:seen, tarkoituksena saada mahdollisimman paljon kidemassaa uusia liukoisuuskokeita varten.

7.6 Liukoisuuskoe 2, lämpötilan ja suolapitoisuuden vaikutus

Kiteytyskoe 4:stä saadut kiteet pestiin ja kerättiin talteen. Niistä valmistettiin kidesuspensiota niin, että pestyä kidemassaa laimennettiin 0,2-prosenttista Proxel LV -liuokseen samassa suhteessa kuin aikaisemmassa liukoisuuskokeessa; tavoitteena oli sama tai hieman laimeampi liuos kuin aiemminkin. Kidesuspensiosta valmistettiin liukoisuuskokeet ohjeen mukaan, liite 2.

Liukoisuuskokeita toteutettiin kolme erilaista:

1. Pestyjen kiteiden liukoisuus 0,2 M Na-K-fosfaattipuskurissa (pH 6,5) +0,2-prosenttisessa Proxel LV-liuoksessa lämpötilan funktiona
2. Ei-pestyjen kiteiden liukoisuus 0,2 M Na-K-fosfaattipuskurissa (pH 6,5) +0,2-prosenttisessa Proxel LV-liuoksessa lämpötilan funktiona
3. Pestyjen kiteiden liukoisuus +37 °C:ssa 0,2-prosenttisessa Proxel LV-liuoksessa Na-K-fosfaattipuskurin (pH 6,5) pitoisuuden funktiona

Niin sanotut ei-pestyt kiteet eli taustan epäpuhtauksia sisältävät liukoisuuskokeet valmistettiin poistamalla pestyistä kiteistä sentrifugoinnin jälkeen mahdollisimman tarkasti nestekerros ja lisäämällä sakan sekaan saman verran aiemmin kiteytyskoe 1:ssä talteen otettua emäliuosta, jotta taustan epäpuhtauksista saatiin palautettua mahdollisimman edustava näyte kaikkiin rinnakkaisiin kokeisiin. Tarkoituksena oli nähdä, millainen vaikutus taustan epäpuhtauksilla on kiteiden liukoisuuteen ja siten mahdolliseen kidesaantoon. Liukoisuuskokeet, joissa liukoisuutta tutkittiin lämpötilan funktiona, laitettiin seitsemään eri lämpötilaan inkuboitumaan kahdeksi päiväksi.

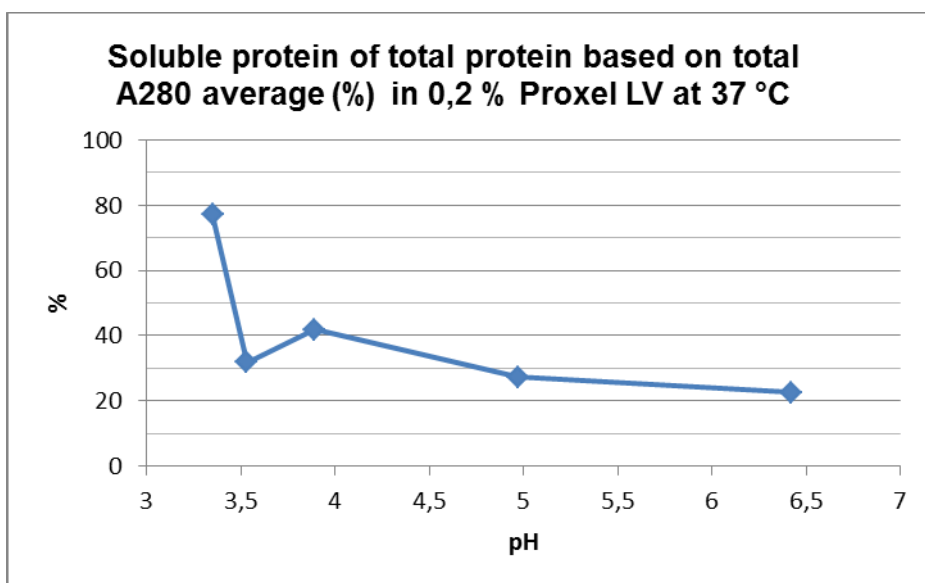
Liukoisuuskokeet, joissa liukoisuutta tutkittiin Na-K-fosfaatin pitoisuuden funktiona, laitettiin +37 °C:seen inkuboitumaan 2 päiväksi.

Ei-pestyjen kiteiden putkissa oli silmämääräisesti katsottuna eniten kidemassaa. Tämä johtuu luultavasti siitä, että lisätyn emäliuoksen sisältämä liukoinen entsyymi on tutkituissa olosuhteissa jatkanut kiteytymistä. Koesarjan 3 putkien perusteella liukoisuus

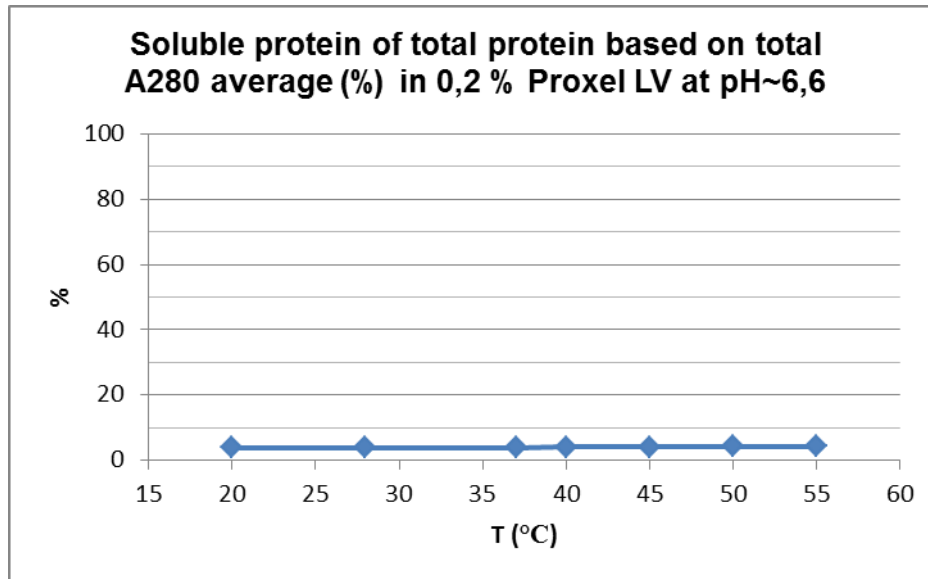
näyttäisi pienenevän Na-K-fosfaatti-pitoisuuden noustessa eli kidemassan määrä kasvoi suolapitoisuuden kasvaessa.

Inkubointiajan jälkeen kaikista liukoisuuskokeista otettiin kokonais- ja liukoisuusnäytteet ja kokonaisnäytteet mikroskopoitiin. Mikroskopointi oli vaikeaa kiteiden suuren määrän vuoksi, mutta kiteiden huomattiin esiintyvän neulamaisen muodon lisäksi myös muun muotoisina, esimerkiksi neliskulmaisina. Osa saattoi olla myös rikkoutuneita kiteen palasia.

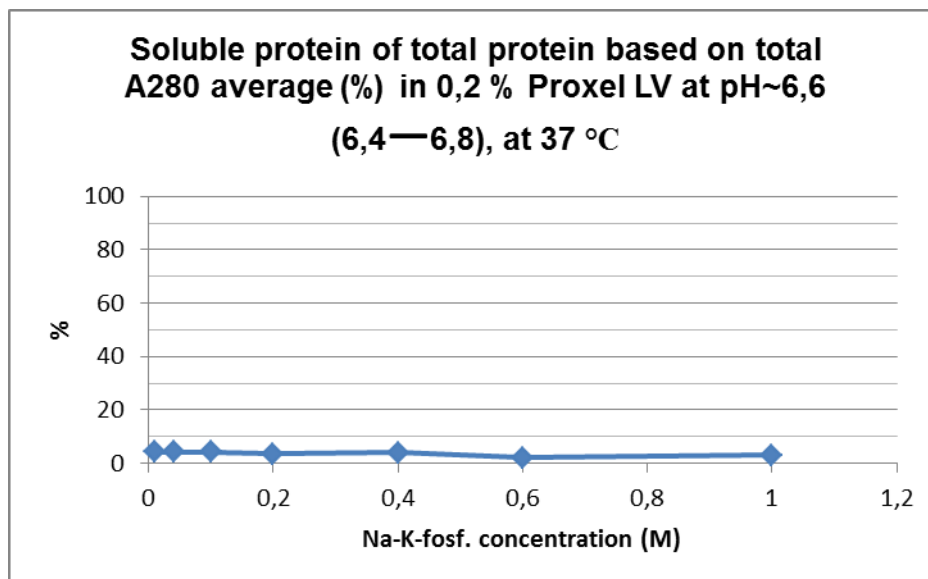
Liukoisuuskoesarjoille 1 ja 2 (pH:n funktiona, lämpötilan funktiona ja Na-K-fosfaattipuskurin funktiona) mitattiin A280-arvot. Laimennokset tehtiin kuten aiemmin 100 mM:n suolahappoon. Ei-pestyjen kiteiden näytteille ei tehty mittausta, koska se ei olisi ollut mielekäästä näytteen epäpuhtauksien antaman tausta-absorbanssin vuoksi. Mittaustulosten avulla piirrettiin liukoisuuskäyrät (kuvat 12–14). Mittaustulokset ovat liitteessä 3.



Kuva 12. Liukoisen proteiinin suhteellinen osuus pH:n funktiona +37 °C:ssa 0,2-prosenttisessä Proxel LV -liuoksessa.



Kuva 13. Liukoisen proteiinin suhteellinen osuus lämpötilan funktiona 0,2-prosenttisessa Proxel LV -liuoksessa pH:n ollessa noin 6,6.



