

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2014

Jenna-Miia Vuorenanen

PROTEIINIEN PUHDISTUS KAKSIFAASIUTOLLA HYDROFOBIINI-PROTEIININ AVULLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Kevät 2014 | 37 sivua

Ohjaajat: Petri Susi FT, Kaj Sjöblom FM

Jenna-Miia Vuorenanen

PROTEIINIEN PUHDISTUS KAKSIFAASIUUTOLLA HYDROFOBIINI-PROTEIININ AVULLA

Kaksifaasiuuttomenetelmät ovat vaihtoehto teollisuusmittakaavan proteiinien puhdistuksessa. Ne ovat edullisempia ja helpompia kuin monet perinteisesti käytetyt menetelmät. Vesi-detergenttikaksifaasiuuttoa on aikaisemmin käytetty hydrofobisten proteiinien puhdistuksessa, mutta viime aikoina on tutkittu mahdollisuutta käyttää menetelmää myös muiden proteiinien puhdistuksessa. Liittämällä kohdeproteiineihin pieni ja hydrofobinen hydrofobiini-niminen proteiini saadaan syntynyt fuusioproteiini puhdistettua käyttämällä vesi-detergenttikaksifaasiuuttoa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia kahden eri hydrofobiinin sisältävän fuusioproteiinin puhdistusta vesi-detergenttikaksifaasiuutolla. Tutkittavat fuusioproteiinit olivat lakkaasi-HFBI ja GOX-HFBI (glukoosioksidaasi-HFBI). Proteiineille suoritettiin uuttokokeita ja GOX-HFBI:n puhdistuksessa testattiin myös pH:n vaikutusta puhdistustulokseen. Opinnäytetyössä perehdyttiin myös lakkaasi-HFBI:n entsyymiaktiivisuuseritystapoihin ja tutkittiin mahdollisuutta käyttää lämpökäsittelyä esipuhdistusmenetelmänä lakkaasi-HFBI:n puhdistuksessa.

Tehtyjen testien perustella GOX-HFBI siirtyi vesi-detergenttikaksifaasiuutossa osittain detergenttirikkaaseen faasiin. Mediumnäytteellä saanto oli 26 % ja lyaattinäytteellä 39 %. Menetelmä vaatii kuitenkin vielä optimointia ennen kuin sitä voidaan käyttää puhdistuksessa isommassa mittakaavassa. Lakkaasi-HFBI:n ei havaittu siirtyvän detergenttirikkaaseen faasiin. Tämä voi selittyä mahdollisella fuusioproteiinin hajoamisella ennen uuttovaihetta.

ASIASANAT:

hydrofobiini, kaksifaasiuutto, proteiinipuhdistus, vesi-detergenttikaksifaasiuutto

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2014 | 37 pages

Supervisors: Petri Susi, Ph.D.; Kaj Sjöblom, M.Sc.

Jenna-Miia Vuorenalanen

AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION IN PURIFICATION OF PROTEINS BY HYDROPHOBIN FUSION PROTEIN TECHNOLOGY

Aqueous two-phase systems are one option in large scale protein purification. Aqueous two-phase systems are usually cheaper and easier than many conventional protein purification methods. Surfactant-based aqueous two-phase systems previously have been used for the purification of hydrophobic proteins. Recently, the suitability of these methods for the purification of other proteins has been studied. A small and hydrophobic "hydrophobin" protein is added to the target protein. The fusion protein can then be purified by surfactant-based aqueous two-phase extraction.

The purpose of this study was to purify two different hydrophobin containing fusion proteins by surfactant-based aqueous two-phase extraction. The studied proteins were laccase-HFBI and GOX-HFBI (glucose oxidase-HFBI). Extraction tests were carried out with both proteins. The influence of pH on the extraction system was studied with GOX-HFBI. In this study, the enzyme activity assay procedures of laccase-HFBI were investigated. The possibility of using heat treatment as a preliminary purification step for laccase-HFBI was also studied.

The tests show that GOX-HFBI was partially extracted in the surfactant-rich phase. The yield was 26 % when the medium sample was extracted and 39 % when the lysate sample was extracted. This method requires further optimization before it can be used in large scale purification. Laccase-HFBI was not extracted in the surfactant-rich phase. This may be due to the degradation of the fusion protein before the extraction step.

KEYWORDS:

aqueous two-phase separation, hydrophobin, protein purification, surfactant-based aqueous two-phase separation

SISÄLTÖ

LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 PROTEIINIEN PUHDISTUS KAKSIFAASIUUTOLLA	8
2.1 Polymeerien käyttöön perustuva kaksifaasiuutto	8
2.2 Ionisten nesteiden käyttöön perustuva kaksifaasiuutto	9
2.3 Pinta-aktiiviset aineet kaksifaasiuutossa	10
2.4 Triton X-114	10
3 HYDROFOBIINI	12
3.1 Hydrofobiini fuusiopartnerina	12
4 LAKKAASI	14
5 GLUKOOSIOKSIDAASI	15
6 TYÖN SUORITUS	16
6.1 Näytteiden esikäsittely	16
6.2 Lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuuden mittaaminen	17
6.3 Lakkaasi-HFBI:n puhdistus lämpökäsittelyllä	19
6.4 Vesi-detergenttikaksifaasiuutto	19
6.5 Uuttonäytteiden entsyymiaktiivisuuden mittaaminen	21
6.6 SDS-PAGE ja western blot	21
7 TULOKSET JA TARKASTELU	23
7.1 Inkubointiajan ja -lämpötilan vaikutus lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuuden määrittämisessä	23
7.2 Lämpökäsittely	24
7.3 Lakkaasi-HFBI:n uuttaminen kaksifaasimenetelmällä	27
7.4 Lakkaasi-HFBI:n tuotto fermentoimalla	29
7.5 GOX-HFBI:n puhdistus kaksifaasiuutolla	29
7.5.1 pH:n vaikutus kaksifaasiuuttoon	34
8 LOPPUPÄÄTELMÄT	35

LIITTEET

- Liite 1. Lakkaasi-HFBI -entsyymien tuottovektorin rakenne
- Liite 2. GOX-HFBI -entsyymien tuottovektorin rakenne
- Liite 3. Lakkaasi-HFBI:n mediumnäytteen lämpökäsittelyn tulokset
- Liite 4. Lakkaasi-HFBI:n lymfaattinäytteen lämpökäsittelytulokset
- Liite 5. Lakkaasi-HFBI -näytteiden kaksifaasiuuton tulokset
- Liite 6. GOX-HFBI -näytteiden kaksifaasiuuton tulokset

KUVAT

Kuva 1. Vesi-detergenttikaksifaasiuutto lasiputkessa	11
Kuva 2. Lakkaasi-HFBI:n kasvatusliuosnäytteiden spesifinen aktiivisuus eri inkubointilämpötiloissa	24
Kuva 3. Lakkaasi-HFBI:n mediumnäytteen lämpökäsittely	25
Kuva 4. Lakkaasi-HFBI:n lymfaattinäytteen lämpökäsittely	26
Kuva 5. Lakkaasi-HFBI-uuton kokonaisaktiivisuudet	27
Kuva 6. GOX-HFBI-uuton kokonaisaktiivisuudet	30
Kuva 7. GOX-HFBI -entsyymien tunnistaminen HFBI-vasta-aineella western blot -menetelmää käyttäen.	31
Kuva 8. GOX-HFBI -entsyymien tunnistaminen GOX-vasta-aineella western blot -menetelmää käyttäen.	32
Kuva 9. Hydrofobiinittoman GOX:n uuton tulokset	33
Kuva 10. pH:n vaikutus GOX-HFBI:n kaksifaasiuuttoon	34

TAULUKOT

Taulukko 1. Substraattien vertailu	28
------------------------------------	----

LYHENTEET

2,6-DMP	2,6-dimetoksifenoli
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
GOX	Glukoosioksidaasi
GOX-HFBI	GOX:n ja HFBI:n muodostama fuusioproteiini
HFBI	Hydrofobiini I, joka on <i>Trichoderma reesei</i> n ryhmään II kuuluva hydrofobiini
Lakkaasi-HFBI	Lakkaasin ja HFBI:n muodostama fuusioproteiini
PEG	Polyetyleeniglykoli
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (eng. phosphate buffered saline)
PVDF	Polyvinyylideenifluoridi
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaattiakryliamidigeelielektroforeesi

1 JOHDANTO

Kun proteiineja tuotetaan teollisuusmittakaavassa, tarvitaan halpoja ja yksinkertaisia puhdistusmenetelmiä. Perinteisesti proteiineja on puhdistettu muun muassa kromatografisin menetelmin, jotka ovat kalliita ja aikaa vieviä. Tarvetta on varsinkin menetelmille, joilla kohdeproteiini saadaan konsentroitua suuresta määrästä kasvatusliuosta helposti ja edullisesti. Tutkijat ovat pyrkineet löytämään parempia puhdistusmenetelmiä ja kiinnostuksen kohteena ovat muun muassa kaksifaasiuuttomenetelmät. Polymeerien käyttöön perustuvaa kaksifaasiuuttoa on tutkittu jo useita vuosikymmeniä ja sitä käytetään jonkin verran teollisissa sovelluksissa. Uudempia menetelmiä ovat ionisten nesteiden ja pinta-aktiivisten aineiden käyttöön perustuvat uuttomenetelmät.

Pinta-aktiiviset aineet ovat suhteellisen halpoja ja niitä löytyy monia erilaisia. Pinta-aktiiviset aineet soveltuvat erityisesti hydrofobisten proteiinien puhdistukseen erottamaan hydrofobisia kalvoproteiineja muista proteiineista. Viime aikoina on tutkittu mahdollisuutta käyttää menetelmää myös muiden proteiinien puhdistuksessa. Tämä tapahtuu liittämällä tuotettavaan proteiiniin pieni hydrofobinen "hydrofobiini"-niminen proteiini (HFBI), jonka ansiosta fuusioproteiini saadaan siirtymään detergenttirikkaaseen faasiin kaksifaasiuuttomenetelmässä (1).

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia pinta-aktiivisen aineen käyttöön perustuvaa kaksifaasiuuttoa kahden eri hydrofobiinin sisältävän fuusioproteiinin puhdistuksessa. Tutkittavat fuusioproteiinit olivat lakkaasi-HFBI ja glukoosioksidaasi-HFBI (GOX-HFBI). Fuusioproteiinit oli tuotettu *Pichia pastoris* -hiivassa fermentoimalla. Opinnäytetyössä perehdyttiin myös lakkaasi-HFBI:n entsyymiaktiivisuusmäärittystapoihin sekä tutkittiin mahdollisuutta käyttää lämpökäsittelyä esipuhdistusmenetelmänä kyseiselle entsyymille.

Opinnäytetyö tehtiin HydroBody-projektissa, joka on Turun ammattikorkeakoulun Liiketalous, ICT ja Bioalat -tulosalueella toimiva TEKES-rahoitteinen tutkimus- ja kehitysprojekti.

2 PROTEIINIEN PUHDISTUS KAKSIFAASIUTOLLA

Vesipohjainen kaksifaasiuutto soveltuu käyttäväksi proteiinien ja muiden biomolekyylien puhdistukseen, koska se on hellempi menetelmä kuin perinteinen orgaanisten liuottimien käyttöön perustuva kaksifaasiuutto. Tämä johtuu siitä, että molemmat faasit koostuvat pääasiassa vedestä. Vesipohjaisen kaksifaasiuuton neljä päätyyppiä ovat polymeeri-polymeerikaksifaasiuutto, polymeeri-suolakaksifaasiuutto, pinta-aktiivisten aineiden käyttöön perustuva kaksifaasiuutto sekä ionisten nesteiden käyttöön perustuva kaksifaasiuutto, joista kaksi jälkimmäistä ovat suhteellisen uusia menetelmiä (2). Tässä työssä on perehdytty Triton X-114 -nimisen pinta-aktiivisen aineen käyttöön perustuvaan kaksifaasiuuttoon.

2.1 Polymeerien käyttöön perustuva kaksifaasiuutto

Yleisimmin käytetyt ja eniten tutkitut menetelmät perustuvat kahden erilaisen polymeerin tai polymeerin ja suolan käyttöön. Kaksi faasia saadaan muodostumaan, kun kaksi rakenteellisesti erilaista polymeeriä liuotetaan veteen niiden kriittisen konsentraation yläpuolella. Kun pitoisuus on alle kriittisen konsentraation, polymeerit ovat liukoisia. Kun pitoisuus kasvaa yli kriittisen konsentraation, polymeerit alkavat muodostaa aggregaatteja, jotka muodostavat omat faasinsa. Toinen polymeeri on rikastunut yläfaasiin ja toinen alafaasiin. Sama ilmiö tapahtuu, kun käytetään yhtä polymeeriä sen kriittisen konsentraation yläpuolella korkeassa suolapitoisuudessa. Suolan ja polymeerin tapauksessa polymeeri on ylemmässä faasissa ja suola alemmassa. Proteiinit kulkeutuvat yleisesti ylemmään faasiin ja epäpuhtaudet jäävät alempaan faasiin. Olosuhteita muuttamalla saadaan kohdeproteiini myös erottumaan toisista proteiineista. Muutettavia olosuhteita ovat mm. polymeerien molekyylipaino, polymeerin pitoisuus, suolafasiin ioninvahvuus sekä pH (3).

