

***Escherichia coli* Bakterisinden Rekombinant Protein Eldesinde Sonikasyon ve Yüksek Basınç Yöntemlerinin Karşılaştırılması**

Comparison of Sonication and High Pressure Methods in The Extraction of Recombinant Proteins from Escherichia coli

Zeynep Erdem Aynur*, Bülent Bozdoğan*,**

* Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi, Aydın, Türkiye

** Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Atf/Cite as: Erdem Aynur Z, Bozdoğan B. *Escherichia coli* bakterisinden rekombinant protein eldesinde sonikasyon ve yüksek basınç yöntemlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2025;55(3):204-211.

Öz

Amaç: Rekombinant protein üretiminde hücre parçalama aşaması, elde edilecek protein miktarı ve kalitesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, sonikasyon ve yüksek basınç yöntemlerinin etkinliği, rekombinant SpdAZ proteinini üreten *E. coli* BL21 hücresi *E. coli* NAZ üzerinde test edilmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada, *E. coli* NAZ hücrelerinden total protein ekstraksiyonu, yüksek basınç yöntemi ve sonikasyon yöntemi ile yapılmıştır. Üç, 6 ve 9 tekrarlı olarak yapılan işlemlerde, yüksek basınç yöntemi; 5000, 10000 ve 20000 psi basınçlarda uygulanmıştır. Sonikasyon işlemi ise 50 khz ultrasonik ses ile yapılmıştır. Parçalama işleminin değerlendirilmesi için kontrol grubu olarak işlem yapılmayan kültür kullanılmıştır. Hücre parçalanmasının etkinliği, lizatların seri seyreltilip katı besiyerine ekilmesiyle canlı hücre sayılarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, santrifüj edilen ve filtrelenen lizatların, DNase agar testi ve DNA kesim analizleri ile değerlendirilmiştir. Protein miktarı, Bradford yöntemiyle ölçülmüştür.

Bulgular: Her iki yöntemde de tekrar sayısı arttıkça canlı bakteri sayısının azaldığı gözlenmiştir. Sonikasyonda, 9 tekrardan sonra canlı bakteri sayısı 1022 cfu/ml'den, 1016 cfu/ml'ye düşerken, yüksek basınçta 20000 psi'de 108 cfu/ml'ye kadar azalma olmuştur. Enzim aktivitesinin korunması için yapılan DNase agar testinde sonikasyon lizatıyla 7 mm, yüksek basınç lizatıyla ise 23 mm zon çapı ölçülmüştür. DNA kesim testinde yüksek basınç lizatı, sonikasyona göre %19 daha etkin bulunmuştur. Elde edilen protein miktarları, sonikasyonla en fazla 12320 mg/ml, yüksek basınçla ise 16570 mg/ml olmuştur.

Sonuç: Rekombinant protein eldesinde hücrelerin parçalanması, enzim aktivitesi ve protein yapısının korunması için kritik öneme sahiptir. Hücre parçalama basamağında, yüksek basınç yöntemi canlı hücre sayısı, enzim aktivitesi ve total protein miktarı açısından sonikasyondan daha üstün bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Rekombinant protein eldesi, Sonikasyon, Yüksek basınç

ABSTRACT

Objective: The cell disruption step in recombinant protein production is critical for the quantity and quality of the protein obtained. In this study, the effectiveness of sonication and high-pressure methods was tested on *E. coli* BL21 cells producing recombinant SpdAZ protein.

Methods: This study assessed the effectiveness of sonication and high-pressure techniques on *E. coli* BL21 cells expressing recombinant SpdAZ protein. Cell disruption was performed using high pressure (5000, 10000, and 20000 psi) and sonication (50 kHz) methods, with 3, 6, and 9 repetitions. A control group with no treatment was included to evaluate the disruption efficiency. The degree of cell lysis was measured by counting live cells after serial dilution and plating, and enzyme activity was tested with DNase agar. DNA fragmentation and protein concentration were also analyzed.

Results: Both methods showed a decrease in live cell counts as the number of repetitions increased. After 9 cycles, sonication reduced live bacteria to 1016 cfu/ml, while high pressure (20000 psi) reduced it to 108 cfu/ml. Enzyme activity, as indicated by the DNase test, revealed a 23 mm zone for high-pressure lysates compared to 7 mm for sonication. DNA fragmentation analysis showed that high-pressure treatment was 19% more effective. Protein concentrations reached 16570 mg/ml for the high-pressure method versus 12320 mg/ml for sonication.