Kuva 14. Liukoisen proteiinin suhteellinen osuus suolapitoisuuden funktiona 0,2-prosenttisessä Proxel LV -liuoksessa pH:n ollessa välillä 6,4–6,8.

Liukoisuuskäyrien perusteella liukoisuus ei merkittävästi muutu eri lämpötiloissa tai suolapitoisuuksissa. Kuitenkin alhaisilla pH-alueilla liukoisuus näyttäisi olevan suurimmillaan ja pH:n noustessa liukoisuus pienenee.

Pohdintaa herätti liukoisuuskokeen 2 pH, joka oli sattumalta valittu alueelta, jolla entsyymin liukoisuus vaikutti olevan alimmillaan (pH > 6,0). Tällöin mahdolliset liukoisuus-erot ovat vaikeammin havaittavissa. Kuvia vertailemalla huomattiin myös, että kuvissa 13 ja 14 liukoisuus on reilusti alle 10 % (pH:n ollessa ~6,6), kun taas kuvassa 12 liukoisuus on 25 %:n luokkaa samalla pH-alueella. Kyseessä on kaksi eri koesarjaa, jotka on tehty erilailla käsitellyillä materiaaleilla. Kuvien 13 ja 14 materiaalin pH-säätö on tehty Na-K-fosfaattipuskurilla, jolloin suolalisäys on voinut vaikuttaa liukoisuuteen; kuvan 12 materiaalin pH-säätö toteutettiin muista poiketen natriumhydroksidilla ja suolahapolla. Näiden tulosten valossa päätettiin toteuttaa vielä uudet liukoisuuskokeet Na-K-fosfaattipuskurin eri pH-alueilla.

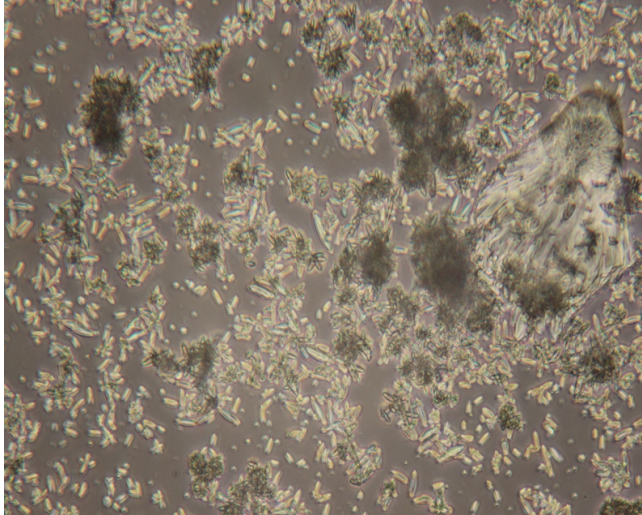
7.7 Kiteytyskoe 5, suolalisäyksen vaikutus

Kiteytyskokeen tarkoituksena oli testata konsentroimattoman materiaalin kiteytymistä ammoniumsulfaattilisäyksen avulla. Tämän lisäksi kokeiltiin myös kannalla 1 tuotetun entsyymin C kiteytymistä. Kiteytymisen tehostamiseksi näytteisiin lisättiin aikaisemmissa kokeissa käytettyä Na-K-fosfaattipuskuria (pH 6,5). pH-alue valittiin aiempien kokeiden mukaisesti. Kannan 1 näytteen suolapitoisuus oli 0,2 M, kannan 2 näytteessä 0,5 M. Lisäksi kannalla 2 kiteytyskokeet toteutettiin kahdessa lämpötilassa; +37 ja +50 °C:ssa. Kanta 1:n putkia inkuboitii +50 °C:ssa. Putkia tarkasteltiin yhden ja neljän päivän kuluttua.



Kuva 15. Kannalla 1 tuotettu entsyymi C 4 päivän jälkeen 50 °C:ssa.

Kannalla 1 tuotettu entsyymi C ei lähtenyt kiteytymään suolalisäyksestä huolimatta entsyymi D:lle löydetyllä optimi-pH-alueella. Putkeen muodostui sakkaa, joka mikroskoopilla tarkasteltaessa vaikutti geelimäiseltä sakalta (kuva 15). Kanta 2:n entsyymi D lähti kiteytymään molemmissa tarkasteltavissa lämpötiloissa, ja putkien seinämällä ja pohjassa oli havaittavissa kiteitä, jotka aikaansaivat opalisoivan suspension. +50 °C:ssa inkuboitu näyte näytti sisältävän enemmän kidemassaa kuin +37 °C:ssa säilytetty näyte. Mikroskopoidessa +37 °C:n kiteet olivat tasakokoisempia ja tasalaatuisemman näköisiä, kun taas +50 °C:n kiteillä oli erittäin laaja kokoskaala. Molemmissa putkissa oli tyypillisen neulamaisen kiteen lisäksi epäsäännöllisemmän muotoisia kiteitä. Neljän päivän kuluttua +37 °C:n kiteet olivat lisääntyneet huomattavasti ja kiteet olivat muodostaneet paikoin tiiviitä kideklustereita (kuva 16). +50°C:een kiteissä oli havaittavissa uutena kidemuotona sutimaisia/harjamaisia kiteitä, jotka olivat kooltaan paljon neulamaisia kiteitä suurempia (kuva 17). Yleisesti ottaen +37 °C:ssa kiteytetty näyte näytti paremmalta ja tasalaatuisemmalta.



Kuva 16. Kannalla 2 tuotettu entsyymi D 4 päivän jälkeen, kun lämpötila +37 °C.



Kuva 17. Kannalla 2 tuotettu entsyymi D 4 päivän jälkeen, kun lämpötila +50 °C

7.8 Kiteytyskoe 6, Na-K-fosfaatin vaikutus

Tarkoituksena oli tehdä uusi kiteytyskoe huoneenlämpötilassa eri Na-K-fosfaattipuskuri-pitoisuuksissa. Käytettävissä oli 3 eri puskuriliuosta (pH 5,0; 6,5 ja 7,5). Konsentroidonta materiaalia konsentroidiin 3-kertaiseksi ja siitä valmistettiin 21 panoskoetta liitteen 4 ohjeen mukaisesti. Panoskokeet siemennettiin aikaisempien liukoisuuskokeiden kidesuspensiolla, jota oli hienonnettu lasihelmillä kidealkioiden määrän

lisäämiseksi. Korkea pH vaikutti aiheuttavan eniten ongelmia suolan lisäyksen yhteydessä; puskuria lisättäessä liuokset sakkasivat eniten pH-alueella 7,5. Lisäksi siemenkidelietteen lisääminen samensi näytteitä edelleen. Valmiit panoskoenäytteet jätettiin huoneenlämpöön jatkuvalle keinutukselle ja niistä otettiin mikroskopointinäytteet.

Panoskiteytysputkien annettiin olla huoneenlämmössä 6 päivää, minkä jälkeen putkista otettiin kokonais- ja liukoisuusnäytteet. Ennen liukoisuusnäytteen ottamista tasalaatuisten näytteen sisältävät eppendorf-putket sentrifugoitiin ja valokuvattiin kidemassan määrän arvioimista varten. Kuvien avulla voitiin tehdä alustavia aktiivisuusarvioita liukoisuusnäytteille, kun kokonaisnäytteen laskennallinen aktiivisuus oli jo tiedossa. Aktiivisuusarvioita käytettiin aktiivisuusanalyysin näytelaimennosten laatimiseen. Aktiivisuusmääritykset käydään tarkemmin läpi aktiivisuusmääritykset-osiossa.

7.9 Kiteytyskoe 7, pH:n vaikutus

Aikaisemmassa panoskiteytyskokeessa pH ja suolapitoisuus vaihtelivat, minkä takia päätettiin tehdä vielä yksi koesarja pH:n funktiona ilman suolalisäystä. Tällöin suolalisäyksen sijasta pH säädettiin 2M NaOH:lla eli natriumhydroksidilla. Näin voitiin tarkastella pelkän pH:n vaikutusta kiteiden liukoisuuteen. Näistä näytteistä analysoitiin myös myöhemmin entsyymiaktiivisuudet kokonais- ja liukoisuusnäytteille.

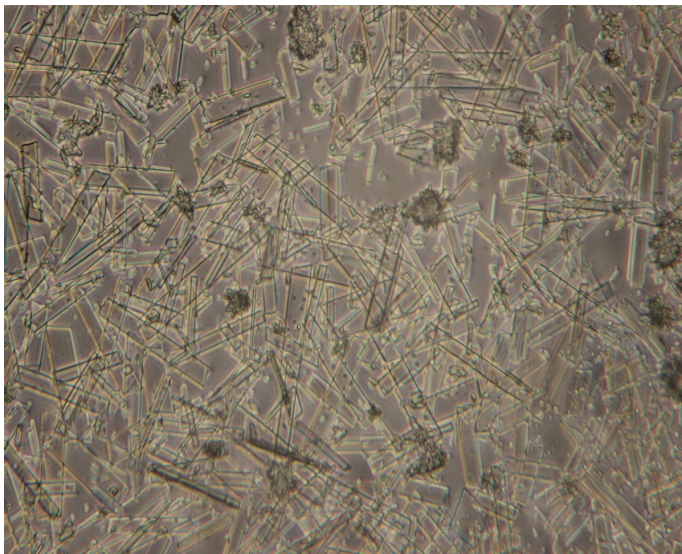
Taulukko 5. Kiteytyskokeen 7 ohje.