Käytetyimmät polymeerit ovat polyetyleeniglykoli (PEG) ja dekstraani. Dekstraani on kuitenkin kallista eikä sitä ole järkevä käyttää suuremman mittakaavan

puhdistuksessa. Lisäksi dekstraanifaasin viskositeetti on korkea, mikä hankaloittaa dekstraanin käyttöä. Viime vuosina onkin kehitetty lukuisia uusia polymeerejä ja menetelmiä, joita on mahdollista käyttää kaksifaasiuutossa. Lisäksi kaksifaasiuuton selektiivisyyttä on pyritty parantamaan käyttämällä affiniteettiligandeja, jotka voivat olla joko vapaina tai kiinnitettynä toiseen polymeeriin (2).

Kahden polymeerin käyttöön perustuvassa uutossa hyödynnettäviä proteiinien ominaisuuksia ovat mm. niiden hydrofobisuus, pintavaraus ja bioaffiniteetti. Hydrofobisuus on näistä tärkein ominaisuus. Vaikka polymeerien käyttöön perustuva kaksifaasiuutto on luonteeltaan pääasiassa hydrofiilinen, kahden faasin välillä on hieman eroa hydrofobisuuksissa. Proteiinit kulkeutuvat yleisemmin hydrofobisempaan faasiin ja epäpuhtaudet jäävät hydrofiilisempaan faasiin (3).

Polymeerin ja suolan käyttö kaksifaasiuutossa on edullisempaa kuin kahden polymeerin käyttö. Menetelmällä on myös muita hyviä ominaisuuksia verrattuna kahdella polymeerillä tehtävään uuttoon: viskositeetti on matalampi, faasiutuminen tapahtuu nopeammin ja ionivahvuutta ja pH:ta pystytään säätämään helpommin. Yleisimmin käytetty polymeerin ja suolan yhdistelmä on PEG ja fosfaatti. Muita yleisesti käytettyjä suoloja on sitraatti ja sulfaatti (4).

2.2 Ionisten nesteiden käyttöön perustuva kaksifaasiuutto

Ionisten nesteiden käyttö proteiinien puhdistuksessa kaksifaasiuutolla on melko uusi menetelmä. Tässä menetelmässä veteen liuotetaan ionista nestettä ja suolaa, jolloin muodostuu kaksi faasia, joista ylempään faasiin on rikastunut ioninen neste ja alempaan faasiin suola. Uuton aikana proteiini siirtyy ylempään faasiin. Tämä menetelmä perustuu hydrofobisiin ja elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin sekä ulossuolaukseen. Uuttoon vaikuttaa ionisen nesteen rakenne ja ominaisuudet sekä käytetty suola. Lisäksi vaikuttavia tekijöitä ovat pH, lämpötila sekä proteiinien ominaisuudet, kuten niiden molekyyllipaino, hydrofobisuus ja pintavaraus (5).

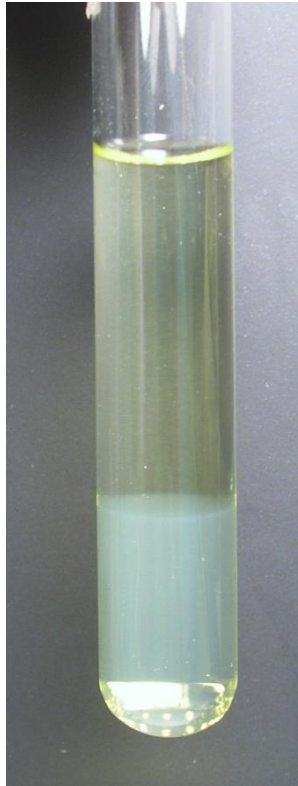
2.3 Pinta-aktiiviset aineet kaksifaasiuutossa

Pinta-aktiivisia aineita käytetään kaksifaasiuuttosovelluksissa erityisesti kalvo-proteiinien puhdistuksessa. Käytetyimmät aineet ovat ns. ei-ionisia detergenttejä, kuten Triton ja Tween. Markkinoilla on paljon erilaisia pinta-aktiivisia aineita, jotka on kehitetty biomolekyylien uuttamiseen. Pinta-aktiiviset aineet esiintyvät vesiliuoksessa monomeereinä niiden pitoisuuden ollessa alhainen. Pitoisuuden kasvaessa ns. kriittisen misellikonsentraation yläpuolelle alkaa muodostua misellejä. Pinta-aktiivisten aineiden käyttöön perustuva menetelmä perustuu sameutumispisteeseen, joka on lämpötila, jossa miselleistä alkaa muodostua suuria miselliaggregaatteja. Liuos muuttuu sameaksi ja faasit erottuvat toisistaan. Muodostuu detergenttirikas- ja detergenttiköyhäfaasi. Detergentistä riippuen detergenttirikasfaasi voi olla joko ylä- tai alafaasi. Tähän vaikuttaa detergentin tiheys ja ominaispaino verrattuna käytettävän puskurin ominaisuuksiin. Sameutumispisteen lämpötilaan voidaan vaikuttaa lisäämällä seokseen esimerkiksi glyserolia, erityisiä suoloja tai polymeerejä. Menetelmä perustuu lähinnä hydrofobisiin vuorovaikutuksiin. Detergenttimolekyylit ympäröivät hydrofobisen proteiinin, joka jää misellirakenteen sisään ja siirtyy detergenttirikkaaseen faasiin. Hydrofiiliset epäpuhtaudet jäävät detergenttiköyhään faasiin (6).

2.4 Triton X-114

Triton X-114 on polyetyleeniglykoli-*tert*-oktyylifenyylieetteri, jonka sameutumispiste on lähellä huoneenlämpötilaa (20 - 25 °C). Tätä alemmassa lämpötilassa Triton X-114 -molekyylit muodostavat pieniä misellejä. Lämpötilan noustessa sameutumispisteen yläpuolelle misellit kasvavat, jolloin ne laskeutuvat astian pohjalle muodostaen erillisen faasin. Triton X-114:n alhainen sameutumispiste mahdollistaa sen käytön proteiinien puhdistuksessa. Se onkin yleisimmin käytetty detergentti kaksifaasiuuttosovelluksissa, joissa halutaan erottaa hydrofobisia proteiineja hydrofiilisista proteiineista (7). Menetelmä on kehitetty vuonna 1980 (8). Kuvassa 1 on esitetty lasiputkessa tehty vesi-

detergenttikaksifaasiuutto, jossa detergenttinä on käytetty Triton X-114:a. Alempi faasi on detergenttirikasfaasi.



Kuva 1. Vesi-detergenttikaksifaasiuutto lasiputkessa

3 HYDROFOBIINI

Hydrofobiinit ovat pieniä rihmasienistä löydettyjä proteiineja, jotka ovat luonteeltaan hydrofobisia. Niillä on rooli rihmasienten rihmojen ja itiöemän muodostamisessa. Lisäksi niillä on merkitystä patogeenisten sienien pintavuorovaikutuksissa.

Rakenteellisesti erilaisia hydrofobiineja on löydetty suuri joukko. Aminohappojärjestys vaihtelee suuresti, mutta yhdistävänä tekijänä erilaisten hydrofobiinien välillä on kysteiinitähteiden jakaantuminen proteiinissa sekä hydrofobisten rakenteiden sijoittuminen. Hydrofobiinit sisältävät 8 kysteiiniaminohappoa, jotka muodostavat proteiinissa neljä disulfididosta. Hydrofobiineille tyypillistä on niiden tapa muodostaa proteiinikomplekseja. Hydrofobiinit voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden aminohapposekvenssin perusteella. Ryhmän I hydrofobiiniaggregaatit eivät liukene veteen eivätkä orgaanisiin liuottimiin. Ryhmän II hydrofobiiniaggregaatit ovat epävakaampia ja liukenevat 60 % etanoliin sekä 2 % SDS:ään. *Trichoderma reesei*n ryhmään II kuuluvat hydrofobiinit HFBI ja HFBIII ovat muodoltaan pyöreähköjä ja sisältävät melko suuren yhtenäisen hydrofobisen laikun, jonka takia ne ovat luonteeltaan amfifilisiä. Amfifilisyys näkyy siinä, että ne käyttäytyvät vesiliuoksissa pinta-aktiivisten aineiden tavoin ja huolimatta hydrofobisista laikuista, ne liukenevat veteen. Tässä työssä puhdistettaviin entsyymeihin on liitetty *Trichoderma reesei*n hydrofobiini I -proteiini (1).

3.1 Hydrofobiini fuusiopartnerina

Hydrofobiineja on puhdistettu käyttäen pinta-aktiivisiin aineisiin perustuvaa kaksifaasiuuttoa. Hydrofobiinit sulkeutuvat misellirakenteiden sisään ja kulkeutuvat detergenttirikkaaseen faasiin. Kun hydrofobiinia käytetään fuusiopartnerina, voidaan rekombinanttiproteiinin puhdistuksessa käyttää pinta-aktiivisiin aineisiin perustuvaa kaksifaasiuuttoa. Hydrofobiini saa koko fuusioproteiinin siirtymään detergenttirikkaaseen faasiin. Kaksifaasiuutto on suhteellisen halpa ja yksinker-

tainen menetelmä, joten sen käyttö suuren mittakaavan proteiinien puhdistuksessa voi olla kaupallisesti kannattavaa (1).

4 LAKKAASI

Lakkaasit ovat kuparia sisältäviä entsyymejä, jotka pystyvät hapettamaan fenolisia ja ei-fenolisia ligniiniyhdisteitä. Lakkaasia tuottavat eräät kasvit, sienet, hyönteiset ja bakteerit. Esimerkiksi sienistä on löydetty yli 100 erilaista lakkaasia. Lakkaasimolekyylit ovat dimeerisiä tai tetrameerisiä glykoproteiineja. Jokainen monomeeri sisältää yleensä 4 kupariatomia liittyneenä kolmeen hapetus-pelkistyspaikkaan.

Lakkaasia luonnollisesti tuottavat organismit tuottavat sitä liian vähän, jotta sitä voitaisiin hyödyntää kaupallisissa sovelluksissa. Käytettäessä heterologista systeemiä lakkaasia on onnistuttu tuottamaan tyydyttäviä määriä. Käytettyjä heterologisia isäntiä ovat mm. *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris* ja *Escherichia coli* (9).

Lakkaasia voidaan käyttää erilaisissa teollisuuden sovelluksissa. Sitä on hyödynnetty mm. paperiteollisuudessa ligniinin poistoon sellusta sekä tekstiiliteollisuudessa tekstiilien valkaisuun. Lakkaasia voidaan käyttää myös kontaminoituneen maaperän ja vesistöjen puhdistuksessa. Lakkaasin käytöstä teollisuudessa ollaan kiinnostuneita, koska sen avulla voidaan säästää energiaa, se on biodegravoitava ja ympäristöystävällinen vaihtoehto perinteisille menetelmille (9).

5 GLUKOOSIOKSIDAASI

Glukoosioksideasi (GOX) on dimeerinen glykoproteiini, joka katalysoi β -D-glukoosin hapettumista glukonihapoksi ja vetyperoksidiksi.

Glukoosioksideasia käytetään biolääketieteellisissä testisarjoissa sekä biosensoreissa, joita käytetään glukoosin havaitsemiseen lääketieteellisissä sovelluksissa sekä teollisuuden prosesseja tarkkailtaessa. Glukoosioksideasia voitaisiin käyttää myös elintarviketeollisuudessa poistamaan happea ja glukoosia ruoista ja juomista ja näin parantaa niiden säilyvyyttä.

Glukoosioksideasia luonnollisesti tuottavat organismit eivät pysty tuottamaan sitä riittävästä, jotta sitä voitaisiin hyödyntää kaupallisesti. Tämän johdosta entsyymiä tuotetaan heterologisissa systeemeissä. Tuottoisäntinä on yleisesti käytetty hiivoja (esim. *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae* ja *Pichia pastoris*) (10).

6 TYÖN SUORITUS

6.1 Näytteiden esikäsittely

Työssä käytetty lakkaasi-HFBI on fuusioproteiini, joka on tuotettu *P. pastoris*-sessa. Lakkaasi-HFBI -entsyymiä koodaava geeni on liitetty pPICZ A -plasmidiin (liite 1). Transformaatiossa kohdegeeni ja vektori ovat integroituneet osaksi *P. pastoris*en genomia. Käytetty lakkaasia koodaava geeni on peräisin *Trametes hirsutasta*.