Conclusion: The disruption of cells is crucial for maintaining enzyme activity and protein structure in recombinant protein production. In the cell disruption phase, the high-pressure method was found to be superior to sonication in terms of live cell count, enzyme activity, and total protein yield.

Keywords: Recombinant protein extraction, Sonication, High pressure

Alındığı tarih / Received:
18.09.2024 / 18.September.2024

Kabul tarihi / Accepted:
14.07.2025 / 14.July.2025

Yayın tarihi / Publication date:
25.09.2025 / 25.September.2025

ORCID Kayıtları

Z. Erdem Aynur 0000-0003-2736-0316
B. Bozdoğan 0000-0003-2469-9728

✉ z.erdem.06@gmail.com

GİRİŞ

Rekombinant proteinler hem protein yapıda yeni ilaçlarının geliştirilmesi hem de ilaç hedeflerinin belirlenmesi açısından hayati öneme sahiptir⁽¹⁾. Rekombinant proteinlerin üretiminde maksimum ürün eldesi için, plazmid ve konak hücrenin seçimi, gen aktarımı, gen aktarılan hücrelerin üretimi, parçalanması ve rekombinant proteinlerin saflaştırılması aşamalarının optimal koşullarda yapılması önemlidir.

Hücre yapısının tamamen bozulması, biyoteknolojinin ve biyolojik ürünlerin üretimiyle ilgili alt süreçlerin önemli bir parçasıdır. Hücrelerin bozulması, istenilen ürünlerin çıkarılması ve geri alınması için gereklidir ve biyolojik ürünlerin geri kazanımını önemli ölçüde artırır. Saflaştırılmak istenen biyolojik ürünler hücre dışına atılabildiği gibi, hücre içinde veya periplazmik alanda da bulunabilir. Hücrede bulunan ürünlerin elde edilmesinde ilk aşama hücrelerin parçalanmasıdır ve çeşitli hücre parçalama yöntemleri mevcuttur. Hücrelerin parçalanması için, homojenizasyon, sonikasyon, yüksek basınç yöntemi, öğütme, cam boncukla vortekslemek, dondurma çözme gibi mekanik yöntemler ile enzimle sindirmek, deterjan ya da organik çözücülerle lize etmek gibi mekanik olmayan yöntemler kullanılmaktadır^(2,3).

Sonikasyon ve yüksek basınç sistemleri gibi mekanik hücre parçalama yöntemleri, hücre süspansiyonlarının hızlı bir şekilde işleme tabi tutulmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra bu yöntemler, tüm hücre türlerine uygundur⁽⁴⁻⁶⁾.

Emülsiyon oluşturmak için tasarlanan cihazdan uyarlanan yüksek basınç sisteminde, mikrobiyal süspansiyon ilk önce pozitif deplasmanlı bir pompa kullanılarak basınca maruz bırakılır. Basınç, ince bir delik veya halka şeklindeki boşluktan geçilerek hızla serbest bırakılır. Bundan sonra, hücre süspansiyonu, hücrenin parçalanmasını daha da arttırmak için katı bir yüzeye çarpar. Yüksek basınç sisteminde

kullanılan vananın tasarımı emülsiyon hazırlamada ve Gram negatif bakterilerin hücre bütünlüğünün bozulmasında büyük önem arz etmektedir⁽⁷⁾. Yüksek basınç sisteminde, başarılı hücre parçalanmasının sağlanabilmesi için, basınç salınımının hızı ve büyüklüğü önem taşır^(7,8).

Yüksek basınçlı homojenizatörler uzun zamandır mikroorganizmaların hücre bütünlüğünün bozulması işlemlerinde kullanılmaktadır. Bakteri hücreleri, 40-250 ml'lik hacimleri işlemeye uygun, sürekli dolumlu bir Fransız presi kullanılarak yüksek basınçlı homojenizasyon yoluyla verimli bir şekilde parçalanabilir⁽⁷⁾.