Panoskiteytyskoesarja huoneenlämmössä eri pH-arvoissa (kiteytysaika 5 - 7 päivää keinutuksella)				
Koe	3x konsentraattia pH 4,1 (ml)	3x konsentraattia pH 9,0 (ml)	Mitattu pH	Siemenkideslurrya (µl)
EK2-7-1	4,5	1,5	5,3	10
EK2-7-2	3,6	2,4	6,26	10
EK2-7-3	2,7	3,3	6,86	10
EK2-7-4	1,8	4,2	7,4	10
EK2-7-5	0,9	5,1	7,93	10
EK2-7-6	0	6	8,75	10
EK2-7-2B	2,55	1,7	6,12	0

Valmistettiin 6 panoskoeputkea taulukon 5 mukaan. Putket siennettiin aikaisempien liukoisuuskokeiden kidemassalla. Huomattiin, että siennitys samensi putket. Ennen

siemennystä putkiin oli jo valmistusvaiheessa muodostunut sakkaa, joka mikroskopimalla vahvistettiin kiteiksi. Tämän johdosta päätettiin tehdä vielä seitsemäs koeputki, joka oli muuten verrattavissa koesarjan toiseen koeputkeen, mutta jätettiin ilman siemennystä (putki 2B). Teoriassa siementämättömän koeputken pitäisi ainoastaan kiteytyä hitaammin kuin siemennetty putki, mutta putkia tarkastellessa siementämätön putki oli väriltään vaaleampi ja kiteet näyttivät tasalaatuisemmilta.

Kidemuotoja oli useita erilaisia; neulamaisten kiteiden ja pallomaisten kideklustereiden lisäksi mikroskopoidessa havaittiin myös suorakulmaisia, levymäisiä kiteitä sekä neliskanttisia kiteitä. (kuvat 18 ja 19).



Kuva 18. Koe EK2-7-3, pH 6,86.



Kuva 19. Pallomaisten kideklustereiden keskellä yksi neliskanttinen kide. Koe EK2-7-4, pH 7,4.

Panoskoeputkia inkuboitiin huoneenlämmössä jatkuvassa keinutuksessa kuusi päivää samoin kuin aikaisemmissa panoskiteytyskokeissa, minkä jälkeen niistä otettiin kokonais- ja liukoisuusnäytteet kuten aiemmin. Sentrifugoidut kokonaisnäytteet valokuvattiin aktiivisuusanalyysin laimennoksien suunnittelua varten.

8 Aktiivisuusmääritykset

8.1 Liukoisuuskoe 1

Ensimmäisille liukoisuusnäytteille (pH:n funktiona) tehtiin aktiivisuusanalyysi. Näytteille oli alustavien aktiivisuusarvioiden perusteella laskettu laimennoskertoimet, sillä menetelmä on lineaarinen vain absorbanssialueella 0,1–0,4. Tulokset jäivät kuitenkin alle sallitun arvon, joten tulokset eivät olleet luotettavia. Tämä viittasi aluksi siihen, että näytteissä olisi luultua vähemmän aktiivisuutta. Tästä johtuen analyysi uusittiin pienemmillä laimennoksilla, jotta absorbansseista saataisiin korkeammat. Uudet tulokset eivät menneet loogisesti aikaisempien tulosten kanssa, vaan olivat edelleen alle asetettujen absorbanssirajojen. Todettiin, että näytteet käyttäytyvät omituisesti, erityisesti kiteitä sisältävät kokonaisnäytteet. Analyysiä tehtäessä oli huomattu, että ensimmäisessä laimennoksessa kokonaisnäytteet olivat edelleen sameita eli kiteet eivät ilmeisesti lienneet käytettyyn analyysipuskuriin. Tämä vaikeutti jatkolaimennosten tekoa, sillä kiteisestä näytteestä oli vaikea saada edustava, tasalaatuinen näyte seuraaviin

laimennoksiin. Lisäksi kiteet ja näytteen muut ominaisuudet saattoivat aiheuttaa ongelmia, jotka tekivät analyysistä epäsoveliaan kyseiselle näytteelle.

Seuraavassa analyysissä kokeiltiin jatkuvan sekoituksen vaikutusta laimennosten teossa. Sekoituksen tarkoituksena oli varmistaa näytteen tasalaatuisuus, kun näytettä laimennettiin laimentimella. Ensimmäiset laimennokset tehtiin mittapulloihin, jotka olivat jatkuvassa sekoituksessa. Jatkolaimennokset tehtiin laimentimen avulla koeputkiin, joita sekoitettiin huolellisesti. Tulokset olivat hieman parempia, mutta aktiivisuudet olivat edelleen kaukana oletetuista aktiivisuusarvioista, joten päätettiin kokeilla kiteiden liuottamisen vaikutusta analyysituloksiin.

Koska aikaisemmin oli huomattu, että 100 mM suolahappo liuottaa kiteet, käytettiin sitä myös aktiivisuusanalyysissä. Aluksi suolahapon aiheuttama mahdollinen pH:n muutos askarrutti; analyysin puskurin pH on 7,0, joten analyysin luotettavuus saattaa kärsiä pH-muutoksista. Lisäksi itse proteiini saattaa denaturoitua suolahapon lisäyksen yhteydessä. Päätettiin kokeilla ensimmäisen laimennoksen tekemistä 100 mM suolahappoon kiteiden liuottamiseksi, jolloin seuraavat laimennokset voitiin tehdä analyysipuskuriin. Viimeisimmästä laimennuksesta tuli tarkistaa pH ja verrata sitä normaalisti käsiteltyyn näytteeseen. Laimennokset tehtiin edelleen jatkuvassa sekoituksessa.

Näytteiden vähäisistä määristä johtuen seuraava analyysikokeilu toteutettiin toisen liukoisuuskoesarjan näytteelle (pestyjen kiteiden liukoisuus lämpötilan funktiona, näyte 4, +37 °C). Analyysissä analysoitiin rinnakkain suolahappo-käsitelty ja käsittelemätön näyte eri laimennoksilla. Suolahappo ei vaikuttanut lopullisen laimennoksen pH-arvoon merkittävästi, mutta se kirkasti kokonaisnäytteet eli sai kiteet liukenemaan. HCl-käsiteltyjen näytteiden absorbanssit olivat käsittelemättömien näytteiden absorbansseja suurempia, vaikka laimennokset olivat likipitään samat, mutta aktiivisuudet olivat edelleen paljon arvioitua pienempiä. Suolahappo näytti parantavan analyysitulosta ja tekevän tuloksista loogisempia, mutta jostain syystä analyysi vaikutti epäsoveliaan tämänkaltaisille näytteille. Myöhemmin varmistettiin, ettei suolahappo inaktivoi entsyymiä (luku 8.2). Saatujen tuloksien perusteella päätettiin, että myöhemmin tulisi kokeilla suolahappokäsittelyä ei-kiteisille näytteille eli vielä aikaisemmin talteenotetulle emäliuokselle, alkuperäiselle lähtönäytteelle (pakastettu, 3-kertainen konsentroidi) sekä aikaisemmin kiteytetylle konsentroidimattomalle materiaalille.

8.2 Lähtönäyte, emäliuos ja konsentroimaton näyte

Tarkoituksena oli vielä kokeilla aktiivisuusanalyysiä kiteyttämättömälle lähtönäytteelle, emäliuosnäytteelle ja aikaisemmin kiteytetylle, konsentroimattomalle näytteelle. Aktiivisuusarvioiden perusteella näytteille laskettiin laimennoskertoimet ja jokaisesta näytteestä oli sekä suolahappokäsittelty näyte että käsittelemätön näyte. HCl-käsitellyt näytteet muuttuivat kirkkaiksi, mutta vaahtosivat runsaasti. Vaikka lopullisen laimennoksen pH on suolahappokäsitellyilläkin normaali, voi pH:n lasku ensimmäisessä laimennoksessa vaikuttaa analyysituloksiin.

HCl-käsiteltyjen näytteiden aktiivisuus oli analyysin mukaan suurempi kuin näytepuskuriin laimennettujen näytteiden, mikä viittasi siihen, ettei suolahappokäsittelyllä ollut inaktivoivaa vaikutusta. Ainoastaan emäliuoksen aktiivisuusarvio täsmäsi analyysin tuloksen kanssa; muiden näytteiden aktiivisuustulokset jäivät alle arvion. Vaikka kyseessä on melko stabiili entsyymi, saattaa olla että näytteen aktiivisuus on pienentynyt pakastettaessa. Todennäköisempää on kuitenkin, että käytetty analyysi ei sovi kyseisille näytteille. Jos lähtö- ja emäliuosnäytteen tulokset pitävät paikkansa, se tarkoittaisi pelkkien kiteiden aktiivisuuden olevan lähes olematon. Tämä johtuu siitä, että kiteiden aktiivisuus on lähtönäytteen ja emäliuoksen aktiivisuuksien erotus. Tuloksia saattaa kuitenkin selittää se, että käytettyä analyysiä ei ole optimoitu tällaisille näytteille. Kyseisen aktiivisuusanalyysin virhemarginaali on suuri ja jos kidesaanto on ollut pieni, ei tällä analyysimenetelmällä voida saada luotettavia tuloksia. Tulokset liitteessä 5.