GOX-HFBI on fuusioproteiini, joka on tuotettu *P. pastoris* -hiivassa. GOX-HFBI -entsyymiä koodaava geeni on liitetty *P. pastoris*en pPICZ A -vektoriin (liite 2), joka on sitten siirretty osaksi *P. pastoris*en genomia. Glukoosioksidaasia koodaava geeni on peräisin *Aspergillus niger* -homeesta.

Lakkaasi-HFBI ja GOX-HFBI -entyymit oli tuotettu fermentoimalla 5-6 l tilavuudessa. Fermentoinnin jälkeen solumassa ja kasvatusmedium oli erotettu toisistaan sentrifugoimalla ja näin saadut jakeet esikäsiteltiin ennen varsinaisia uutokokeita. Esikäsitteilyihin kuuluivat solujen hajotus ja kasvatusmediumin konsentroidi. Näytteitä esikäsiteltiin riittävän suuri määrä, jotta koko työn ajan käytettävänä olisi aina sama lähtönäyte. Näin pyrittiin varmistamaan tehtävien kokeiden keskinäinen vertailtavuus.

150 g lakkaasi-HFBI ja GOX-HFBI -solumassaa suspensoitiin 150 ml milli-Q-vettä. Solut hajotettiin French press -soluprässillä, jonka jälkeen solu-uute sentrifugoitiin ja supernatantti otettiin talteen.

Kasvatusmediumin proteiinipitoisuus oli liian alhainen, jotta sitä olisi suoraan voitu käyttää näytteenä tehtävissä testeissä. Kasvatusmedium konsentroidiin ultrasuodatuksella, jossa käytettävän kalvon cut-off oli 30 kDa. Tämä tarkoittaa, että 90 % tämän kokoisista molekyyleistä ei läpäise kalvoa. Yleensä käytetään kalvoa, jonka cut-off on puolet puhdistettavan molekyylin koosta. Lakkaasi-HFBI on kooltaan noin 73 kDa ja GOX-HFBI on kooltaan noin 83 kDa. Molemmista fermentoinneista otettiin 1 l mediumia, joka konsentroidiin pienempään tilavu-

teen. Lakkaasi-HFBI:n mediumnäyte konsentroidiin 250 ml:n tilavuuteen eli saatu näyte oli 4 kertaa konsentroidumpaa kuin alkuperäinen näyte. GOX-HFBI:n medium taas konsentroidiin 270 ml:n tilavuuteen, jolloin se oli 3,8 kertaa konsentroidumpaa.

6.2 Lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuuden mittaaminen

Lakkaasien on todettu hapettavan monia erilaisia substraatteja, mutta niiden spesifisyys eri substraatteja kohtaan vaihtelee. Eri isännissä tuotetut lakkaasit ovat ominaisuuksiltaan hieman erilaisia ja niiden substraattispezifisyys saattaa vaihdella. Tämän takia on erikseen tutkittava, mikä substraatti sopii parhaiten kyseiselle lakkaasille. Käytetyimmät substraatit lakkaasin entsyymiaktiivisuutta tutkittaessa ovat ABTS, 2,6-dimetoksifenoli (2,6-DMP), guaiakoli ja syringaldazine. ABTS ei ole lakkaasille luonnollinen substraatti, koska se ei ole fenolinen yhdiste. Muut mainitut substraatit ovat fenolisia yhdisteitä (9).

Tässä työssä perehdyttiin lakkaasi-HFBI -entsyymin entsyymiaktiivisuusmäärityksen toimivuuteen eri näytematriiseja käyttäen. Lakkaasi-HFBI:n entsyymiaktiivisuuden määrittämisessä ongelmana oli lymaattinäytteiden sakkaaminen mittauksen aikana, kun näytteitä oli inkuboitu 60 °C:ssa 15 min. Tämän takia työssä tutkittiin, auttaisiko matalamman lämpötilan käyttö näytteiden sakkaamiseen ja onko substraatin valinnalla vaikutusta tähän. Työssä tutkittiin siis inkubointilämpötilan ja -ajan vaikutusta entsyymiaktiivisuuteen, kun käytetään substraattina joko ABTS:ää tai 2,6-DMP:tä. Kun lakkaasi hapettaa ABTS:ää, hapetustuote on väriltään tumman vihreä. Väriin muodostusta voidaan seurata mittaamalla absorbanssia aallonpituudella 405 nm. 2,6-DMP:n hapetustuote taas on rusehtava ja väriin muodostusta voidaan seurata aallonpituudella 468 nm.

Lämpötilan ja inkubointiajan vaikutusta aktiivisuuteen tutkittiin neljässä eri lämpötilassa, kun substraattina käytettiin ABTS:ää. Näytteiden absorbanssi mitattiin Perkin-Elmer Wallacin VICTOR1-monileimalaskimella mittauksen alussa sekä 5 min välein aina 30 min asti. Inkubointilämpötilat olivat 60 °C, 50 °C, 37 °C ja 22 °C. Näytteinä oli aikaisemmin hajotetuista soluista saatu lymaattinäyte sekä

konsentroidu kasvatukseen. Näytteitä inkuboitettiin yön yli 5 mM kuparikloridiliuoksessa. Näytteet pipetoitiin kuoppalevyille. Kuoppalevyille lisättiin 100 mM meripihkahappoa (pH 5) ja 50 mM ABTS-liuosta. Reaktiossa meripihkahappopuskurin pitoisuus oli 90 mmol/l ja ABTS:n pitoisuus oli 5 mmol/l. Absorbanssi mitattiin 405 nm aallonpituudella.

Absorbanssimuutosten perusteella laskettiin näytteiden spesifinen aktiivisuus. Spesifisen aktiivisuuden laskemista varten tarvitaan absorbanssin muutoksen lisäksi proteiinipitoisuus reaktiossa, reaktioaika, molaarinen ekstinktiokerroin ϵ sekä kyvetin pituus. ABTS:n molaarinen ekstinktiokerroin aallonpituudella 405 nm on $38600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Kyvetin pituus tässä tapauksessa on nestekerroksen korkeus kuoppalevyllä eli 3 mm. Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Bradford-menetelmällä. Spesifinen aktiivisuus saadaan laskettua seuraavalla kaavalla:

$$\text{Spesifinen aktiivisuus } (\mu\text{kat/g}) = \frac{\text{absorbanssin muutos} * 10^6}{c * t * \epsilon * \text{kyvetin pituus}}$$

c = proteiinipitoisuus reaktiossa

t = reaktioaika sekunneissa

ϵ = molaarinen ekstinktiokerroin

Myöhemmin testattiin myös 2,6-DMP:n soveltuvuutta lakkaasi-HFBI:n entsyymiaktiivisuuden määrittämiseen. Näytteinä oli vesi-detergenttikaksifaasiuutosta saadut näytteet. Puskurina käytettiin 100 mM natriumasetaatipuskuria. 2,6-DMP:n pitoisuus reaktiossa oli 0,5 mmol/l. Väriin muodostusta seurattiin mittaamalla absorbanssia Shimadzu UV1800-spektrofotometrillä aallonpituudella 468 nm. Näytteitä inkuboitettiin mittausten välissä huoneenlämmössä. 2,6-DMP:n molaarinen ekstinktiokerroin aallonpituudella 468 nm on $27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (11). Proteiinipitoisuus mitattiin BCA-menetelmällä. Mittaus tehtiin kyvetissä, jonka pituus oli 1 cm.

6.3 Lakkaasi-HFBI:n puhdistus lämpökäsittelyllä

Lämpökäsittelyä voidaan käyttää yhtenä puhdistusmenetelmänä proteiineille, jotka kestävät korkeampia lämpötiloja. Se on yksinkertainen ja suhteellisen edullinen puhdistusmenetelmä, jolla on mahdollista saada melko hyviä puhdistustuloksia. Menetelmä perustuu siihen, että lämpökäsittely denaturoi lämpötilalle herkät proteiinit, jotka sakkautuvat ja ne voidaan poistaa näytteestä esimerkiksi sentrifugoimalla.

Työssä tutkittiin lakkaasi-HFBI:n puhdistamista lämpökäsittelyllä. Näytteinä käytettiin lyaattia ja konsentroitua mediumnäytettä. Lämpökäsittely tehtiin vesihautteella 20 - 80 °C:n lämpötiloissa 10 °C:n välein. Lisäksi määritettiin lämpökäsittelyajan vaikutus puhdistustulokseen. Eri lämpökäsittelyajat olivat 5 min, 10 min, 15 min ja 20 min. Lämpökäsittelyn jälkeen näytteet sentrifugoitiin mikrosentrifuugiputkissa ja supernatantti otettiin talteen. Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Bradford-menetelmällä. Entsyymiaktiivisuusmäärittämisessä käytettiin substraattina 5 mM ABTS ja näytteitä inkuboitiin 10 min 60 °C:ssa mittausten välissä.

6.4 Vesi-detergenttikaksifaasiuutto

Vesi-detergenttikaksifaasiuutossa on sovellettu VTT:llä kehitettyä menetelmää GFP-HFBI:n puhdistamiseksi kasvin lehdistä (12). Menetelmässä detergenttinä käytetään Triton X-114:aa ja puskurina käytetään PBS-puskuria. Puskurissa oleva näyte ja Triton X-114 sekoitetaan vorteksoimalla voimakkaasti, kunnes muodostuu tasakoosteinen seos. Triton X-114:aa voidaan käyttää pitoisuuksilla 2 - 10 %. Faasien erottuminen tapahtuu 24 °C lämpötilassa. Kun faasit ovat erottuneet, alempi faasi eli detergenttirikasfaasi, johon hydrofobiinin sisältävä fuusioproteiini on siirtynyt, otetaan talteen. Triton X-114 irrotaan näytteestä isobutanolin avulla. Isobutanolin määrä tulee olla noin 10-kertainen käytettyyn Triton X-114:n määrään verrattuna. Isobutanoli lisätään näytteen joukkoon ja näyte sekoitetaan voimakkaasti vorteksoimalla. Faasien annetaan taas erottua, jol-

loin ylempi faasi muodostuu isobutanolista ja Triton X-114:sta ja alempi faasi sisältää kohdeproteiinin vesiliuoksessa (12).

Työssä testattiin lakkaasi-HFBI:n ja GOX-HFBI:n puhdistusta kaksifaasiuutolla. Lakkaasi-HFBI:n tapauksessa uutto tehtiin alkuperäisen näytteen lisäksi myös lämpökäsitellylle näytteelle. Tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako lämpökäsittely kaksifaasiuuton tulokseen. Lämpökäsittely tehtiin lyaatti- ja mediumnäytteille 60 °C:n vesihauteella käsittelyajan ollessa 15 min.

Vesi-detergenttikaksifaasiuutto molemmille entsyymeille tehtiin 10 ml tilavuudessa, josta näytettä oli 1 ml. Puskurina toimi 2xPBS, jonka pH oli 7,4. Aikaisemmin oli selvitetty, että korkeampi suolapitoisuus parantaa faasiutumista. Triton X-114:n pitoisuus oli noin 4 m-%. Näytteitä vorteksoitiin kunnes oli muodostunut tasainen seos. Näytteet siirrettiin erotussuppiloina toimiviin 10 ml ruiskuihin. Faasien annettiin erottua 24 °C:ssa vesihauteella noin tunnin verran, jolloin oli muodostunut kirkkaat faasit. Faasit olivat muodostuneet jo 20 min jälkeen, mutta pitämällä näytteitä vesihauteella pidempään varmistuttiin siitä, että faasit olivat varmasti erottuneet kunnolla. Putkesta otettiin näytteet sekä ylä- että alafaasista entsyymiaktiivisuuden ja proteiinipitoisuuden määrittämistä varten. Alafaasi otettiin talteen ja sen joukkoon lisättiin 4 ml isobutanolia, jolla Triton X-114 irrotettiin näytteestä. Näytteet vorteksoitiin ja faasit erotettiin toisistaan sentrifugoimalla 15 ml sentrifugointiputkissa 2000 g, 10 min. Näyte otettiin talteen sekä ylä- että alafaasista.

Alustavien kokeiden perusteella GOX-HFBI näytti siirtyvän ainakin osittain detergenttifaasiin, minkä takia kaksifaasiuutto tehtiin uudelleen pH:n suhteen vaihtelevissa puskureissa. Työssä käytettiin seuraavia puskureita: 50 mM natriumasetaatipuskuri (pH 4), 50 mM natriumasetaatipuskuri (pH 5), 50 mM natriumfosfaattipuskuri (pH 6), 2xPBS (pH 7,4) ja 25 mM Tris-HCl -puskuri (pH 8). Puskureihin oli lisätty 274 mM natriumkloridia lukuun ottamatta 2xPBS-puskuria, jotta kaikkien puskurien natriumkloridipitoisuus olisi sama kuin 2xPBS-puskurissa.