İğne uçlu sonikasyon, yüksek yoğunluklu ultrasonik dalgaların kullanıldığı bir hücre parçalama yöntemidir. Ultrasonik dalgalar, 15-20 kHz'den daha yüksek bir frekanstaki sesi ifade eder ve sıvılarda kaviteasyona neden olur. Sonikasyon, mikrobiyal hücre parçalanmasının bir yöntemi olarak uzun zamandır tanınmakta olup yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniğidir⁽⁸⁾. Ses dalgaları, sıvı hücre süspansiyonuna batırılmış titreşen bir prob içeren bir cihaz kullanılarak iletilir. Proben mekanik enerjisi, anlık olarak oluşan ve içe doğru patlayan mikroskobik buhar baloncuklarının oluşumunu başlatır, bu da bir örneğin içinden şok dalgalarının yayılmasına neden olur. Aşırı ısınmayı önlemek için, ultrasonik işlem buz banyosuna batırılmış bir örneğe çoklu kısa patlamalar halinde uygulanır. Sonikasyon yönteminin optimal çalışma hacmi 100 mililitreden az olan hücrelerdir⁽⁹⁾. Sonikasyon işleminin bilinen avantajları, tüm hücreleri etkili bir şekilde parçalayabilmesi, nükleaz gerektirmeden kromozomları kesebilmesi ve yüksek oranda hücre parçalamasını sağlaması iken, işlem sırasında oluşan ısı proteinleri degrade edebilmekte, gürültü kaynaklı sağlık problemlerine yol açmaktadır⁽⁹⁾.

Bu çalışmamızda uygulamalarda sıklıkla kullanılan hücre parçalama yöntemlerinden olan, sonikasyon ve yüksek basınç yöntemi tekniklerinin rekombinant protein eldesindeki performansları karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntem karşılaştırılmasında kullanılan *E. coli* NAZ suşu: *E. coli* BL21 hücrelerine pET30a *Ω*spdAZ plazmidini aktararak elde edilen rekombinant *E. coli* NAZ suşu kullanılmıştır.

Hücrelerin hazırlanması: Toplam 1000 ml Luria-Bertani (LB) besiyerine *spdAZ* genini içeren *E. coli* NAZ'ın gecelik kültüründen 1/20 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de OD600'deki absorpsiyon değeri OD 0.6-0.8 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. İndüksiyon için 1 mM izopropil-β-D tiyogalaktopiranozit (IPTG) eklenmiş ve bir gece boyunca 37°C'de çalkalanarak kültüre bırakılmıştır.

Hücre lizatlarının eldesi: Gecelik inkübasyonun ardından, 50 mililitrelik falkonlara kültür bölünerek, +4°C'de 5000 rpm'de on dakika santrifüj edilmiş, peletlere 45 mililitre 1X fosfat buffer saline eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyon üç ayrı falkona her birinde 15 ml süspansiyon olacak şekilde bölünmüştür. Elde edilen süspansiyonlara 1X PBS eklenerek hacim 50 mililitreye tamamlanmıştır. Süspansiyonlardan bir tanesi, başlangıçtaki canlı bakteri yoğunluğunun tespiti için hiçbir işleme tabii tutulmamıştır. Elde edilen ikinci süspansiyon, Sonopuls (Bandelin Electronics, Almanya) cihazı yardımıyla, bir dakika boyunca %50 güç ile sonikasyon işlemine tabii tutulmuş, her parçalama işleminin ardından örnekler bir dakika bekletilmiştir. Sonikasyon işlemi 3, 6 ve 9 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Sonikasyonla parçalama işlemi sonrasında canlı hücre sayımı yapmak amacıyla steril ependorflara birer ml lizat alınmıştır. Kalan lizat ise sonraki işlemlerde kullanılmak amacıyla -20C saklanmıştır. Elde edilen üçüncü süspansiyon ise, LM10 Mikrofluidizer® (Microfluidics, MA, ABD) cihazı kullanılarak yüksek basınç sistemi yöntemi ile, 5000 psi, 10000 psi ve 20000 psi basınçta 3, 6 ve 9 tekrarlı olacak şekilde parçalama işlemine tabii tutulmuştur. Parçalama sonrasında her lizattan birer ml örnek canlı hücre sayımı için steril ependorflara alınmıştır. Kalan lizatlar ise -20°C'da saklanmıştır. Tüm parçalama işlemleri proteinlerin ısı ile denatürasyonlarını önlemek amacıyla buz içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Canlı kalan hücrelerin tespiti: Bu amaçla, steril ependorflara ayrılan lizatlar kullanılmıştır. Elde edilen lizatlardan 100ul alınarak 900 µl PBS içeren tüplere aktarılmış ve seri dilüsyonlar (10^{-1} ... 10^{-22}) hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlardan 100 µl alınarak "tryptic soy agar"a yayma ekim gerçekleştirilmiştir. Hiçbir işleme tabii tutulmayan süspansiyonda da aynı işlem gerçekleştirilmiştir. Gecelik inkübasyondan sonra 30-300 koloni arasında koloni oluşan dilüsyondaki koloniler sayılarak ml'deki canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Canlı bakteri sayımından sonra kalan 0.9 ml lizatlar 15000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendikten sonra 0.22 mikronluk şırınga ucu filtreden geçirilmiş ve sonraki enzim aktivitesini belirleme ve protein miktarını hesaplama işlemlerinde kullanılmıştır.