8.3 Kiteytyskoe 6

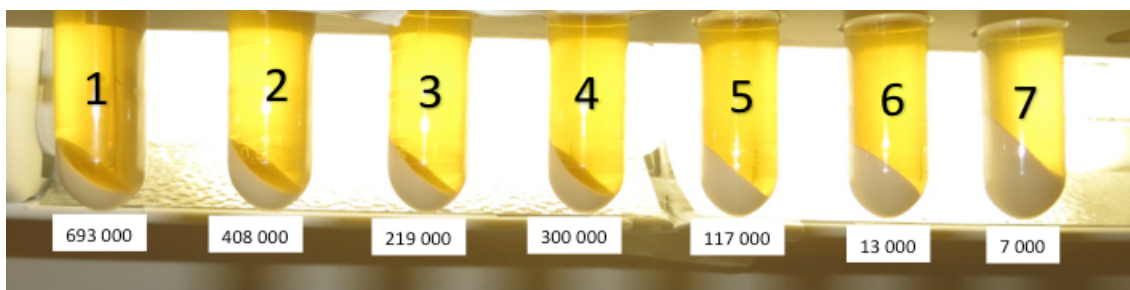
Kaikista liukoisuusnäytteistä ja suurimmasta osasta kokonaisnäytteitä mitattiin entsyymiaktiivisuus. Kaikkia kokonaisnäytteitä ei tarvinnut analysoida, sillä niiden aktiivisuus oli analyysitarkkuuden rajoissa samaa luokkaa, jolloin riitti että osa analysoidaan ja niiden avulla lasketaan aktiivisuuskeskiarvo kaikille kokonaisnäytteille. Kokonaisnäytteet oli jo aikaisemmin todettu melko stabiileiksi. Liukoisuusnäytteiden aktiivisuudet taas ovat riippuvaisia kidemassan määrästä, jolloin niistä jokainen täytyi analysoida.

Näytteiden analyysit sujuivat hyvin, näytteet käyttäytyivät paremmin verrattuna aikaisemmin tehtyihin aktiivisuusanalyysiin pestyillä kiteillä. Kokonaisnäytteiden ensimmäinen laimennos tehtiin 100 mM suolahappoon niin kuin aikaisemmin, koska se oli

havaittu ainoaksi toimivaksi ratkaisuksi saada lukuarvo kokonaisaktiivisuudelle, johon liukoista aktiivisuutta voitiin verrata. Tarkoituksena oli selvittää, ettei kokonaisaktiivisuuden suhteen ollut tapahtunut hävikkiä ja että kiteet olivat liotettavissa. Analyysin aikana huomattiin, että liukoiset näytteet, joissa ei ollut kidettä mukana, eivät tätä käsittelyä tarvinneet, vaan tulokset olivat loogisia myös ilman käsittelyä. Vähentämällä liukoisuusnäytteen aktiivisuustuloksen kokonaisnäytteen vastaavasta, saatiin selvitettyä kidemassan aktiivisuus. Tarkoituksena oli tulosten perusteella piirtää liukoisuuskäyrät suolapitoisuuden funktiona kullakin tutkitulla pH-alueella.

Sentrifugoiduista kokonaisnäytteistä otetut kuvat helpottivat liukoisten näytteiden laimennosten tekoa. Huomattiin kuitenkin, että kidemassan määrästä ei voitu luotettavasti päätellä liukoisen näytteen aktiivisuutta. Välillä kidemassaa saman verran sisältävien putkien liukoisissa näytteissä aktiivisuudet olivat huomattavasti eri tasoilla. Tämä johtuu luultavasti kiteiden erilaisesta pakkautumisesta putkien pohjalle, mikä taas riippuu kiteiden muodosta, koosta ja mahdollisista kideklustereista.

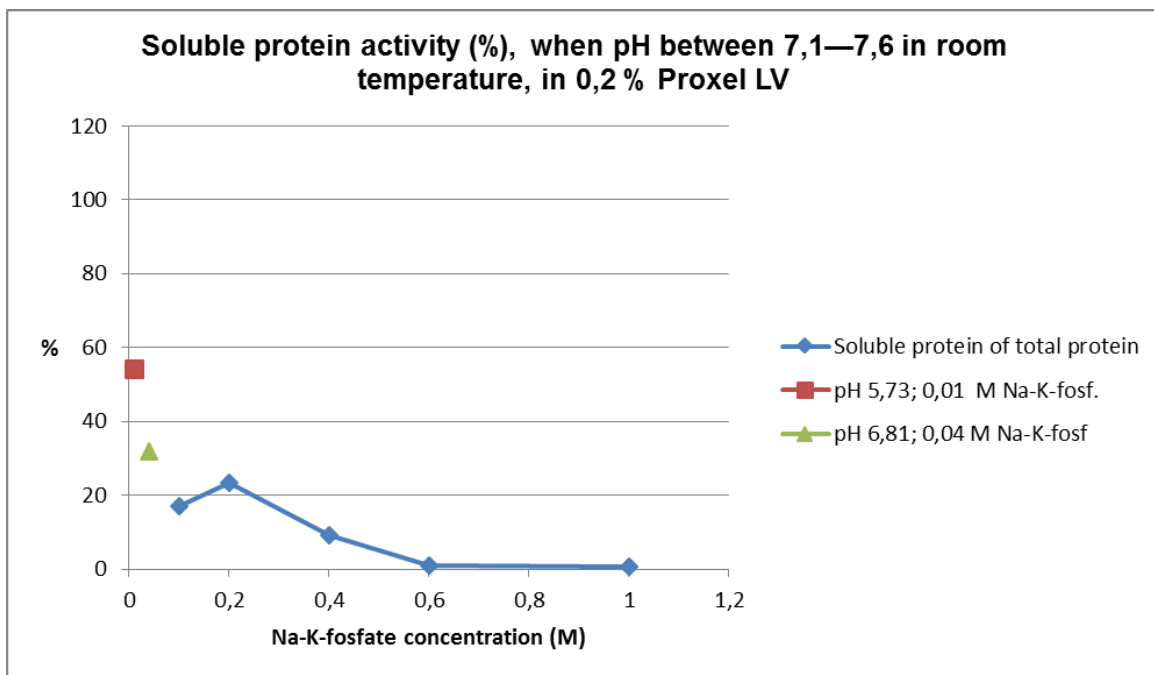
Esimerkkinä kuvassa 20 on kuvattuna Kiteytyskokeen 6 kokonaisnäytteet 1–7. Näytteet on sentrifugoitu, jotta kiteet saatiin mahdollisimman tiiviisti putken pohjalle. Putkien alle on merkitty kyseiselle näytteelle analysoitu liukoisen proteiinin aktiivisuus. Teoriassa mitä vähemmän kidettä putkessa on, sitä suurempi on liukoisen proteiinin aktiivisuus. Kuitenkin esimerkiksi putkissa 1 ja 4 liukoisen proteiinin aktiivisuudet eroavat suuresti toisistaan, vaikka kiteiden määrät näyttävät silmämääräisesti yhtä suurilta. Tämä saattaa johtua kiteiden erilaisesta pakkautumisesta putkien pohjalle esimerkiksi kideklustereiden takia. Tästä johtuen liukoisten näytteiden laimennosten suunnittelu oli paikoin haastavaa, ja useasti samasta näytteestä tehtiinkin useampi laimennos.



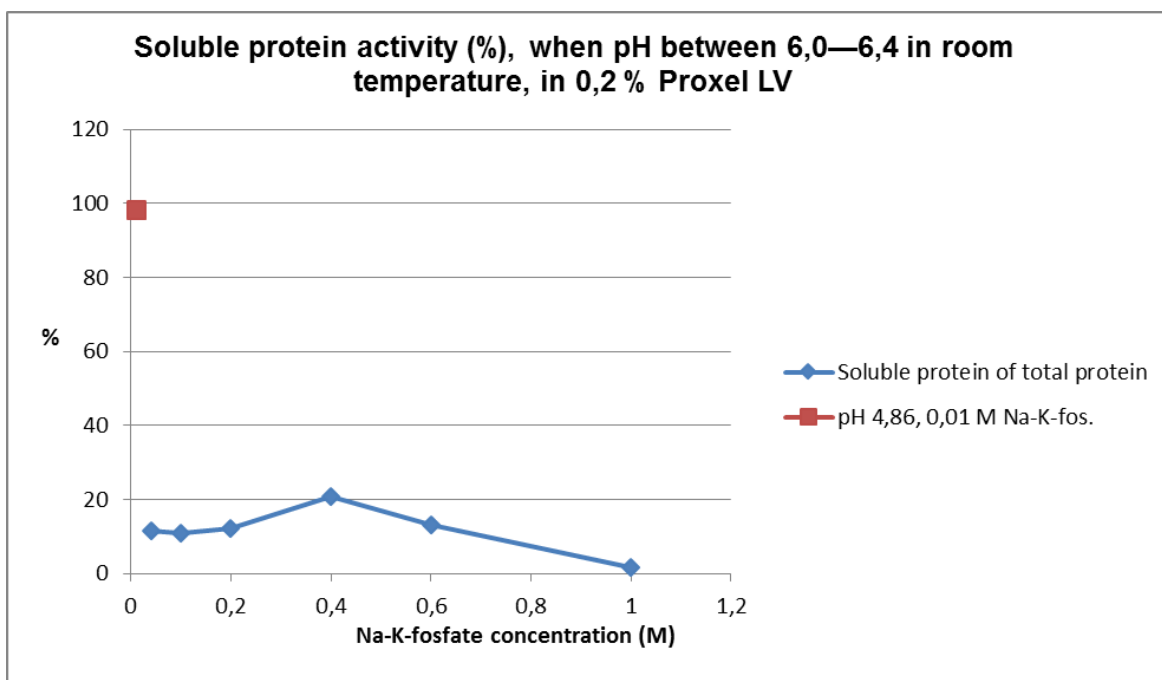
Kuva 20. Kiteytyskoe 6:n sentrifugoidut kokonaisnäytteet 1–7. Kuvassa myös liukoisen proteiinin analysoidut aktiivisuudet. Aktiivisuuden yksikkönä käytetty aktiivisuusyksikköä grammaa kohden (U/g).