Työssä käytettiin verrokkina pullokasvatuksessa tuotettua lakkaasia ja GOX:ia, joissa ei ollut kiinni hydrofobiinia vaan 6xhistidiinijuoste, joka koostuu kuudesta histidiini-aminohaposta. Lakkaasin tapauksessa uutto suoritettiin lämpökäsittelylle sekä käsittelemättömälle näytteelle.

6.5 Uuttonäytteiden entsyymiaktiivisuuden mittaaminen

Lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuus mitattiin käyttäen substraattina ABTS:ää ja 2,6-DMP:tä kuten aikaisemmin on kerrottu. Entsyymiaktiivisuuden laskemista varten tarvittava proteiinipitoisuus määritettiin BCA-menetelmällä.

GOX-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuus määrittäminen tehtiin käyttäen substraattina 50 mM glukoosia. Glukoosin hapettumista glukonihapoksi ja vetyperoksidiksi ei pystytä suoraan seuraamaan vaan tarvitaan piparjuuriperoksidaasia ja ABTS:ää. Piparjuuriperoksidaasi pelkistää vetyperoksidin vedeksi ja samalla ABTS hapettuu. Entsyymiaktiivisuuden määrittämiseksi lisättiin siis glukoosin lisäksi piparjuuriperoksidaasia 125 mU/μl sekä 0,9 mmol/l ABTS. Entsyymiaktiivisuusmäärittäminen tehtiin 50 mM natriumfosfaattipuskurissa, jonka pH oli 6,5. Absorbanssi mitattiin 405 nm aallonpituudella VICTOR1-monileimalaskimella. Määrittämisessä käytettiin standardeina kaupallista glukoosioksidiaasia, jonka aktiivisuus tiedettiin. Näin saatiin piirrettyä standardisuora, jonka avulla laskettiin näytteiden entsyymiaktiivisuus.

6.6 SDS-PAGE ja western blot

Uuttonäytteistä ajettiin SDS-PAGE värjäystä ja western blotia varten. Geelin värjäyksessä käytettiin Acqua Stain -väriä.

Western blotissa proteiinit siirrettiin geeliltä polyvinyylidienifluoridikalvolle (PVDF) sähkövirran avulla. Tämän jälkeen kalvo blokkattiin. Blokkauksessa käytettiin 5 % rasvatonta maitojauhetta. Blokkauksen tarkoituksena on estää vasta-ainetta tarttumasta suoraan kalvoon. Seuraavaksi kalvoa inkuboitettiin liuoksessa, joka sisälsi primääristä vasta-ainetta. Primäärin vasta-aineen tarkoituksena

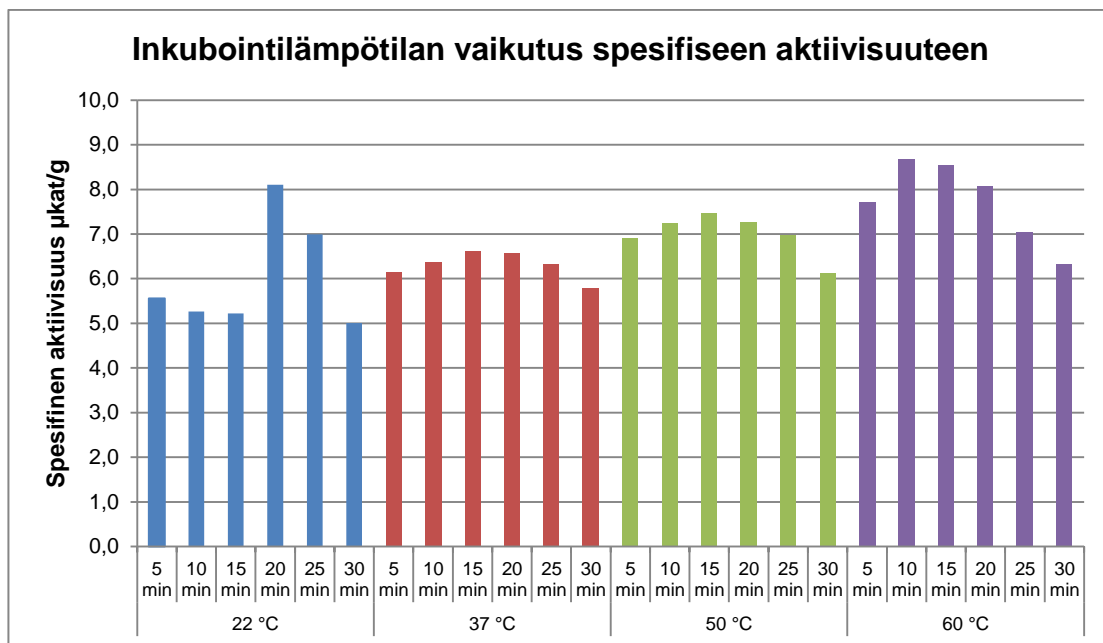
on tunnistaa kalvolta kohdeproteiinit. Primäärisenä vasta-aineena käytettiin HFBI-vasta-ainetta, joka oli tuotettu jäniksessä, kun näytteinä oli lakkaasi-HFBI- ja GOX-HFBI- näytteet. GOX-HFBI- näytteet tunnistettiin lisäksi myös GOX-vasta-aineella, joka oli tuotettu hiiressä. Sekundäärisenä vasta-aineena oli vuo-
hessa tuotettuja jäniksen ja hiiren vasta-aineet tunnistavia vasta-aineita, joihin oli liitetty alkalinen fosfataasi -entsyymi. Sekundäärinen vasta-aine tarttuu primääriseen vasta-aineeseen. Kalvoa inkuboitiin alkalisen fosfataasin substraatteja (BCIP ja NBT) sisältävässä liuoksessa, jolloin muodostui värireaktio. Näin saatiin näkymään vyöhykkeet, joihin primäärinen vasta-aine oli tarttunut.

7 TULOKSET JA TARKASTELU

7.1 Inkubointiajan ja -lämpötilan vaikutus lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuuden määrittämisessä

Työssä määritettiin paras inkubointilämpötila ja -aika lakkaasi-HFBI -entsyymin entsyymiaktiivisuusmäärittämisessä, kun substraattina oli ABTS. Määrittämisessä oli aiemmin ollut ongelmana lyaattinäytteiden sakkaaminen, joten haluttiin myös selvittää, olisiko inkubointilämpötilan alentamisella vaikutusta tähän.

Lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuusmäärittäminen tehtiin eri inkubointilämpötiloissa (22 °C, 37 °C, 50 °C, 60 °C) ja eri inkubointiajoilla (5, 10, 15, 20, 25 ja 30 min) käyttäen substraattina ABTS:ää. Inkubointilämpötilalla ei näyttänyt olevan merkitystä sakan muodostumiseen. Lyaattinäytteiden kohdalla kuoppalevyille muodostui sakkaa reaktion aikana, mikä haittaa absorbanssin mittaamista eivätkä tulokset ole luotettavia. Tästä johtuen lyaattinäytteiden tuloksia ei esitetä. Kuvassa 2 on esitetty lakkaasi-HFBI:n mediumnäytteen spesifinen aktiivisuus, kun näytettä on inkuboitu entsyymiaktiivisuusmäärittämisajan aikana eri lämpötiloissa.

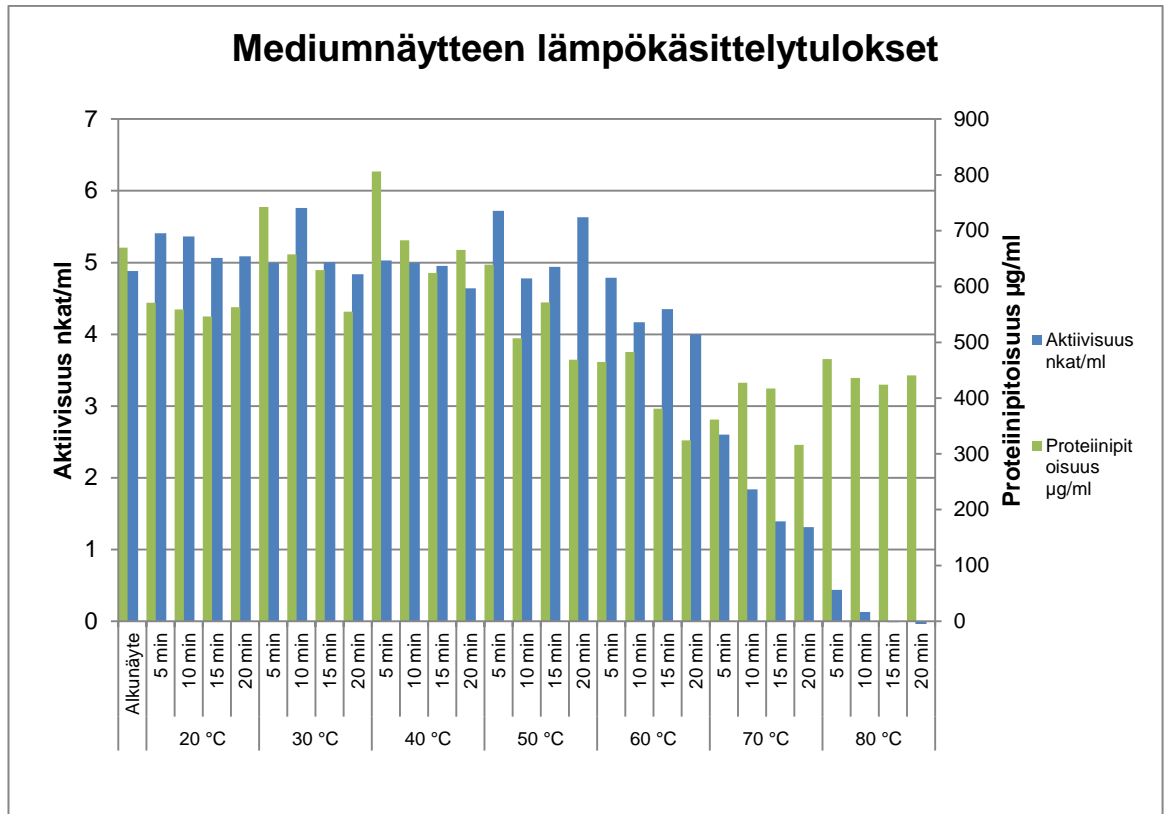


Kuva 2. Lakkaasi-HFBI:n kasvatusliuosnäytteiden spesifinen aktiivisuus eri inkubointilämpötiloissa

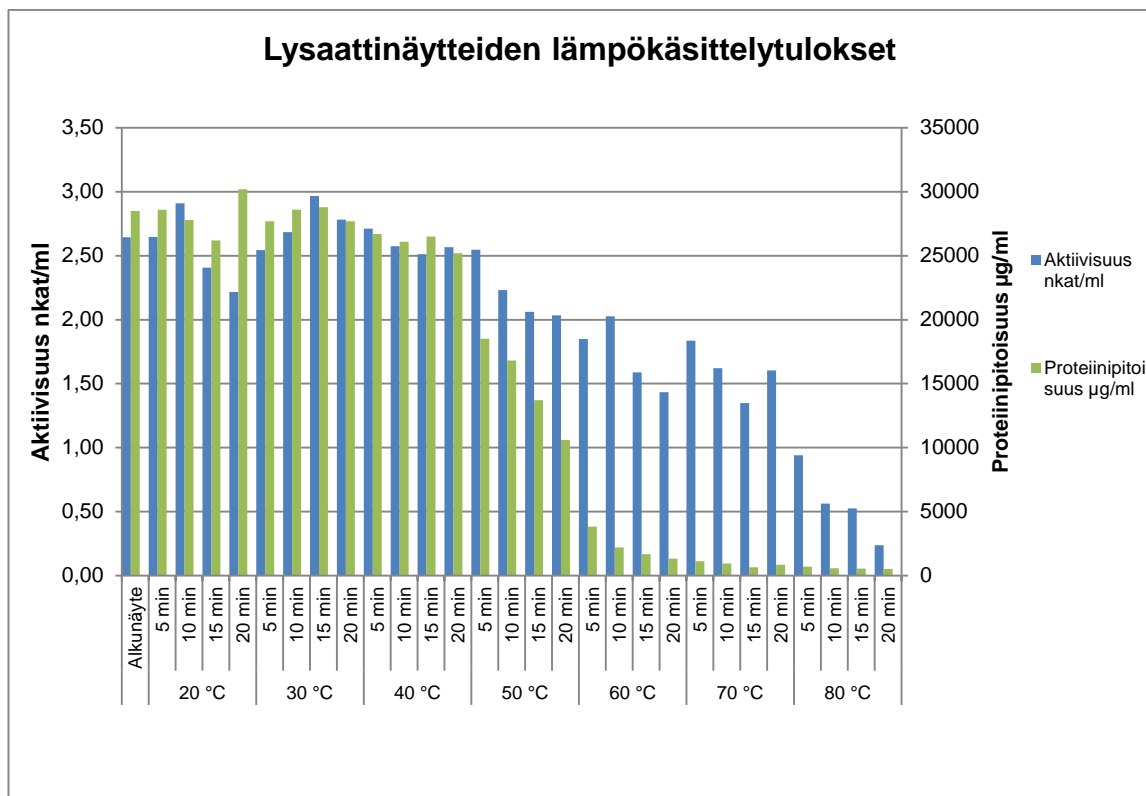
Kuvaajasta näkee, että spesifinen aktiivisuus on suurin, kun inkuboidaan näytteitä 60 °C:ssa inkubointiajan ollessa 10 min. Tulosten perusteella siis lakkaasi-HFBI:n entsyymiaktiivisuusmäärittämisessä parhaimman tuloksen saa, kun näytteitä inkuboidaan 60 °C:ssa 10 min. Tämän jälkeen entsyymiaktiivisuusmääritykset suoritettiin käyttäen tätä lämpötilaa ja inkubointiaikaa.