Enzim aktivitesinin DNaz agarda değerlendirilmesi: Sonikasyon ve yüksek basınç sistemi yöntemi ile hazırlanan ve filtrelenen lizatlardan 10 µl alınarak DNaz agara damlatılmış, damlanın kurumasi beklendikten sonra 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinin ardından agar üzeri 1 N hidrojen klorür ile kaplanmış ve oluşan şeffaf zon çapları ölçülmüştür.

Enzim aktivitesinin DNA degradasyonu ile değerlendirilmesi: Bu amaç için ticari olarak satılan lambda faj DNA (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. DNA örneğinden 3 µg (10 µl) alınmış, ayrı ependorflarda sonikasyon ve yüksek basınç yöntemiyle elde edilen filtratlardan onar µl eklenmiştir. Kontrol olarak, ayrı bir ependorf içindeki DNA üzerine 10 µl dH₂O eklenmiştir. Ependorflar, 37°C'de 1 saat inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda örnekler %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Total protein miktarının ölçümü: Bu amaç için, Bradford spektrofotometrik ölçümünden yararlanılmıştır. 96 kuyucuklu ELISA mikrotitrasyon plağına 150 µl %0.01 (w/v) Coomassie Brilliant Mavis G-250; %4.7 (w/v) etanol; %8.5 (w/v) fosforik asit karışımı eklenerek üzerine, 50 µl örnek yükleme yapılmıştır. Karışım beş dakika oda ısısında bekletilmiştir. İnkübasyon sürecinin ardından 595 nm dalga boyunda Thermo Multiskan FC® (Thermo Fischer Scientific, ABD) cihazı

ile ölçüm alınmıştır⁽¹⁰⁾. Sonuçlar “Bovine Serum Albumin” standardı kullanılarak değerlendirilmiştir.

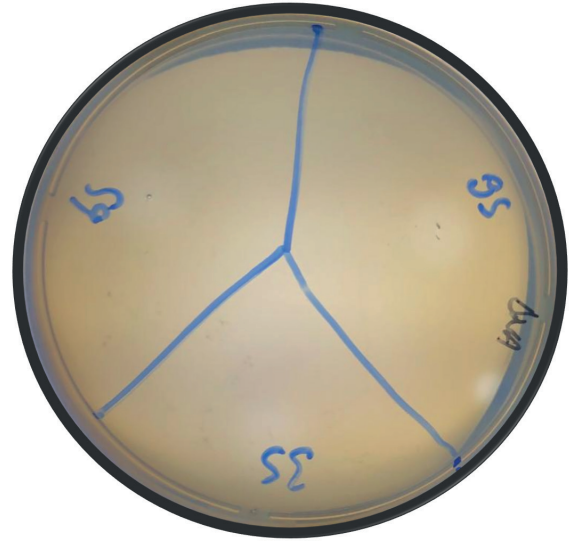
BULGULAR

Canlı kalan hücre sayısının tespiti: Hiçbir işleme tabii tutulmayan, süspansiyondaki canlı hücre sayısı 3×10^{22} cfu/ml olarak belirlenmiştir. Üç tekrarlı yapılan sonikasyon işleminin ardından canlı kalan hücre sayısında herhangi bir azalma görülmezken altı tekrarlı sonikasyon işlemi sonucunda canlı kalan hücre sayısı 10^{20} cfu/ml, dokuz tekrarlı sonikasyon işleminde ise, 10^{16} cfu/ml yoğunlukta canlı bakteri hücresi sayılmıştır. Böylece sonikasyon yöntemiyle maksimum canlı bakteri azalması 6 log olarak hesaplanmıştır.