Pohdintaa herätti analyysien onnistuminen verrattuna aikaisempiin aktiivisuusanalyyseihin. Syy tähän ei varmasti selvinnyt, mutta todennäköisesti kiteiden pesussa käytetty säilöntäaine Proxel LV saattaa vaikuttaa näytteiden laatuun ja sitä kautta analyysin onnistumiseen. Tämänkaltaiset ongelmat tulivat erityisesti esiin näytteillä, joiden taustaepäpuhtaudet oli poistettu eli 0,2-prosenttiseen Proxel LV -liuokseen pestyillä kiteillä. On julkaisuja, joissa Proxel LV:n kaltaisilla biosideilla on todettu olevan vuorovaikutuksia proteiinien ja entsyymien kanssa [32, s.14]. Näin ollen myös säilöntäaineella voi olla oma roolinsa näytteen kiteytyvyydelle ja kiteiden liukenevuudelle. Asian varmistaminen vaatisi kuitenkin lisätutkimuksia, jotka eivät kuuluneet tähän insinööriyöhön. Ajanpuutteen vuoksi esimerkiksi liukoisuuskoe 2:n kokeita, jotka toteutettiin ei-pestyillä kiteillä, ei ehditty analysoida. Koska pesemättömille kiteille ei voitu tehdä häiritsevää taustaabsorbanssista johtuen A280-mittausta, aktiivisuusanalyysi olisi ollut ainoa keino proteiinipitoisuuden selvittämiseen.

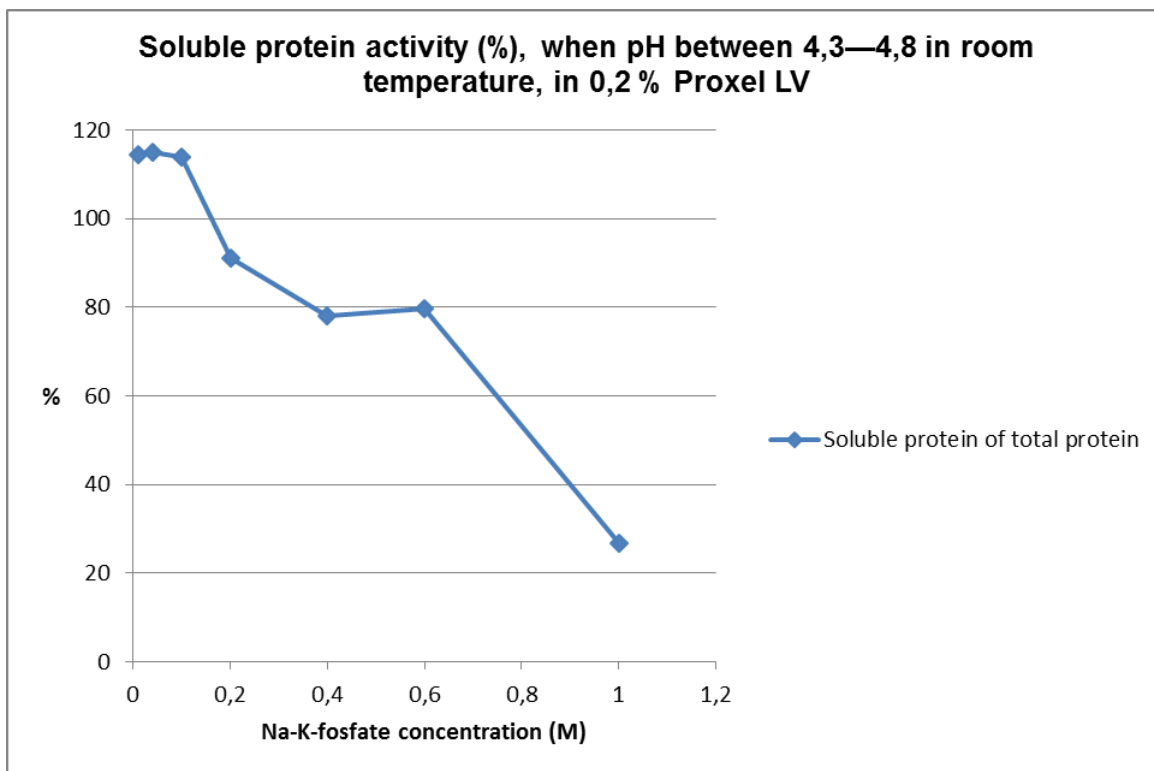
Panoskiteytyskokeet suoritettiin eri pH-arvoissa ja suolapitoisuuksissa, mikä toi selkeämpiä eroja liukoisuustuloksiin. Tuloksia voitiin tarkastella suolapitoisuuden funktiona ottamalla liukoisuuskäyriin läheisen pH-alueen näytteet. Mitatut aktiivisuustulokset ovat liitteessä 6.



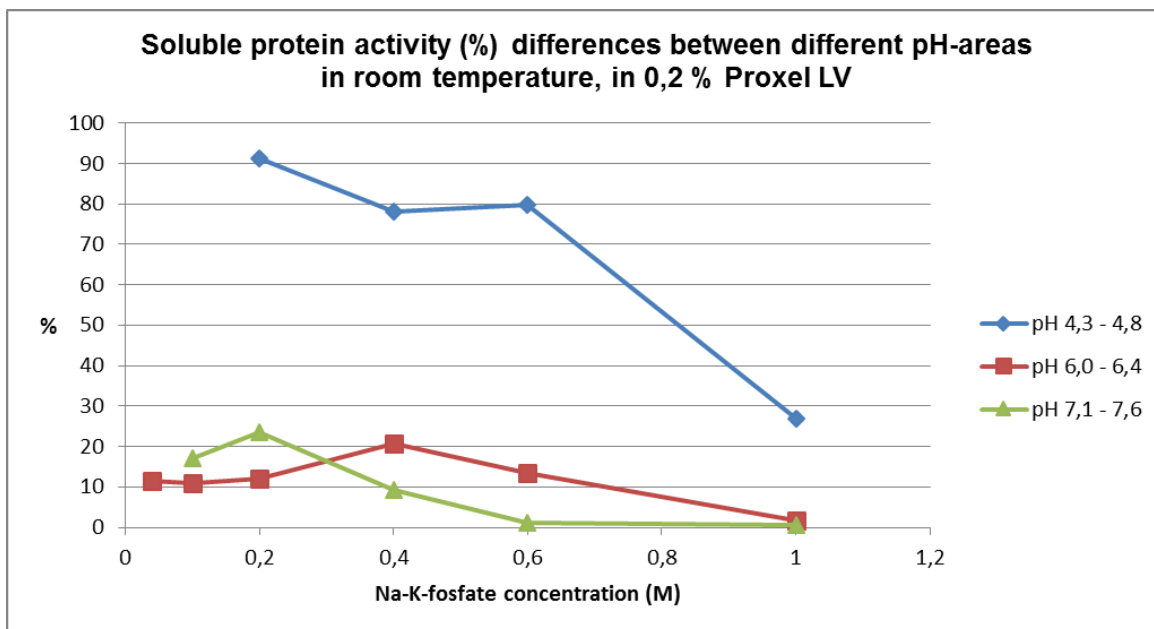
Kuva 21. Liukoisen proteiinin suhteellinen aktiivisuus suolapitoisuuden funktiona pH-alueella 7,1–7,6.



Kuva 22. Liukoisen proteiinin suhteellinen aktiivisuus suolapitoisuuden funktiona pH-alueella 6,0–6,4.



Kuva 23. Liukoisen proteiinin suhteellinen aktiivisuus suolapitoisuuden funktiona pH-alueella 4,3—4,8.



Kuva 24. Liukoisen proteiinin suhteellinen aktiivisuus eri pH-alueiden välillä.

Kuvassa 21 pH-arvot 5,73 ja 6,81 on merkitty omina pisteinä, koska tutkitulla Na-K-fosfaattipitoisuudella ei nähtävästi ollut riittävää puskurikapasiteettia pitämään pH:ta

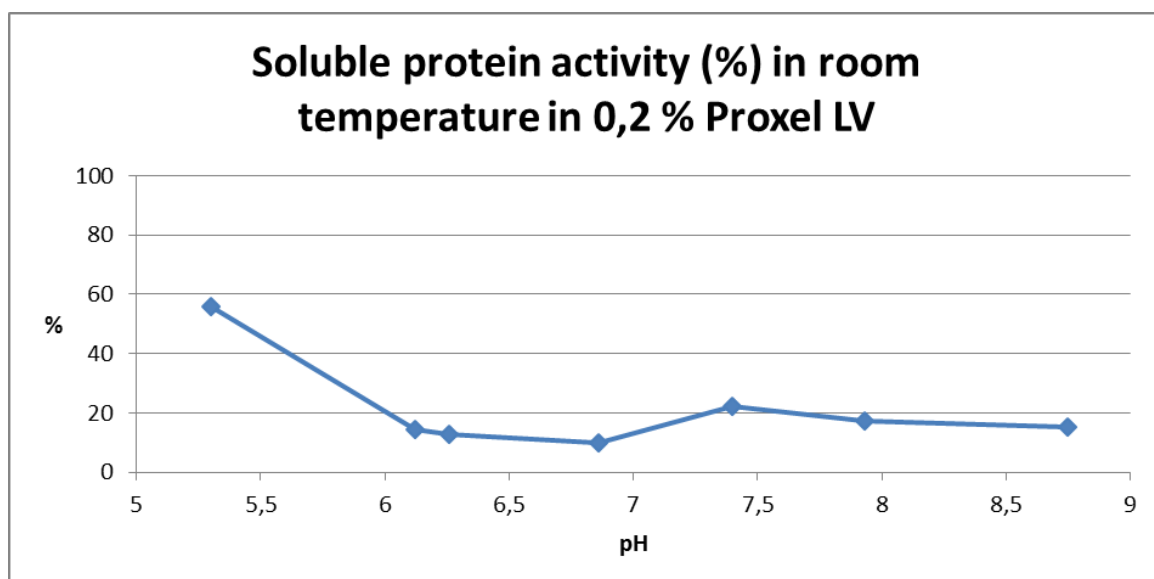
halutulla tasolla. Näin ollen kyseisissä pisteissä nähdään sekä saostinpitoisuuden että pH:n yhteisvaikutus liukoisuuteen, eikä niitä ole sen vuoksi otettu mukaan käyrälle. Samasta syystä kuvassa 22 pH-arvo 4,86 merkitty omana pisteensä.