7.2 Lämpökäsittely

Lämpökäsittely on halpa ja nopea tapa esipuhdistaa proteiineja, joten työssä testattiin lakkaasi-HFBI -entsyymien puhdistusta lämpökäsittelyllä. Lämpökäsittely suoritettiin eri lämpötiloissa (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ja 80 °C) sekä käytettiin eri käsittelyaikoja (5, 10, 15 ja 20 min).



Kuva 3. Lakkaasi-HFBI:n mediumnäytteen lämpökäsittely



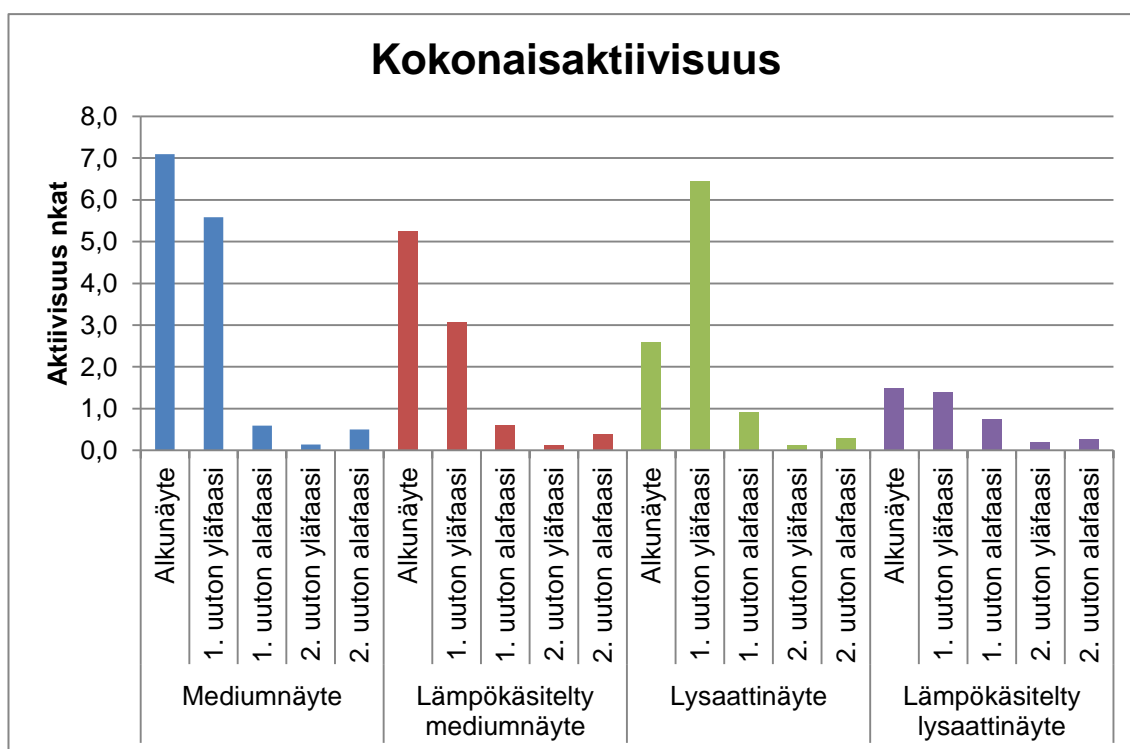
Kuva 4. Lakkaasi-HFBI:n lysaattinäytteen lämpökäsittely

Kuvissa 3 ja 4 on esitetty lämpökäsittelyn tulokset. Tarkemmat tulokset löytyvät taulukoituna liitteistä 3 ja 4.

Kuvaajista näkee, että aktiivisuus alkaa laskea 50 - 60 °C:n asteen kohdalla, joten lämpökäsittelyä ei ole järkevää tehdä tätä korkeammassa lämpötilassa. Kasvatusliuosnäytteen proteiinipitoisuus ei laske juurikaan, mutta lysaattinäytteen kohdalla proteiinipitoisuus alkaa laskea rajusti, kun nostetaan lämpötila 50 °C:een tai sen yläpuolelle. Kasvatusliuosnäytteen puhtauteen lämpökäsittelyllä ei siis ole juurikaan vaikutusta. Lysaattinäytteessä proteiineja alkaa denaturoitua, kun nostetaan lämpötila 50 °C:een. Myös aktiivisuus alkaa alentua tässä lämpötilassa. Kun näyte käsitellään 50 °C:ssa 20 min, saadaan 62 % proteiineista poistettua ja aktiivisuudesta on jäljellä 76 %. Kun lämpötila nostetaan 60 °C:een, saadaan 86 % proteiineista poistettua 5 min lämpökäsittelyllä. Tällöin aktiivisuudesta on jäljellä 70 %. Vaikka lakkaasiaktiivisuus alkaa alentua näissä lämpötiloissa, lämpökäsittelyä esipuhdistuksena kannattaa harkita, koska näin saadaan suurin osa ei-toivotuista proteiineista poistettua näytteestä.

7.3 Lakkaasi-HFBI:n uuttaminen kaksifaasimenetelmällä

Kaksifaasiuutto suoritettiin lämpökäsitellyille ja käsittelemättömille lakkaasi-HFBI -näytteille. Tarkoituksena oli selvittää, siirtyykö lakkaasi-HFBI uutossa Triton X-114 -faasiin ja voidaanko näin ollen kaksifaasiuuttoa käyttää apuna lakkaasi-HFBI:n puhdistuksessa. Lisäksi haluttiin nähdä, vaikuttaako esipuhdistus lämpökäsitellyllä uuton tuloksiin. Kuvassa 5 on esitetty eri faaseihin siirtynyt aktiivisuus. Lukuarvot löytyvät taulukoituna liitteestä 5.



Kuva 5. Lakkaasi-HFBI-uuton kokonaisaktiivisuudet

Kuten kuvasta 5 havaitaan, että suurin osa aktiivisuudesta siirtyy Triton X-114 -uutossa yläfaasiin ja saanto alafaasiin on hyvin alhainen. Isobutanoliuuton jälkeen alafaasin saanto vaihteli 7 %:sta 18 %:tiin. Huonoin saanto oli mediumnäytteen uutossa ja paras saanto saatiin, kun uutettiin lämpökäsitelty lysaattinäyte. Näytteistä tehtiin myös western blottaus HFBI-vasta-aineella. Vasta-aine ei tunnistanut kalvolta proteiinia. Tämä yhdessä kaksifaasiuutossa saadun alhaisen saannon kanssa viittaa siihen, että hydrofobiini on mahdollisesti irronnut lakkaasista tuoton aikana. Lakkaasilla, joka on tuotettu ilman hydrofobiinia, kak-

sifaasiuuton tulos oli hyvin samankaltainen eli aktiivisuutta siirtyi uutossa hie-
man myös Triton X-114 -faasiin. Tämä kertoo sen, että kaksifaasiuutto ei ole
mitenkään täysin spesifinen menetelmä, joka varmasti erottaisi hydrofobiset
proteiinit hydrofiilisista.

Lakkaasi-HFBI -näytteiden entsyymiaktiivisuus määritettiin myös käyttäen sub-
straattina 2,6-DMP:tä, koska haluttiin selvittää olisiko 2,6-DMP soveltuvampi
substraatti käytettäväksi entsyymiaktiivisuusmäärittämisessä. Taulukossa 5 on
vertailtu eri substraattien avulla määritettyä spesifistä aktiivisuutta.

Taulukko 1. Substraattien vertailu

	Näyte	2,6-DMP Spesifinen aktiivisuus nkat/g	ABTS Spesifinen aktiivisuus nkat/g
Mediumnäyte	Alkunäyte	0,395	663,25
	1. yläfaasi	0,370	649,62
	2. alafaasi	0,178	345,75
Lämpökäsitelty me- diumnäyte	Alkunäyte	0,328	608,99
	1. yläfaasi	0,359	375,20
	2. alafaasi	0,157	284,45
Lysaattinäyte	Alkunäyte	0,016	66,04
	1. yläfaasi	0,052	186,61
	2. alafaasi	0,017	103,23
Lämpökäsitelty lysaat- tinäyte	Alkunäyte	0,002	76,04
	1. yläfaasi	0,098	232,74
	2. alafaasi	0,024	101,09

Taulukosta havaitaan, että spesifinen aktiivisuus käytettäessä 2,6-DMP:tä sub-
straattina on huomattavasti pienempi kuin, jos substraattina on ABTS. ABTS:n
kanssa ongelmana oli sakan muodostuminen määrittäessä lysaattinäytteen
aktiivisuutta. Sama ongelma ilmeni, kun käytettiin 2,6-DMP:tä. Lisäksi 2,6-
DMP:n kanssa määrittäminen tulee tehdä kyveteissä, kun taas ABTS-määrittäminen
pystytään tekemään kuoppalevyllä. Kyveteissä tapahtuva mittaus on työläämpi, joten
on kaikin puolin järkevintä jatkaa ABTS:n käyttöä substraattina.

7.4 Lakkaasi-HFBI:n tuotto fermentoimalla

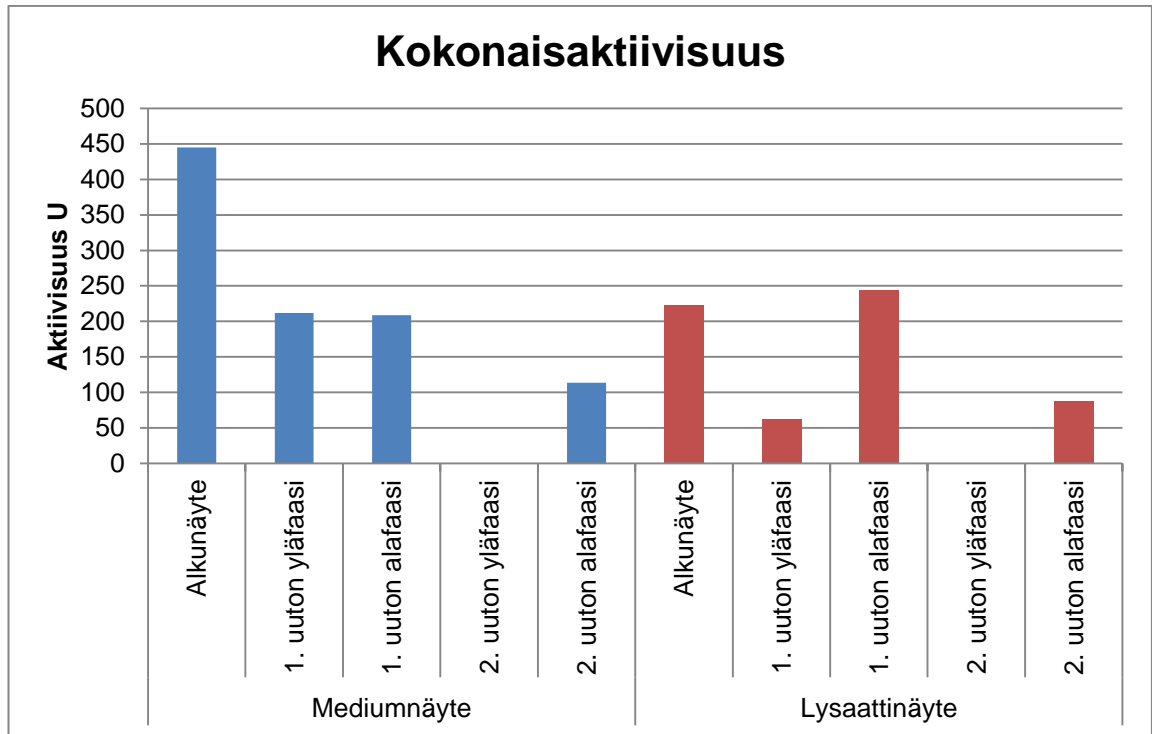
Konsentroidussa mediumnäytteessä aktiivisuus oli 4,88 nkat/ml, kun proteiinipitoisuuden määrittämisessä oli käytetty Bradford-menetelmää. Aktiivisuus litraa kohden oli siis 4,88 μ kat/l. Kun otetaan huomioon konsentrintikerroin, saadaan tulokseksi 1,22 μ kat/l eli 73 U/l.