Üç tekrarlı yapılan yüksek basınç yönteminde, 5000 psi basınçta 8×10^{18} cfu/ml, 10000 psi basınçta 9×10^{15} cfu/ml, 20000 psi basınçta 3.2×10^{14} cfu/ml canlı hücre kaldığı belirlenmiştir. Tekrar sayısı altı ve dokuz olduğunda sırasıyla 5000 psi basınçta 2×10^{16} ve 3×10^{15} cfu/ml, 10000 psi basınçta 5×10^{13} ve 5×10^{10} cfu/ml, 20000 psi basınçta 1×10^{12} ve 1.82×10^8 cfu/ml canlı hücre kaldığı saptanmıştır (Tablo 1). Yüksek basınçla maksimum canlı hücre azalması 14 log olarak hesaplanmıştır.

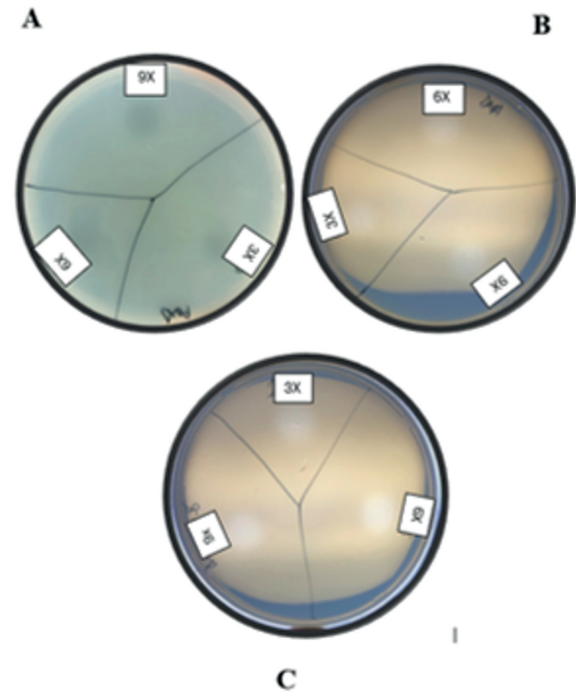
Enzim aktivitesinin DNaz agarda değerlendirilmesi: Parçalama sonrası enzim aktivitesi değerlendirilmelerinde üç ve altı tekrarlı yapılan

sonikasyon işlemlerinde enzim aktivitesi saptanmazken, dokuz tekrarlı yapılan sonikasyon işleminde DNaz agarda ölçülen zon çapı 7 mm olarak bulunmuştur (Resim 1). Yüksek basınç yönteminde



Resim 1. Sonikasyon işlemi sırasında DNaz agarda enzim aktivitesinin değerlendirilmesi

3S: Üç tekrarlı sonikasyon işlemi; 6S: Altı tekrarlı sonikasyon işlemi; 9S: Dokuz tekrarlı sonikasyon işlemi.



Resim 2. Yüksek Basınç Yöntemi işlemi ile hücre parçalaması sonrasında DNaz agarda enzim aktivitesinin değerlendirilmesi

A: 5000 psi basınç; B: 10000 psi basınç; C: 20000 psi basınç. 3X: Üç tekrarlı işlem; 6X: Altı tekrarlı işlem; 9X: Dokuz tekrarlı işlem.

Tablo 1. Yüksek Basınç Sistemi yönteminde farklı basınç ve tekrar sayılarında canlı kalan hücre sayıları

Tekrar Sayısı	Basınç (psi)	Canlı kalan hücre miktarı (cfu/ml)
3	5000	8×10^{18}
3	5000	9×10^{15}
3	5000	3.2×10^{14}
6	10000	2×10^{16}
6	10000	5×10^{13}
6	10000	1×10^{12}
9	20000	3×10^{15}
9	20000	5×10^{10}
9	20000	2×10^8

5000 psi basınçta yapılan işlem sonucunda üç tekrarlı olanda 7 mm, altı tekrarlı olanda 9 mm ve dokuz tekrarlı olanda 12 mm zon çapı ölçülmüştür (Resim 2a) 10000 psi basınç üç tekrarlıda 9 mm, altı tekrarlıda 13 mm ve dokuz tekrarlıda 16 mm zon çapı ölçülmüştür (Resim 2b). 20000 basınçla yapılan işlemlerde ise üç tekrarlı 12 mm, altı tekrarlıda 18 mm ve dokuz tekrarlıda 23 mm zon çapı ölçülmüştür (Resim 2c).