Kuvista 21—24 nähdään, että liukoisen proteiinin osuus kokonaisaktiivisuudesta pienenee suolapitoisuuden kasvaessa, ts. entsyymi kiteytyy paremmin, kun suolapitoisuus lisääntyy. Lisäksi korkeampi pH (6,0—7,6) pienentää liukoisen aktiivisuuden osuutta kokonaisaktiivisuudesta. Esimerkiksi pH-alueella 7,1—7,6 ja yli 0,6 M suolapitoisuudessa liukoisen proteiinin aktiivisuus on lähestulkoon olematon eli käytännössä kaikki aktiivisuus on kiteisenä.

Saadut tulokset vahvistavat, että aikaisemmissa liukoisuuskokeissa asetetut pH-arvot sijaitsivat alhaisen liukoisuuden alueella, jolloin liukoisuuserot olivat vaikeammin huomattavissa.

8.4 Kiteytyskoe 7

Uusille panoskoeäynteille tehtiin aktiivisuusanalyysi. Määrittäminen suoritettiin samalla tavoin kuin aikaisemmat aktiivisuusanalyysit. Analyysituloksia käytettiin liukoisuuskäyrän luomiseen. Mitatut aktiivisuustulokset liitteessä 5.



Kuva 25. Liukoisen proteiinin suhteellinen aktiivisuus pH:n funktiona.

Kuvasta 25 nähdään, että kiteiden liukoisuus on pienimmillään pH:n ollessa 6,5 ja 6,8:n välillä. Tämän jälkeen liukoisuus taas kasvaa hieman. pH:n laskiessa alle 6,2:n liukoisuus kasvaa jyrkästi.

9 Tulosten yhteenveto

Entsyymi D saatiin kiteytymään tehokkaasti, kun sille löydettiin optimaaliset kiteytymisolosuhteet. Lisäksi lopputyössä kohdatut vaikeudet toivat yritykselle arvokasta lisätietoa esimerkiksi analyysiongelmissa tietynlaisten näytteiden kanssa. Alun hanging drop -kokeet eivät tuottaneet haluttua tulosta eli entsyymejä A, B ja C ei saatu merkittävästi kiteytymään. Entsyymi C:tä ei saatu kiteytymään myöskään isomman mittakaavan panoskiteytyskokeissa. Kiteytymisongelmat olivat ennalta-arvaamattomia, ja ne hidastivat työn kulkua. Hanging drop -kokeisiin käytettiin suunniteltua enemmän aikaa, vaikka kokeet eivät johtaneet haluttuihin tuloksiin. Tämän takia koettiin mielekkäämmäksi aloittaa pienen mittakaavan panoskiteytyskokeet entsyymillä D, josta oli jo tehty kiteytymishavaintoja.

Entsyymien D kohdalla lähdettiin liikkeelle aikaisempien kokeiden havainnoista, joissa entsyymi kiteytyy tarpeeksi korkeassa lämpötilassa. Aluksi näytti siltä, että lämpötilalla olisi suuri merkitys kiteytykseen. Lisäkokeiden jälkeen havaittiin, että kiteytyminen

on mahdollista myös huoneenlämpötilassa oikeassa pH:ssa ja suolapitoisuudessa. Loppujen lopuksi lämpötila ei tässä tapauksessa ollutkaan merkitsevä parametri. Myöskään siemennyksestä ei havaittu olevan tässä tapauksessa hyötyä kiteytyksessä. Kriittisiksi parametreiksi osoittautuivat pH ja suolapitoisuus.

Suurin laskennallinen kidesaanto, lähes 100 %, saadaan pH-välillä 7,1—7,6, kun suolapitoisuus on välillä 0,6—1,0 M tai pH-välillä 6,0—6,4, kun suolapitoisuus on 1 M. Tällöin käytännössä kaikki entsyymi saadaan kiteytymään. Tämä ei kuitenkaan välttämättä ole optimaalisin ratkaisu teollisessa mittakaavassa kiteytettävälle entsyymille. Pienempi kidesaanto saattaa olla taloudellisempi ratkaisu, kun esimerkiksi olosuhteiden säätöön (pH, suolapitoisuus) tarvittavia reagensseja tarvitaan vähemmän. Käytetyt reagenssit vaikuttavat myös jätevesikuormitukseen, jolloin myös prosessin ympäristöystävällisyyteen tulee kiinnittää huomiota. Kaiken kaikkiaan tulisi arvioida, onko maksimaalinen saanto järkevää kun kaikki ympäristö- ja taloudelliset tekijät otetaan huomioon.

Laskennallinen kidesaanto saadaan kiteytyskokeen 6 ja 7 liukoisuuskäyristä ja parhaimmillaan se on hyvin korkea, optimi-pH:ssa yli 90 % myös ilman merkittävää suolalisäystä. Tässä työssä tehtyjen havaintojen perusteella on selvää, että kiteiden liuottaminen talteenoton jälkeen tulisi tehdä alhaisessa pH:ssa, mutta tässä työssä ei ehditty tehdä suurempia panoskokeita ja varsinaisia kiteiden talteenottokokeita todellisen kidesaannon selvittämiseksi. Kokonaisaktiivisuusmääritysten perusteella kaikki kiteytetty aktiivisuus on liuotettavissa ainakin laimeana liuksena, mutta varsinaisten liuotusolosuhteiden etsimiseen ja jatkoformulointiin esimerkiksi väkevänä kidesuspensionä ei tässä työssä ollut varattu aikaa.

Insinöörityössä selvitetty kiteytymisolosuhteet eivät ole riittävät prosessia varten, vaan aihe vaatii vielä lisätutkimusta. Tulokset tarjoavat kuitenkin hyvän pohjan jatkotutkimuksille. Tässä työssä ei ehditty tutkimaan kaikkia suunniteltuja aiheita, sillä aikaa kului alun kiteytysongelmien lisäksi myös aktiivisuusanalyysin ongelmien selvittämisessä. Alun perin analyysin oli tarkoitus olla nopea työkalu aktiivisuuden määrittämiseen, mutta ilmenneiden ongelmien takia siihen täytyi panostaa suunniteltua enemmän aikaa. Seuraavia tutkittavia aihealueita voisivat olla esimerkiksi up-scaling-testaukset, kiteytyvyyden kinetiikka, kidekoon hallinta, reagenssien lisäysjärjestyksen ja sekoituksen merkitys ja fermentointiliemen esikäsitteilyn vaikutus kiteytykseen. Lisäksi kiteiden talteenotto-, liuotus- ja säilytyskokeet voisivat olla hyödyllisiä prosessin kehityksen kannalta.

Lähteet

- 1 Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I., von Weymarn, N. 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo: WSOY.
- 2 Fortelius, Carola & Pirkola Titta. 2012. Entsyymien ominaisuudet. Entsyymitekniikan kurssin luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 3 Turpeenoja, Leena. 1999. Biokemiaa virtsa-aineesta lääkemaitoon. Vantaa. Opetushallitus.
- 4 Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>>
- 5 Mechanism of Enzyme 2013, <<http://amazingbiotech.blogspot.fi/2013/11/mechanism-of-enzyme-action.html>> Luettu 10.1.2016.
- 6 Biotekniikka nyt ja tulevaisuudessa 2005. Verkkodokumentti. <http://www.btnk.fi/files/pdf/biotekniikka_nyt_ja.pdf> Luettu 25.9.2015.
- 7 Scopes, Robert K. 1993. Protein Purification: Principles and Practice (Third Edition). Springer Science & Business Media Inc., New York.
- 8 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2002. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman. Section 8.5, Enzymes Can Be Inhibited by Specific Molecules. Available from : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22530/>>
- 9 Aehle, Wolfgang. 2007. Enzymes in Industry: Production and Applications (Third, Completely Revised Edition). Wiley-VCH, Weinheim.
- 10 Enzyme Nomenclature 1992, päivitetty 2016. Verkkodokumentti. <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>> Luettu 15.3.2016
- 11 Heiskanen, Piia, Mankinen & Sini-Tuulia. 2004. Entsyymit teollisuudessa. Verkkodokumentti. <<http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineistot/entsyymit/teollisuus.html>> Luettu 10.03.2015.
- 12 Elintarvikeala hyödyntää entsyymejä monella tavalla. 2009 Verkkodokumentti. <<http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/40-elintarvikeala-hyodyntaa-entsyymeja-monella-tavalla>> Luettu 26.8.2015.