Lysaattinäytteessä aktiivisuus oli 2,64 nkat/ml eli noin 2,64 nkat/g märkäsolumassaa. Tämä vastaa 158 mU/g märkäsolumassaa.

Kun otetaan huomioon, että litrassa fermentointilientä on noin 400 g soluja ja 600 ml kasvatusliuosta, saadaan kasvatuksesta tuotoksi noin 117 U/l.

7.5 GOX-HFBI:n puhdistus kaksifaasiuutolla

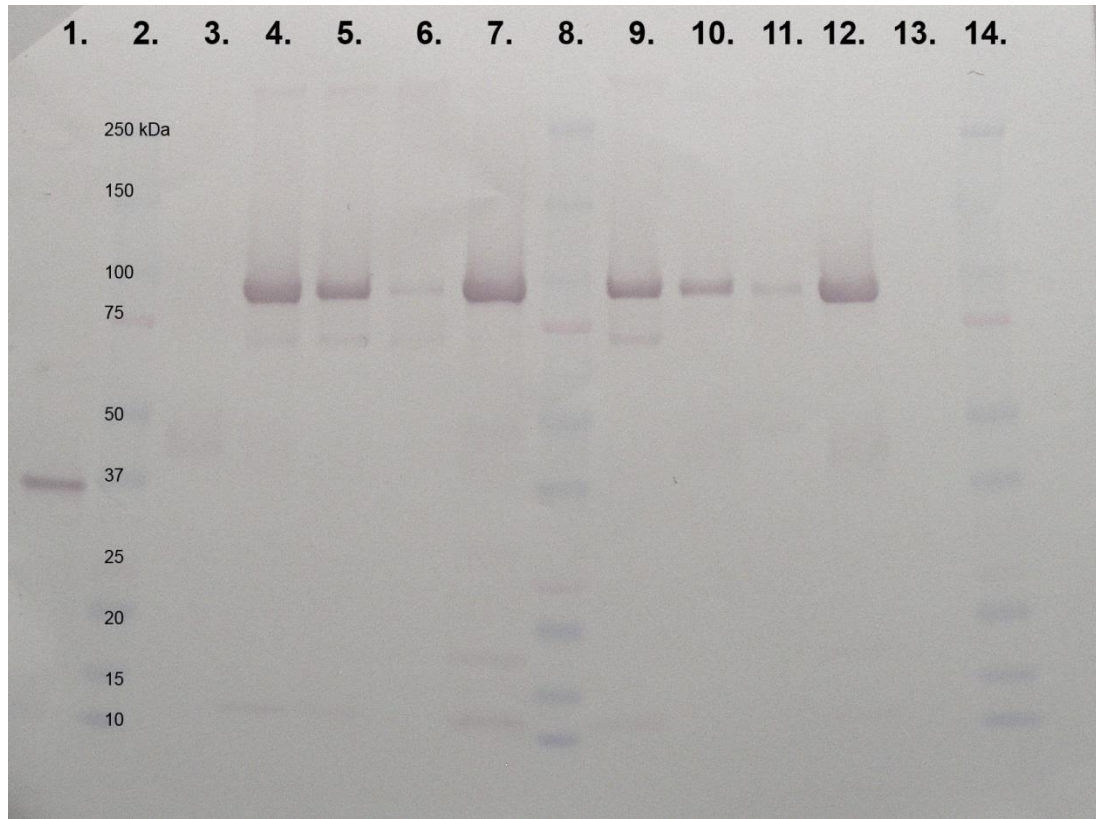
Työssä testattiin GOX-HFBI:n siirtymistä uutossa Triton X-114 -faasiin. Kuvassa 6 on esitetty uuton eri faasien kokonaisaktiivisuudet. Tulokset löytyvät lukuarvoina liitteestä 6.



Kuva 6. GOX-HFBI-uuton kokonaisaktiivisuudet

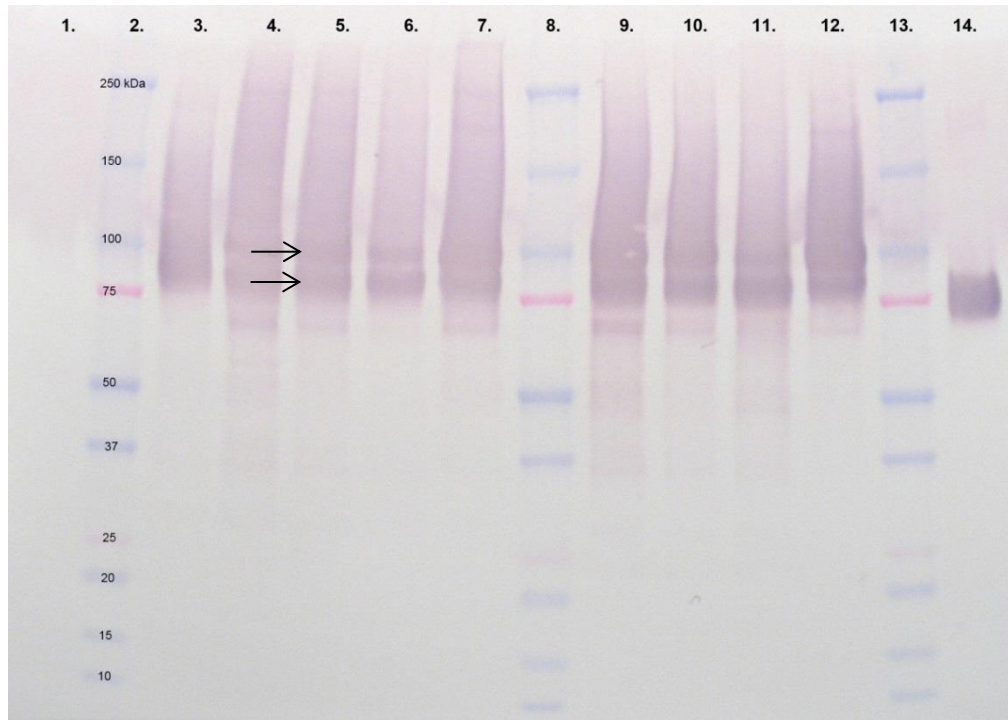
Kuvasta 6 havaitaan, että GOX-HFBI siirtyy osittain detergenttifaasiin eli aktiivisuutta löytyy myös 2. uuton eli isobutanoliuuton alafaasista. Mediumnäytteen saanto oli 26 % ja lysaattinäytteen saanto oli 39 %. Saanto on alhainen, mutta menetelmää ei ole optimoitu GOX-HFBI:n puhdistamiseksi, joten olosuhteita muuttamalla voi olla mahdollista saavuttaa parempia tuloksia. Menetelmän kapasiteettia ei myöskään ole määritetty. Huono saanto voi osittain johtua myös liian suuresta näytemäärästä.

Uuttonäytteistä tehtiin myös western blot HFBI- ja GOX-vasta-aineilla (Kuvat 7 ja 8).



Kuva 7. GOX-HFBI -entsyymin tunnistaminen HFBI-vasta-aineella western blot -menetelmää käyttäen.

Kaivo 1. HFBI positiivinen kontrolli, 2. markkeri, 3. HFBI negatiivinen kontrolli, 4. mediumnäytteen alkunäyte (laimennos 1/20), 5. mediumnäytteen alkunäyte (laimennos 1/40), 6. mediumnäytteen 1. uuton yläfaasi, 7. mediumnäytteen 2. uuton alafaasi, 8. markkeri, 9. lyaattinäytteen alkunäyte (laimennos 1/40), 10. lyaattinäytteen alkunäyte (laimennos 1/80), 11. lyaattinäytteen 1. uuton yläfaasi, 12. lyaattinäytteen 2. uuton alafaasi, 13. GOX positiivinen kontrolli, 14. markkeri.



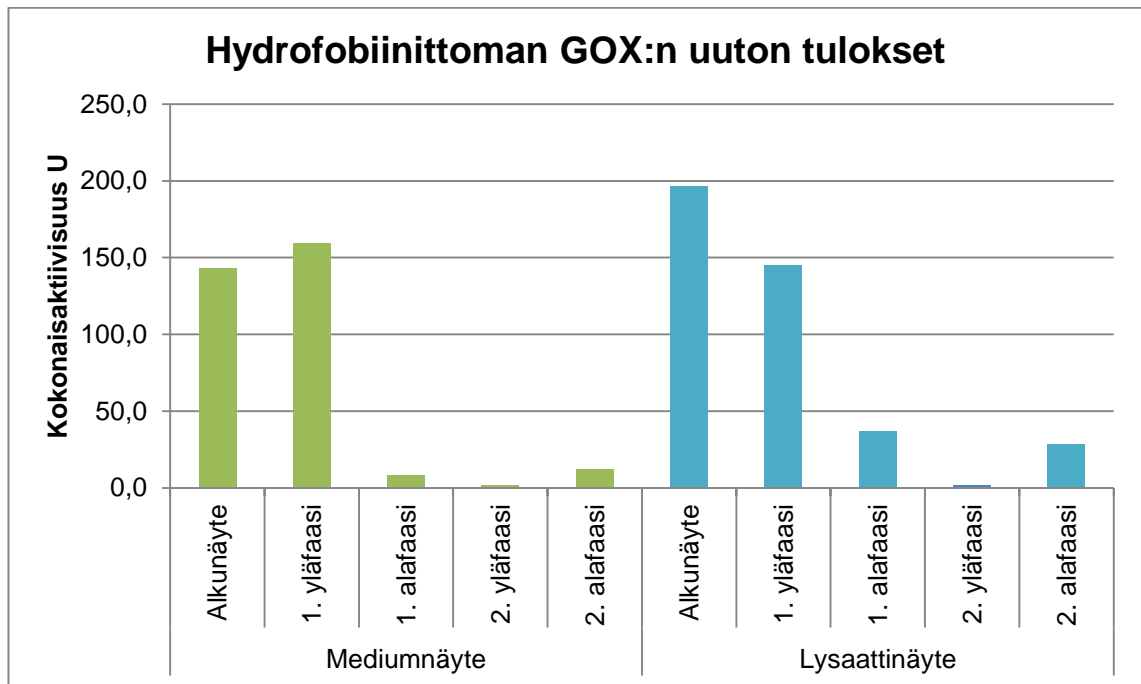
Kuva 8. GOX-HFBI -entsyymin tunnistaminen GOX-vasta-aineella western blot -menetelmää käyttäen.

Kaivo 1. HFBI positiivinen kontrolli, 2. markkeri, 3. HFBI negatiivinen kontrolli, 4. mediumnäytteen alkunäyte (laimennos 1/40), 5. mediumnäytteen alkunäyte (laimennos 1/80), 6. mediumnäytteen 1. uuton yläfaasi, 7. mediumnäytteen 2. uuton alafaasi, 8. markkeri, 9. lyaattinäytteen alkunäyte (laimennos 1/40), 10. lyaattinäytteen alkunäyte (laimennos 1/80), 11. lyaattinäytteen 1. uuton yläfaasi, 12. lyaattinäytteen 2. uuton alafaasi, 13. markkeri, 14. GOX positiivinen kontrolli.

Kuvassa 7 näkyy, että HFBI-vasta-aine tarttuu isobutanoliuuton alafaasista otettuun näytteeseen. GOX-HFBI on kooltaan noin 83 kDa, joten HFBI-vasta-aine näyttäisi tunnistavan oikean proteiinin. Hydrofobiini siis pystyy siirtämään fuusioproteiinin detergenttifaasiin. Huono saanto selittyy osittain GOX-HFBI -fuusion hajoamisena (kuva 8). Kuvassa on western blottaus GOX-vasta-aineella tehtynä. Western blottauksessa GOX-vasta-aineella tulee näkyviin kaksi vyöhykettä, joista ylemmässä on luultavasti kiinni hydrofobiini ja alemmassa ei. Hydrofobiini näyttäisi osittain irtoavan GOX:sta joko tuoton aikana tai heti sen jäl-

keen. Tämä näkyy myös kuvassa 7, jossa noin 10 kDa:n kohdalla näkyy himmeä vyöhyke, johon HFBI-vasta-aine on tarttunut.