Enzim aktivitesinin DNA degradasyonu ile değerlendirilmesi: Değerlendirme ticari lambda faj DNA'sının degrade edilmesi ile test edilmiştir. Bu çalışmada da hem sonikasyonda hem de yüksek basınç yönteminde enzim aktivitesi saptanmıştır (Resim 3). Sonuçlar ImageJ® programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, yüksek basınç yönteminde sonikasyona göre, %19 oranında absorbands azalması gözlemlenmiştir.

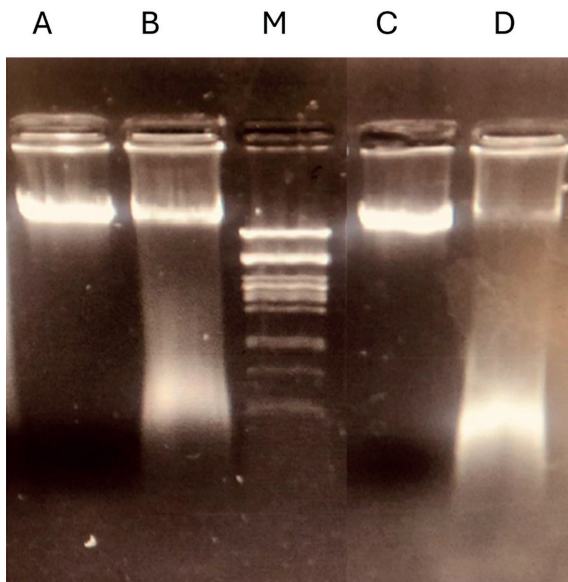
Total protein miktarlarının tayini: Bradford yöntemi ile ölçülen total protein miktarları ise hem sonikasyon hem de yüksek basınç sistemlerinde üç tekrarlı olan uygulamada en az olurken dokuz tekrarlıda en yüksek düzeyde ölçülmüştür. Protein miktarı açısından,

dokuz tekrarlı yapılan yüksek basınç yönteminde elde edilen total protein miktarı 5000 psi basınçta, 8000 mg/ml, 10.000 psi basınçta, 12745 mg/ml ve 20.000 psi basınç için, 16570 mg/ml olurken, dokuz tekrarlı sonikasyon işleminde bu miktar 12320 mg/ml olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Hücre parçalanması (lisis), hücre bütünlüğünün bozularak hücre içi materyallerin (DNA, RNA, proteinler ve organeller gibi) serbest bırakıldığı bir süreçtir. Hücre lizisi, moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve biyokimya alanlarında, özellikle protein saflaştırma, patojen tanısı, ilaç taraması ve çeşitli biyomoleküllerin analizi gibi süreçlerde kritik bir rol oynar⁽¹¹⁾. Bu süreçte kullanılan hücre parçalama yöntemi, hem süreç boyunca yapılacak saflaştırma adımlarını hem de analiz edilecek hedef moleküller ve elde edilecek nihai ürünlerin kalitesini doğrudan etkilediği bilinmektedir⁽⁷⁾.

Hücre bütünlüğünün bozulması için mekanik ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Mekanik yöntemler, hücre zarını parçalamak için dış kuvvet kullanır ve bu kuvvetler genellikle ısı, basınç ve ses enerjisi gibi kaynaklardan elde edilir. Kimyasal yöntemler ise deterjanlar veya çözücüler gibi kimyasal ajanlar kullanarak hücre zarını bozar. Diğer bir yöntem ise enzimatik yöntemlerdir, hücre yapısını oluşturan protein veya şeker bağlarının yıkılmasıyla hücre bütünlüğü bozulur. Bu yöntemler arasında rekombinant protein elde edilmesi için bu proteinlere zarar vermeyen sonikasyon ve yüksek basınç hücre parçalama teknikleri tercih edilmektedir. Sonikasyon, ultrasonik dalgaların hücrelere iletilerek mekanik enerjiye dönüştürülmesiyle çalışır. Bu enerji, hücre duvarlarını parçalayarak içeriğin serbest hale gelmesini sağlar. Ancak, sonikasyon işlemi sırasında meydana gelen ısı, özellikle proteinlerin denatürasyonuna neden olabilir. Ayrıca, yüksek hücre yoğunluklarında sonikasyonun verimliliği düşebilir, çünkü ultrasonik dalgaların tüm hücrelere ulaşması zorlaşır⁽¹²⁾. Çalışmamızda, mikro akışkan temele dayanan yüksek basınç sistemi ve ses ile hücre parçalama yöntemi olan iğne uçlu sonikatör kullanılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir. Mikro akışkan