- 13 Schäfer, Thomas; Borchert, Torben Wedel; Nielsen, Vibeke Skovgard; Skagerlind, Peter; Gibson, Keith; Wenger, Kevin; Hatzack, Frank; Nilsson, Lone Dybdal; Salmon, Sonja; Pedersen, Sven; Heldt-Hansen, Hans Peter; Poulsen, Poul Børge; Lund, Henrik; Oxenbøll, Karen Margrethe; Wu, Gui Fang; Pedersen, Hanne Høst; Xu, Hui. *Industrial Enzymes. Adv Biochem Engin/Biotechnol* (2007) 105: 59—131. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- 14 Kirk, Ole; Borchert, Torben Vedel; Fuglsang, Claus Crone. *Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13: 345—351.
- 15 Lankinen, Pauliina; Savin, Antti & Timonen, Sari. *Entsyymien avulla suoritettava maidon juoksutus. Verkkodokumentti.*
<http://www.helsinki.fi/kemma/taydennyskoulutusmateriaali/Entsyymien_avulla_suoritettava_maidon_juoksutus.docx> Luettu 15.3.2016
- 16 Tietoa teknisistä entsyymeistä. Verkkodokumentti.<http://www.roal.fi/tuotteet_ja_osaaminen/tekstiientsyymit.html> Luettu 20.8.2015
- 17 Ducruix, A., Giege, R. 1992. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach.* Oxford University Press: New York.
- 18 McPherson, Alexander. 2004. *Introduction to protein crystallization. Methods* 34, 254—265.
- 19 Tavare, S. Narayan. 2013. *Industrial Crystallization: Process Simulation Analysis and Design.* Springer Science & Business Media Inc., New York.
- 20 Palmunen, Katja & Visuri, Kalevi. 2008. *Protein Crystallization. European Biopharmaceutical Review Autumn..*
- 21 Kuparisulfaatin kiteytys. Verkkodokumentti.
<<http://www.scienceprojectlab.com/growing-crystal.html>> Luettu 25.9.2015.
- 22 Wiseman, Alan. 1995. *Handbook of Enzyme Biotechnology (Third edition).* Englewood Cliffs : Prentice Hall.
- 23 *Introduction to protein crystallisation. Verkkodokumentti.*
<http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray_resources/whitepapers/xtal-in-action/node3.html> Luettu 20.3.2016
- 24 Bergfors, Terese M. 1999. *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips, A laboratory Manual.* International University Line: La Jolla, California
- 25 US 6207437. 2001. E. H. Gros, J. L. Gunefare. Patentti.

- 26 Työturvallisuus entsyymejä käyttävässä teollisuudessa. 1994. Verkkodokumentti. Työsuojelurahasto. <<http://www.tsr.fi/tutkimustietoa/tata-tutkitaan/hanke?h=91099>> Luettu 25.3.2015
- 27 Roal Oy:n perehdytys kesätyöhön ja työturvallisuuteen, Rajamäki. Suullinen ja kirjallinen tiedonanto toukokuu 2014.
- 28 Proxel LV preservative. Verkkodokumentti. <<http://www.ulprospector.com/en/asia/Cleaners/Detail/3371/109193/Proxel-LV-Preservative>> Luettu 25.3.2015
- 29 Palmunen, Katja. 2015. Formulaatiopäällikkö, Roal Oy, Rajamäki. Suullinen tiedonanto 17.4.2015.
- 30 SDS-PAGE. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/> Luettu 4.4.2015
- 31 Hiltunen, Salla. 2007. Proteiinien erotus ultrasuodatuksella. Tekniikan kandidaatintyö. Lappeenrannan teknillinen yliopisto.
- 32 Williams, M. Terry. The Mechanism of Action of Isothiazolone Biocides. Power-Plant Chemistry 2007, 9(1).

EK1-boksin mikroskopointikaavake

Mikroskopointikaavakkeessa merkinnät 0—10 päivän ajalta. Loput sarakkeet (C-D) seuraavalla sivulla.

Hanging Drop-kokeen EK1-boksi					
Box: EK1, osa 1/2		Microscopy notes:			
		N = nothing, clear drop			
		C = crystals (Cp = prism-like, Cr = rod-like, Cn = needles, Cs = sheet-like, Cb = bunches)			
Date: 5.12.2014		A = amorphous precipitation			
Temp: + 8 °C		G = gel (Gp= irregular gel particles, Gs = spherulites, Gc = gel particles with crystalline features)			
Sample: Entsyymi A		L = liquid phase separation (Le = emulsion, Lt = two main phases)			
~ 2,5 X konsentraatti					
Initial protein conc.:					
Drop:					
		Microscopy observation			
Well	Reagent	0 days	3 days	7 days	10 days
A1	0,5 % Na ₂ SO ₄	N	N	Todella pieniä partikkeleita?	N
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
A2	0,5 % Na ₂ SO ₄	Roskia dropissa?	N/roska	N/roska	N/roska
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
A3	0,5 % Na ₂ SO ₄	N	N	N	Le
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
A4	5 % NaCl	N	N	N	N
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
A5	5 % NaCl	N	N	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
A6	5 % NaCl	N	N	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
B1	2 % Na ₂ SO ₄	N	N	N	A
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
B2	2 % Na ₂ SO ₄	N	N	N	Le
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
B3	2 % Na ₂ SO ₄	N	N	N	N
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
B4	8 % NaCl	N	N	A, Gp	Le, pieniä erillisiä partikkeleita
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
B5	8 % NaCl	Roskia dropissa	Roskia dropissa	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
B6	8 % NaCl	Roskia dropissa?	Roskia dropissa?	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 5,6				

C1	3 % Na ₂ SO ₄	N	N	A, todella pieniä partikkeleita	A
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
C2	3 % Na ₂ SO ₄	N	N	N	N
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
C3	3 % Na ₂ SO ₄	N	N	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
C4	12 % NaCl	N	N	A, Gp	A/Gp
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
C5	12 % NaCl	N	N	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
C6	12 % NaCl	N	N	Le, A/Gp	Le
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
D1	5 % Na ₂ SO ₄	N	N	Le	N
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
D2	5 % Na ₂ SO ₄	N	N	Le	N
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
D3	5 % Na ₂ SO ₄	Roska	Roska	Le	Le
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
D4	15 % NaCl	N	Gp/Le	A/Gp	A/Gp
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
D5	15 % NaCl	N	Le / A keskellä	Le / A keskellä	Le, A keskellä
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
D6	15 % NaCl	N	A keskellä	Le, A, pieniä erillisiä partikkeleita keskellä	Le, A keskellä
	100 mM Na-acetate pH 5,6				

EK1-boksin mikroskopointikaavake 33—41 päivän merkinnöillä. Loput sarakkeet (C-D) seuraavalla sivulla.

Box: EK1, osa 2/2		Microscopy notes:			
Date: 5.12.2014		N = nothing, clear drop			
Temp: + 8 °C		C = crystals (Cp = prism-like, Cr = rod-like, Cn = needles, Cs = sheet-like, Cb = bunches)			
Sample: Entsyymi A		A = amorphous precipitation			
~ 2,5 X konsentraatti		G = gel (Gp= irregular gel particles, Gs = spherulites, Gc = gel particles with crystalline features)			
Initial protein conc.:		L = liquid phase separation (Le = emulsion, Lt = two main phases)			
Drop:		HUOM! 33 päivän jälkeen siirretty huoneenlämpöön.			
		Microscopy observation			
Well	Reagent	33 days	35 days	41 day	days
A1	0,5 % Na ₂ SO ₄	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
A2	0,5 % Na ₂ SO ₄	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
A3	0,5 % Na ₂ SO ₄	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
A4	5 % NaCl	N	Gp	Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
A5	5 % NaCl	Le	Le	Le, Gp?	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
A6	5 % NaCl	Le	Le	Le	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
B1	2 % Na ₂ SO ₄	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
B2	2 % Na ₂ SO ₄	Le	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
B3	2 % Na ₂ SO ₄	Le, A	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
B4	8 % NaCl	Le, Gp, A	Le, Gp, A	Le, Gp, A	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
B5	8 % NaCl	Gp	Gp, A?	Gp, A?	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
B6	8 % NaCl	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				

C1	3 % Na ₂ SO ₄	A/Gp	A, Gp	A/Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
C2	3 % Na ₂ SO ₄	A/Gp	A, Gp	A/Gp	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
C3	3 % Na ₂ SO ₄	Gp	Gp	Gp	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
C4	12 % NaCl	A, Gp	A, Gp	A, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
C5	12 % NaCl	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
C6	12 % NaCl	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
D1	5 % Na ₂ SO ₄	Gp	Gp	Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
D2	5 % Na ₂ SO ₄	Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
D3	5 % Na ₂ SO ₄	Le, Gp	Le, Gp	Le, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				
D4	15 % NaCl	A, Gp	A, Gp	A, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 3,8				
D5	15 % NaCl	A, Gp	A, Gp	A, Gp	
	100 mM Na-acetate pH 4,7				
D6	15 % NaCl	Le, A	Le, A	Le, A	
	100 mM Na-acetate pH 5,6				

Liukoisuuskoe 2:n ohje

Pestyjen kiteiden liukoisuus 0,2 M Na-K-fosfaattipuskurissa (nominal pH 6,5)+ 0,2 % Proxel LV-liuoksessa lämpötilan funktiona

Tehdään yksi isompi kideslurry, jota jaetaan 1,8 ml:n erissä eri lämpötiloihin inkuboitumaan 2 päiväksi, sekoitetaan aika ajoin putkia kääntelemällä: 7 ml pestyä kidesuspensiota + 140 µl 10 % Proxel LV-liuosta + 700 µl 4 M Na-K-fosfaattipuskuria pH 6,5 + 6,2 ml MQ-vettä, mitattu pH=6,61

Inkuboinnin jälkeen:

Kustakin putkesta otetaan totaalinäyte (esim. 800 µl) ja loput fuugataan mahdollisimman nopeasti liukoisuusnäytteenottoa varten (tarkoituu saada näyte mahdollisimman nopeasti ko. tutkittavassa lämpötilassa), mutta sen jälkeen kun liukoisuusnäyte otettu, sitä voi säilyttää kylmässä samoin kuin totaalinäytettäkin ennen analysointia (Aktiivisuus ja A280).