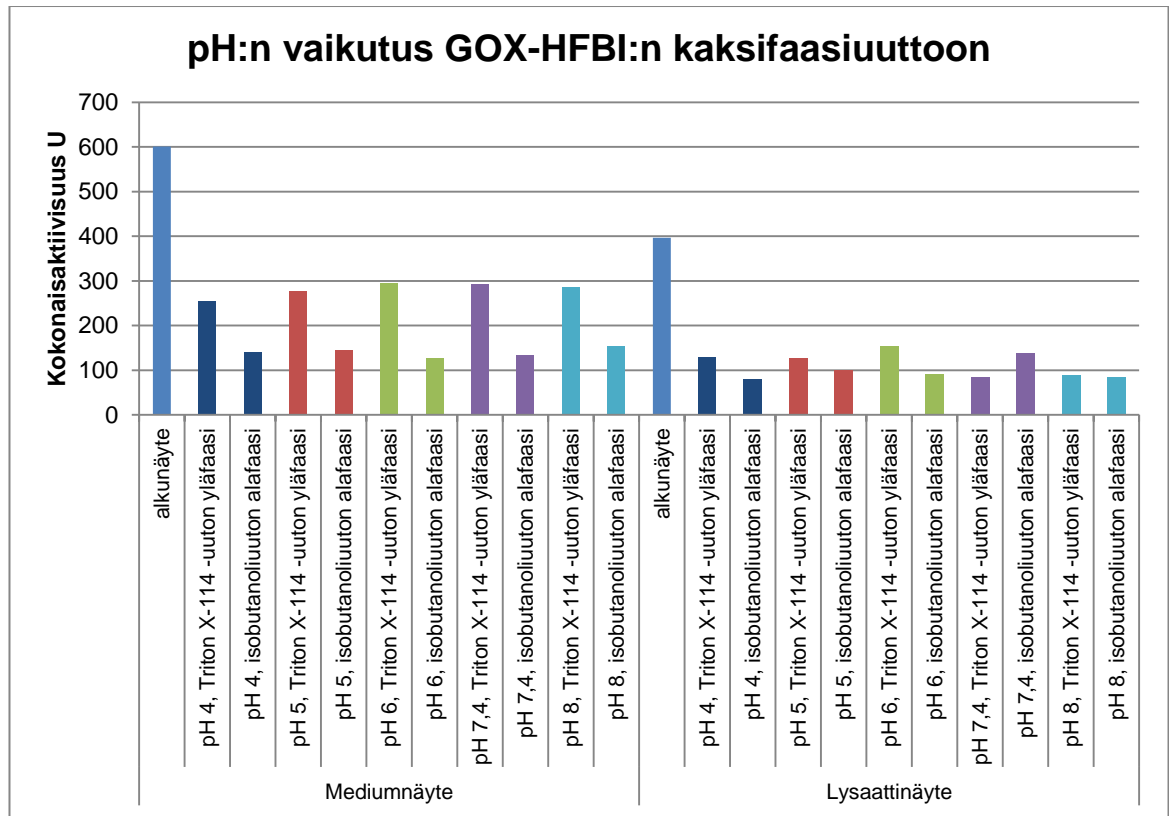
Kun uutto tehtiin GOX-näytteelle, joka ei sisältänyt hydrofobiinia, saantoprosentit olivat huomattavasti alhaisempia kuin GOX-HFBI:lle suoritetussa uutossa (kuva 9). Mediumnäytteellä saanto oli 8,5 % ja lysaattinäytteellä 14,4 %. Tämä kertoo siitä, että GOX-HFBI siirtyy detergenttifaasiin hydrofobiinin ansiosta eikä johtuen GOX:n ominaisuuksista.



Kuva 9. Hydrofobiinittoman GOX:n uuton tulokset

7.5.1 pH:n vaikutus kaksifaasiuuttoon

Haluttiin selvittää, onko puskurin pH:lla vaikutusta uuton tulokseen.



Kuva 10. pH:n vaikutus GOX-HFBI:n kaksifaasiuuttoon

Kuvasta 10 näkee, että pH:lla ei ole kovinkaan suurta vaikutusta kaksifaasiuuton tulokseen. Mediumnäytteellä paras saanto (25,6 %) saatiin detergenttifaaasiin, kun käytettiin puskuria, jonka pH oli 8. Lysaattinäytteelle paras pH taas oli 7,4, tällöin saanto oli 34,6 %. Kun käytettiin puskureita, joiden pH oli 4 ja 5, uuton aikana muodostui sakkaa.

8 LOPPUPÄÄTELMÄT

Lakkaasi-HFBI:n puhdistaminen vesi-detergenttikaksifaasiuutolla ei onnistunut. Syynä tähän voi olla hydrofobiinin irtoaminen fuusioproteiinista kasvatuksen aikana. Ongelmana voi olla, että linkkerialueen aminohapposekvenssi on altis proteaasien toiminnalle. Ratkaisuna tähän ongelmaan olisi proteaasi-inhibiittorien lisääminen kasvatusliuokseen kasvatuksen aikana sekä jälkikäsitelyssä. Lisäksi voisi kokeilla aminohapposekvenssin muokkausta ja mahdollisesti poistaa linkkerialue kokonaan, mikäli hydrofobiinia ei ole tarpeellista poistaa lopputuotteesta.

GOX-HFBI siirtyi osittain Triton X-114 -faasiin uuton aikana. Alhainen saanto selittyy tässäkin tapauksessa fuusioproteiinin hajoamisella. Western blottaus -kalvoja vertailtaessa (kuvat 7 ja 8) huomataan, että HFBI-vasta-aine tarttuu yhteen selkeään vyöhykkeeseen, jonka koko on noin 80 kDa, kun taas GOX-vasta-aine tunnistaa kalvolta kaksi vyöhykettä. Osassa fuusioproteiineista hydrofobiini on vielä kiinni, mutta osasta se on irronnut. Lisäksi HFBI-vasta-aine tunnistaa noin 10 kDa kokoisen proteiinin, joka on fuusioproteiinista irronnut hydrofobiini (kuva 7).

Jatkokokeiden kannalta olisi tärkeää selvittää, mistä fuusioproteiinin hajoaminen johtuu ja voitaisiinko se estää esimerkiksi proteaasi-inhibiittoreilla. Tällöin voitaisiin suunnitella uusia fuusiogeenejä, jotka mahdollistaisivat fuusioproteiinin tuoton ja puhdistamisen.

Kaksifaasiuuttoa voisi kokeilla myös puskureilla, joissa on eri suolapitoisuus. Suolapitoisuus vaikuttaa faasien muodostumiseen, joten olisi järkevä testata, miten se vaikuttaa näytteen kanssa tehtävään uuttoon. Jatkossa voisi kokeilla myös erilaisia detergentejä. Markkinoilla on kuitenkin paljon erilaisia kaksifaasiuuttoon soveltuvia detergentejä (6) ja jotkin niistä voisivat soveltua Triton X-114:a paremmin HFBI-fuusioproteiinien puhdistamiseen kaksifaasiuutolla. Uuton kapasiteetti olisi myös hyvä selvittää testaamalla uuttoa eri detergenttipitoisuuksilla ja eri näytemäärillä.

Isobutanolin ja Triton X-114:n vaikutusta mittausten ja samalla tulosten luotettavuuteen kannattaisi myös tutkia. Isobutanoli ja Triton X-114 voivat haitata entsyymiaktiivisuuden sekä proteiinipitoisuuden määrittämisessä tapahtuvia reaktioita ja näin aiheuttaa väärän tuloksen, kun mitataan näytteiden absorbanssia. Molempien reagenssien vaikutusta mittaustulokseen voisi tutkia lisäämällä näytteen joukkoon eri määriä reagensseja. Kun näytteen aktiivisuus ja proteiinipitoisuus ennen reagenssin lisäämistä tiedetään, nähdään, onko isobutanolilla tai Triton X-114:lla vaikutusta mittaustulokseen.

Kun vertaillaan fermentoimalla saatua lakkaasi-HFBI:n tuottoa (117 U/l), tuotto on hyvin pieni verrattuna raportoituihin alkuperäisisännän *Trametes hirsutan* tuottoihin. *T. hirsutan* kanssa on saavutettu jopa 31786 U/l tuotto, kun *T. hirsutasta* on kasvatettu appelsiininkuorta sisältävässä mediumissa (13). Yleensä heterologista tuottoisäntää käytetään, koska alkuperäisisännän tuotto on liian alhainen kaupallisiin tarkoituksiin. Tässä tapauksessa ei ole onnistuttu saamaan parempaa tulosta. Fermentointia optimoimalla on kuitenkin mahdollista saavuttaa huomattavasti korkeampia tuottotasoja.

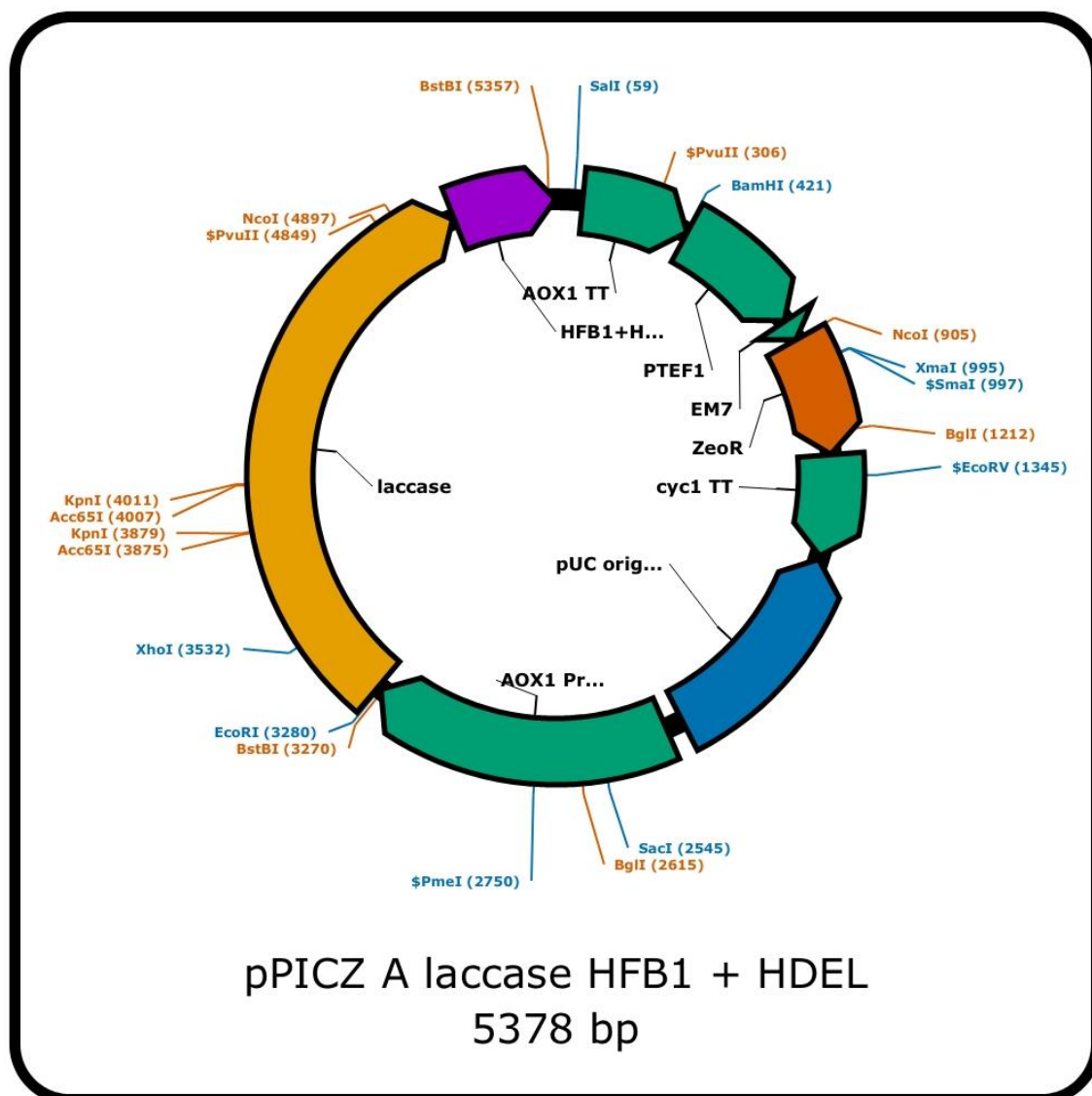
GOX-HFBI:n tuotto fermentoinnilla oli 159000 U/l. Myös tässä tapauksessa jäädään alkuperäisisännän *A. nigerin* raportoidusta tuotosta. Kun *A. nigeria* kasvatettiin 30 l fermentorissa, glukoosioksidaasin aktiivisuus oli jopa 850 U/ml eli 850000 U/l (14).