Resim 3. Enzim aktivitesinin DNA degradasyonu ile değerlendirilmesi

A: *Escherichia coli* total DNA'sı; **B:** *Escherichia coli* DNA'sının dokuz tekrarlı sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen lizatla muamelesi; **M:** Marker; **C:** *Escherichia coli* total DNA'sı; **D:** *Escherichia coli* DNA'sının dokuz tekrarlı 20000 basınç altında parçalanması işlemi sonrasında elde edilen lizatla muamelesi.

temelli yüksek basınç sistemi ile iğne uçlu sonikasyon yönteminin karşılaştırdığımız çalışmamızda, mikro akışkan temelli yüksek basınç sistemi çok daha üstün bulunmuştur.

İğne uçlu sonikatörler, ultrasonik dalgaların hücrelere iletilerek mekanik enerjiye dönüştürülmesiyle çalışır. Bu enerji, hücre duvarlarını parçalayıp içeriğini serbest hale getirir. Bakteri ve maya hücrelerinde ürettirilen rekombinant ürünlerin elde edilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir^(13,14). İğne uçlu sonikasyon ile yapılan parçalamalarda, özellikle yüksek yoğunluklu kültürlerde verimlilik oranı düşük olmaktadır. Yüksek hücre yoğunlukları, sonikasyonun etkili bir şekilde tüm hücrelere ulaşmasını engellemekte, parçalanma verimliliğini azaltmaktadır⁽¹²⁾. Mikro akışkan temele dayalı yüksek basınç yönteminde ise, yüksek basınç altında hücrelerin hızlı ve etkili bir şekilde parçalanması sağlanmaktadır. Bu sayede, hücre duvarları ve zarlar etkili bir şekilde kırılarak hücre içeriği serbest kalmaktadır^(15,16). Çalışmamızda, Mikroakışkan temelli yüksek basınç sistemi ile yapılan hücre parçalanmasında, parçalanmış hücre sayısının (1.82×10^8 cfu/ml), sonikasyonla elde edilen (10^{16} cfu/ml) hücre sayısından 8 log daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu, mikroakışkan sistemin hücreleri daha homojen ve etkili bir şekilde parçaladığını göstermektedir. Bu yöntemde, hücre duvarlarının parçalanması, proteinlerin yapısal bütünlüğünü koruyarak yüksek saflıkta protein elde edilmesine olanak tanır^(17,18).

Hücre duvarları ve zarların etkili bir şekilde kırılması, proteinlerin yapısal bütünlüğünü koruyarak ve denatürasyon riskini minimize ederek yüksek saflıkta protein elde edilmesini sağlamaktadır^(17,18).

Sonikasyon işlemi sırasında meydana gelen ısı, özellikle iğne uçlu sonikatörlerde, proteinlerin denatürasyonuna neden olabilmektedir. Yüksek enerji yoğunluğu ve süre uzunluğu, proteinlerin yapısal bütünlüğünü bozmakta ve proteinlerin fonksiyonel özelliklerini kaybetmesine yol açabilmektedir⁽¹⁹⁾. İğne uçlu sonikatörler genellikle belirli bir bölgeye odaklanarak çalışırlar. Bunun sonucunda büyük hacimlerdeki hücrelerin, eşit şekilde parçalanması zorlaşabilir. Bu durum, bazı hücrelerin sonikasyon etkisi