Koe	Inkubointilämpötila (°C)
1	20
2	28
3	37
4	40
5	45
6	50
7	55

Ei-pestyjen kiteiden liukoisuus 0,2 M Na-K-fosfaattipuskurissa (nominal pH 6,5)+ 0,2 % Proxel LV-liuoksessa lämpötilan funktiona

Aluksi 7 ml pestyä kidesuspensiota fuugataan niin että kiteet saadaan pohjalle ja suppi poistetaan mahdollisimman tarkasti, sen jälkeen kylmässä säilytettyä emäliuosta lisätään vastaava määrä kuin poistettua suppia eli tarkoitus saada 7 ml ns. ei-pestyä kidesuspensiota seuraavaa liukoisuustestiä varten

Tehdään yksi isompi kideslurry, jota jaetaan 1,8 ml:n erissä eri lämpötiloihin inkuboitumaan 2 päiväksi, sekoitetaan aika ajoin putkia kääntelemällä:

7 ml ns. ei-pestyä kidesuspensiota + 140 µl 10 % Proxel LV-liuosta + 700 µl 4 M Na-K-fosfaattipuskuria pH 6,5 + 6,2 ml kylmässä säilytettyä emäliuosta, mitattu pH=6,26

Inkuboinnin jälkeen:

Kustakin putkesta otetaan totaalinäyte (esim. 800 µl) ja loput fuugataan mahdollisimman nopeasti liukoisuusnäytteenottoa varten (tarkoituu saada näyte mahdollisimman nopeasti ko. tutkittavassa lämpötilassa), mutta sen jälkeen kun liukoisuusnäyte otettu, sitä voi säilyttää kylmässä samoin kuin totaalinäytettäkin ennen analysointia (vain Aktiivisuus).

Koe	Inkubointilämpötila (°C)
8	20
9	28
10	37
11	40
12	45
13	50
14	55

Pestyjen kiteiden liukoisuus 37C:ssa 0,2 % Proxel LV-liuoksessa Na-K-fosfaattipuskurin (nominal pH 6,5) pitoisuuden funktiona

Jokaiseen putkeen pipetoidaan aineita taulukon osoittama määrä ja mitataan pH. Inkuboidaan + 37C:ssa 2 päivää.

Inkuboinnin jälkeen:

Kustakin putkesta otetaan totaalinäyte (esim. 800 µl) ja loput fuugataan mahdollisimman nopeasti liukoisuusnäytteenottoa varten (tarkoituu saada näyte mahdollisimman nopeasti ko. tutkittavassa lämpötilassa), mutta sen jälkeen kun liukoisuusnäyte otettu, sitä voi säilyttää kylmässä samoin kuin totaalinäytettäkin ennen analysointia (Aktiivisuus ja A280).

Koe	Pestyä kidesuspensiota (µl)	10 % Proxel LV-liuosta (µl)	4 M Na-K-fosfaattipuskuria pH 6,5 (µl)	MQ-vettä (µl)	Mitattu pH
15	1000	20	5	975	6,8
16	1000	20	20	960	6,75
17	1000	20	50	930	6,67
18	1000	20	100	880	6,59
19	1000	20	200	780	6,51
20	1000	20	300	680	6,46
21	1000	20	500	480	6,41

A280-mittausten tulokset

Huom! Mittausta varten näytteet laimennettu välillä 1:50 ja 1:400, kuvaajia varten mit-
taustulos on kerrottu näytteen laimennoskertoimella.

Liukoisuuskoe 1			
Koenumero	pH	Kokonaisnäyte A280	Liukoinen näyte A280
1	3,35	0,459	0,67
2	3,53	0,445	0,276
3	3,89	0,444	0,364
4	4,97	0,418	0,237
5	6,42	0,408	0,196

Liukoisuuskoe 2				
Koenumero	T (°C)	Na-K-fosf.-pitoisuus (M)	Kokonaisnäyte A280	Liukoinen näyte A280
1	20	0	0,4	0,137
2	28	0	0,431	0,135
3	37	0	0,423	0,137
4	40	0	0,455	0,138
5	45	0	0,423	0,14
6	50	0	0,462	0,145
7	55	0	0,422	0,149
15	37	0,01	0,415	0,146
16	37	0,04	0,439	0,147
17	37	0,1	0,418	0,147
18	37	0,2	0,372	0,122
19	37	0,4	0,457	0,136
20	37	0,6	0,46	0,07
21	37	1	0,443	0,105

Kiteytyskoe 6:n ohje

Panoskiteytyskoesarja huoneenlämmössä eri Na-K-fosfaattipuskuripitoisuuksissa (nominal pH 7,5) (kiteytysaika 5 - 7 päivää keinutuksella)

Koe	3x konsentraattia (µl)	10 % Proxel LV-liuosta (µl)	MQ-vettä (µl)	4 M Na-K-fosfaattipuskuria pH 7,5 (µl)	Mitattu pH	Siemenkideslurra (µl)
panos 1	5000	100	4875	25	5,73	10
panos 2	5000	100	4800	100	6,81	10
panos 3	5000	100	4650	250	7,11	10
panos 4	5000	100	4400	500	7,25	10
panos 5	5000	100	3900	1000	7,4	10
panos 6	5000	100	3400	1500	7,47	10
panos 7	5000	100	2400	2500	7,61	10

Panoskiteytyskoesarja huoneenlämmössä eri Na-K-fosfaattipuskuripitoisuuksissa (nominal pH 6,5) (kiteytysaika 5 - 7 päivää keinutuksella)

Koe	3x konsentraattia (µl)	10 % Proxel LV-liuosta (µl)	MQ-vettä (µl)	4 M Na-K-fosfaattipuskuria pH 6,5 (µl)	Mitattu pH	Siemenkideslurra (µl)
panos 8	5000	100	4875	25	4,86	10
panos 9	5000	100	4800	100	6,1	10
panos 10	5000	100	4650	250	6,4	10
panos 11	5000	100	4400	500	6,45	10
panos 12	5000	100	3900	1000	6,44	10
panos 13	5000	100	3400	1500	6,42	10
panos 14	5000	100	2400	2500	6,38	10

Panoskiteytyskoesarja huoneenlämmössä eri Na-K-fosfaattipuskuripitoisuuksissa (nominal pH 5,0) (kiteytysaika 5 - 7 päivää keinutuksella)

Koe	3x konsentraattia (µl)	10 % Proxel LV-liuosta (µl)	MQ-vettä (µl)	4 M Na-K-fosfaattipuskuria pH 5,0 (µl)	Mitattu pH	Siemenkideslurra (µl)
panos 15	5000	100	4875	25	4,77	10
panos 16	5000	100	4800	100	4,33	10
panos 17	5000	100	4650	250	4,45	10
panos 18	5000	100	4400	500	4,55	10
panos 19	5000	100	3900	1000	4,58	10
panos 20	5000	100	3400	1500	4,54	10
panos 21	5000	100	2400	2500	4,39	10

Aktiivisuusanalyysin tulokset

Aktiivisuuden yksikkönä on käytetty aktiivisuusyksikköä grammaa näytettä kohti (U/g).

Lähtönäyte, emäliuos ja kiteytetty, konsentroimaton näyte	
Näyte	Aktiivisuus (U/g)
Kiteinen näyte (HCl)	412 116
Kiteinen näyte	336 950
Lähtönäyte (HCl)	2 601 887
Lähtönäyte	2 510 602
Emäliuos (HCl)	2 611 483
Emäliuos	2 566 322

Kiteytyskoe 6, osa 1/3				
Koe	Tutkittu Na-K-fosf. pitoisuus (M), nominal pH 7,5	Mitattu pH	Kokonaisnäytteen aktiivisuus (U/g)	Liukoisen näytteen aktiivisuus (U/g)
panos 1	0,01	5,73	1 445 881	693 449
panos 2	0,04	6,81	-	408 412
panos 3	0,1	7,11	-	218 854
panos 4	0,2	7,25	-	299 571
panos 5	0,4	7,4	-	117 091
panos 6	0,6	7,47	-	13 322
panos 7	1	7,61	1 280 995	7 236

Kiteytyskoe 6, osa 2/3				
Koe	Tutkittu Na-K-fosf. pitoisuus (M), nominal pH 6,5	Mitattu pH	Kokonaisnäytteen aktiivisuus (U/g)	Liukoisen näytteen aktiivisuus (U/g)
panos 8	0,01	4,86	1 362 770	1 261 321
panos 9	0,04	6,1	-	146 105
panos 10	0,1	6,4	-	141 525
panos 11	0,2	6,45	-	154 428
panos 12	0,4	6,44	-	265 846
panos 13	0,6	6,42	1 307 486	170 262
panos 14	1	6,38	1 399 274	21 742

Kiteytyskoe 6, osa 3/3				
Koe	Tutkittu Na-K-fosf. pitoisuus (M), nominal pH 5,0	Mitattu pH	Kokonaisnäytteen aktiivisuus (U/g)	Liukoisen näytteen aktiivisuus (U/g)
panos 15	0,01	4,77	1 400 878	1 465 823
panos 16	0,04	4,33	1 511 285	1 473 644
panos 17	0,1	4,45	1 498 939	1 460 478
panos 18	0,2	4,55	1 454 142	1 167 440
panos 19	0,4	4,58	1 339 124	999 474
panos 20	0,6	4,54	1 345 782	1 020 624
panos 21	1	4,39	1 299 455	342 463

Kiteytyskoe 7			
Koe	Mitattu pH	Kokonaisnäytteen aktiivisuus (U/g)	Liukoisen näytteen aktiivisuus (U/g)
EK2-7-1	5,3	2 282 032	1 226 156
EK2-7-2	6,26	-	282 883
EK2-7-2B	6,12	-	318 343
EK2-7-3	6,86	2 172 387	214 959
EK2-7-4	7,4	-	486 032
EK2-7-5	7,93	-	378 487
EK2-7-6	8,75	2 128 109	333 740