Tehdyt fermentoinnit olivat vasta ensimmäisiä testifermentointeja, joilla tuotettiin riittävästi näytettä uuttokokeita varten. Kasvatusolosuhteita muuttamalla on mahdollista saavuttaa huomattavasti suurempia tuottotasoja. Ennen kuin voidaan todeta, ettei *P. pastoriksessa* pystytä tuottamaan tyydyttäviä määriä näitä rekombinanttiproteiineja, tulee suorittaa erilaisia kasvatustestejä myös fermentorimittakaavassa.

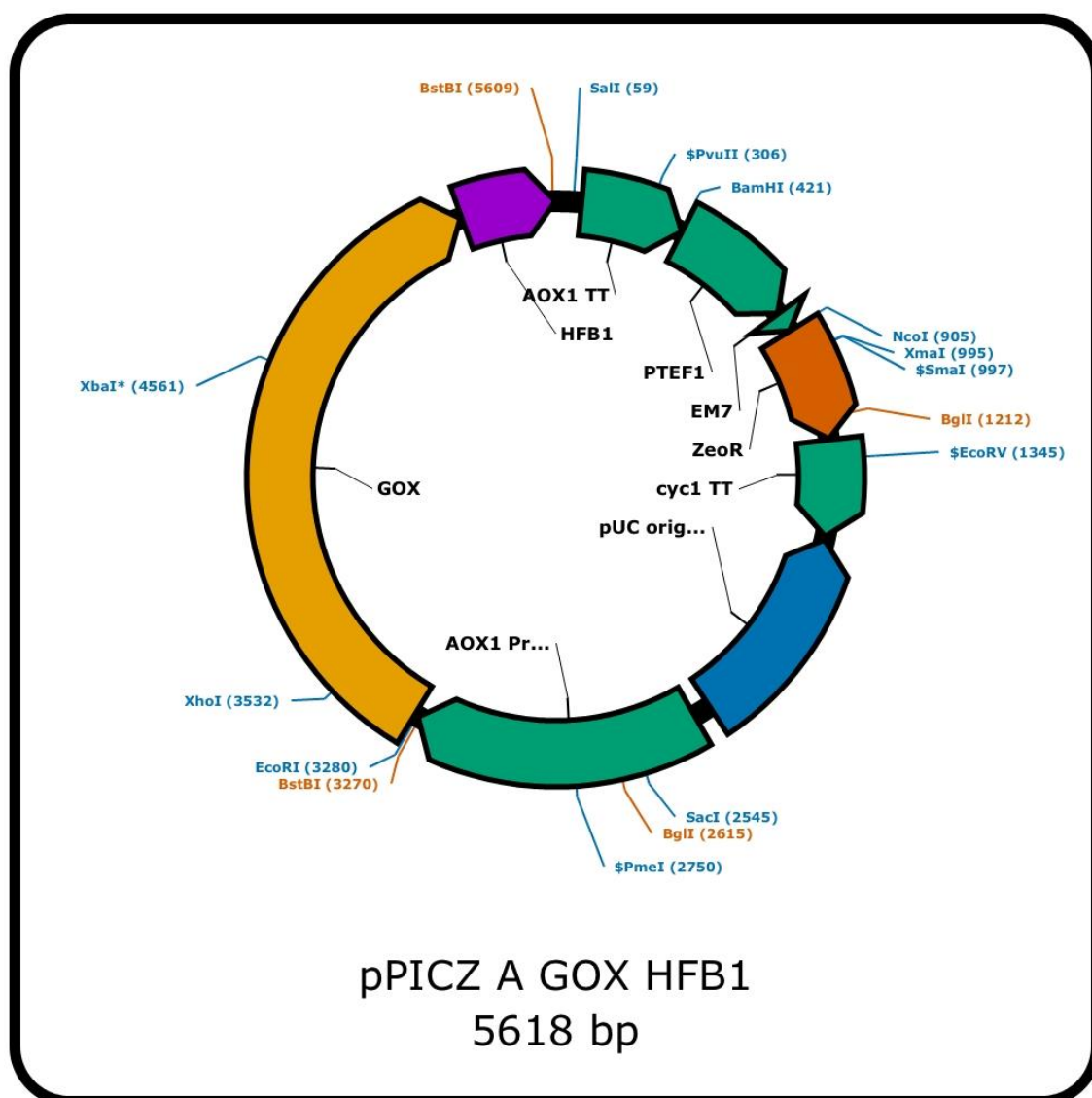
LÄHTEET

- 1 Lahtinen, T.; Linder M.B.; Nakari-Setälä T. ja Oker-Blom C. (2008). Hydrophobin (HFBI): A potential fusion partner for one-step purification of recombinant proteins from insect cells. *Protein Expression & Purification*, 59, 18-24.
- 2 Liu Y.; Yu Y.L.; Chen M.Z. ja Xiao X. (2011). Advances in aqueous two-phase systems and applications in protein separation and purification. *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology*, Vol.2, No. 2.
- 3 Asenjo A. ja Andrews B. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A*, 1218, 8826-8835.
- 4 Kavakçioğlu B. ja Tarhan L. 2013. Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems. *Separation and Purification Technology*, 105, 8-14.
- 5 Pei Y.; Wang J.; Wu K.; Xuan X. ja Lu X. 2009. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Separation and Purification Technology*, 64, 288-295.
- 6 Arnold T. ja Linke D. 2007. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *BioTechniques*, 43, 427-440.
- 7 González L. ja Alfaro B.L. 2009. Separation of membrane proteins according to their hydrophobicity by serial phase partitioning with Triton X-114. *Analytical Biochemistry*, 387, 280-286.
- 8 Bordier C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 256, No. 4, 1604-1607.
- 9 Kunamneni A.; Plou F.J.; Ballesteros A. ja Alcalde M. 2008. Laccases and their applications: A patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2, 10-24.
- 10 Crognale S.; Pulci V.; Brozzoli V.; Petruccioli M. ja Federici F. 2006. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1230-1235.
- 11 Galhaup C.; Goller S. Peterbauer C.K.; Strauss J. ja Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 148, 2159-2169.
- 12 Joensuu J.J.; Conley A.J.; Linder M.B. ja Menassa R. 2012. Bioseparation of recombinant proteins from plant extraction with hydrophobin fusion technology. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 824.
- 13 Rosales E.; Rodríguez Couto S. ja Sanromán M.A. 2007. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1286-1290.
- 14 Kona R.P.; Qureshi N. ja Pai J.S. 2001. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 78, 123-126.

Lakkaasi-HFBI -entsyymin tuottovektorin rakenne



GOX-HFBI -entsyymin tuottovektorin rakenne



Lakkaasi-HFBI:n mediumnäytteen lämpökäsittelyn tulokset

	Lämpökäsittelyaika	Proteiinipitoisuus µg/ml	Spesifinen aktiivisuus µkat/g	Aktiivisuus nkat/ml
Alkunäyte	5 min	669,7	7,29	4,88
20 °C	10 min	570,7	9,48	5,41
	15 min	558,6	9,61	5,37
	20 min	546,5	9,27	5,07
	5 min	562,6	9,04	5,09
30 °C	10 min	742,5	6,73	5,00
	15 min	657,6	8,76	5,76
	20 min	629,3	7,95	5,00
	5 min	554,5	8,73	4,84
40 °C	10 min	806,1	6,24	5,03
	15 min	682,9	7,32	5,00
	20 min	624,3	7,94	4,95
	5 min	665,7	6,97	4,64
50 °C	10 min	639,4	8,94	5,72
	15 min	507,0	9,43	4,78
	20 min	571,7	8,64	4,94
	5 min	468,7	12,01	5,63
60 °C	10 min	464,6	10,31	4,79
	15 min	482,8	8,63	4,17
	20 min	380,8	11,42	4,35
	5 min	324,2	12,34	4,00
70 °C	10 min	361,6	7,20	2,60
	15 min	427,2	4,30	1,84
	20 min	417,1	3,34	1,39
	5 min	316,1	4,15	1,31
80 °C	10 min	469,7	0,93	0,44
	15 min	436,3	0,29	0,13
	20 min	424,2	-0,03	-0,01
	5 min	440,4	-0,13	-0,06

Lakkaasi-HFBI:n lysaattinäytteen lämpökäsittelytulokset

	Lämpökäsittelyaika	Proteiinipitoisuus µg/ml	Spesifinen aktiivisuus µkat/g	Aktiivisuus nkat/ml
Alkunäyte	5 min	28500	0,093	2,64
20 °C	10 min	28600	0,093	2,65
	15 min	27800	0,105	2,91
	20 min	26200	0,092	2,41
	5 min	30200	0,073	2,22
30 °C	10 min	27700	0,092	2,54
	15 min	28600	0,094	2,68
	20 min	28800	0,103	2,97
	5 min	27700	0,100	2,78
40 °C	10 min	26700	0,102	2,71
	15 min	26100	0,099	2,57
	20 min	26500	0,095	2,51
	5 min	25200	0,102	2,57
50 °C	10 min	18500	0,138	2,55
	15 min	16800	0,133	2,23
	20 min	13700	0,151	2,06
	5 min	10600	0,192	2,03
60 °C	10 min	3828	0,483	1,85
	15 min	2187	0,926	2,03
	20 min	1667	0,953	1,59
	5 min	1327	1,079	1,43
70 °C	10 min	1107	1,658	1,84
	15 min	947	1,712	1,62
	20 min	647	2,085	1,35
	5 min	847	1,892	1,60
80 °C	10 min	699	1,346	0,94
	15 min	561	1,003	0,56
	20 min	532	0,986	0,52
	5 min	508	0,464	0,24

Lakkaasi-HFBI -näytteiden kaksifaasiuuton tulokset

	Näyte	Tilavuus ml	Proteiinipitoisuus mg/ml	Spesifinen aktiivisuus µkat/g	Aktiivisuus nkat/ml	Tot. aktiivisuus nkat	Saanto %
Mediumnäyte	Alkunäyte	1	10,700	0,663	7,10	7,10	100
	1. yläfaasi	7	1,228	0,650	0,80	5,58	78,69
	1. alafaasi (Triton X-114-faasi)	3	1,815	0,109	0,20	0,59	8,37
	2. yläfaasi (Isobutanolifaasi)	5	0,389	0,073	0,03	0,14	1,99
	2. alafaasi	1,5	0,956	0,346	0,33	0,50	6,98
Lämpökäsitelty meidiumnäyte	Alkunäyte	1	8,611	0,609	5,24	5,24	100
	1. yläfaasi	7	1,166	0,375	0,44	3,06	58,42
	1. alafaasi (Triton X-114-faasi)	3	1,897	0,104	0,20	0,59	11,24
	2. yläfaasi (Isobutanolifaasi)	5	0,368	0,069	0,03	0,13	2,41
	2. alafaasi	1,5	0,926	0,284	0,26	0,40	7,54
Lysaattinäyte	Alkunäyte	1	38,700	0,067	2,58	2,58	100,00
	1. yläfaasi	7	3,143	0,293	0,92	6,45	249,86
	1. alafaasi (Triton X-114-faasi)	3	4,756	0,063	0,30	0,90	35,04
	2. yläfaasi (Isobutanolifaasi)	5	0,519	0,048	0,02	0,12	4,82
	2. alafaasi	1,5	1,788	0,107	0,19	0,29	11,10
Lämpökäsitelty lisaattinäyte	Alkunäyte	1	19,300	0,077	1,48	1,48	100,00
	1. yläfaasi	7	1,848	0,107	0,20	1,38	93,35
	1. alafaasi (Triton X-114-faasi)	3	3,860	0,063	0,24	0,73	49,46
	2. yläfaasi (Isobutanolifaasi)	5	0,412	0,092	0,04	0,19	12,72
	2. alafaasi	1,5	1,752	0,103	0,18	0,27	18,24

GOX-HFBI -näytteiden kaksifaasiuuton tulokset

	Näyte	Tilavuus ml	Proteiinipitoisuus mg/ml	Aktiivisuus U/ml	Kokonaisaktiivisuus U	Saanto %
Meidumnäyte	Alkunäyte	1	21,50	444,8	444,8	100
	1. yläfaasi	6	1,91	35,3	211,7	47,6
	1. alafaasi (Triton X-114-faasi)	3,5	3,83	59,7	208,9	47,0
	2. yläfaasi (Isobutanoli-faasi)	5	0,44	0,0	0,2	0,0
	2. alafaasi	2	2,10	56,8	113,7	25,6
Lysaattinäyte	Alkunäyte	1	34,60	222,9	222,9	100
	1. yläfaasi	6	3,51	10,4	62,4	28,0
	1. alafaasi (Triton X-114-faasi)	3,5	5,32	69,6	243,8	109,3
	2. yläfaasi (Isobutanoli-faasi)	5	0,82	-0,05	-0,2	-0,1
	2. alafaasi	2	2,20	43,9	87,7	39,4