dışında kalmasına dolayısıyla daha düşük verimlilikte hücre parçalanmasına yol açabilmektedir^(20,21). Sonikasyonun etkili olmadığı durumlarda ve aşırı ısınma gerçekleştiğinde proteinlerin çıkış verimliliği düşebilmektedir. Yine bazı durumlarda, proteinler sonikasyon işlemi sırasında yapısal değişikliklere uğramakta ve etkinlikleri azalabilmektedir^(20,21). Sonikasyon işlemi, kontaminasyon riskine de açık olan bir sistem olup, proteinlerin işlenmesi ve analiz edilmesi sırasında zorluklar yaratabilmektedir⁽²²⁾. Mikroakışkan temelli yüksek basınç sisteminde ise, uygulanan basınç seviyesi hassas bir şekilde kontrol edebilir. Bu sayede, hücrelerin homojen bir şekilde parçalanması ve proteinlerin optimum şekilde serbest bırakılması sağlanır. Bu kontrollü parçalama hem hücre parçalanma verimliliğini artırır hem de proteinlerin yüksek saflıkta ve aktif formda elde edilmesini sağlar^(23,24). Mikroakışkan yüksek basınç sistemi, genellikle düşük termal etkilerle çalışmaktadır bu sayede proteinler, ısı denatürasyonundan olumsuz etkilerinden korunabilirler^(25,26). Çalışmamızda, enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi açısından, mikroakışkan temelli yüksek basınç sisteminin, sonikasyon yöntemine göre daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Bu üstünlüğün temel nedeni, yüksek basınç sisteminin hücre parçalanmasında çok daha etkin olması ve bu yöntemde, hücre parçalama sırasında oluşan ısının sonikasyona kıyasla çok daha düşük seviyelerde kalmasıdır. Yüksek basınç sistemi, hücreleri yüksek basınç altında hızlı ve etkili bir şekilde parçalayarak enzimlerin çevreye salınmasını sağlar. Bu yöntem, hücre bütünlüğünü daha verimli bir şekilde bozarken, aynı zamanda işlem sırasında minimum ısı üretir. Düşük sıcaklık, enzimlerin doğal yapısını ve aktivitesini koruyarak, daha doğru ve yüksek enzim aktivite ölçümleri elde edilmesine olanak tanır. Sonikasyon ise, ultrasonik dalgalar kullanarak hücreleri parçalar, ancak bu süreçte önemli miktarda ısı açığa çıkar. Yüksek ısı, enzimlerin denatüre olmasına veya aktivitelerinin azalmasına yol açabilir, bu da sonikasyon yöntemiyle elde edilen enzim aktivitelerinin, yüksek basınç yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre daha düşük olmasına neden olabilir. Çalışmamızda, enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi açısından, mikroakışkan temelli Yüksek basınç sisteminin, sonikasyon yöntemine göre daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Bu üstünlük, yüksek basınç sisteminin hücre parçalanmasında daha etkin olmasından ve hücre parçalama sırasında

oluşan ısının sonikasyona kıyasla çok daha düşük seviyelerde kalmasına bağlı olabilir. Bu da enzimlerin doğal yapısını ve aktivitesini koruyarak, daha doğru ve yüksek hassasiyette enzim aktivite ölçümleri elde edilmesine olanak tanımaktadır.

Çalışmamız sonucunda hücre parçalanmasında, protein aktivitesinin korunmasında ve açığa çıkan protein miktarında yüksek basınç sisteminin sonikasyon yöntemine göre daha iyi sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

- Overton TW. Recombinant protein in bacterial hosts. Drug Discov Today. 2014;19(5):590-601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Edebo L, Magnusson KE. Disintegration of cells and protein recovery. Pure Appl Chem. 1973;36(3):325-38. <https://doi.org/10.1351/pac197336030325>
- Engler CR. Disruption of microbial cells. In: Cooney CL, Humphrey AE, editors. Comprehensive biotechnology. Vol.2. Toronto: Pergamon Press; 1985: 305-24.
- Balasundaram B, Harrison STL, Bracewell DG. Developments in product release for whole bioprocess design strategies. Trends Biotechnol. 2009;27(8):477-85. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.04.004>
- Hopkins TR. Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. Bioprocess Technol. 1991;12:57-83.
- Middelberg A. Process-scale disruption of microorganisms. Biotechnol Adv. 1995;13(3):491-551. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02007-P](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02007-P)
- Harrison ST. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. Biotechnol Adv. 1991;9(2):217-40. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90005-g](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90005-g)
- Geciova J, Bury D, and Jelen P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. Int Dairy J. 2002;12(6):541-53. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00038-9)
- Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, 2006. [<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html#:~:text=reproducibility%20may%20vary,Sonication,spores%2C%20and%20finely%20diced%20tissue>] (Erişim Tarihi: Ağustos.2024)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. Micromachines (Basel). 2017;8(3):83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Bystryak S, Santockyte R, Peshkovsky AS. Cell disruption of *Saccharomyces cerevisiae* by scalable high-intensity ultrasound. Biochem Eng J. 2015;99:99-106. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.014>
- Feliu JX, Cubarsi R, Villaverde A. Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *Escherichia coli* cells. Biotechnol Bioeng. 1998;58(5):536-43. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.1998.05.014>
- Mason TJ, Lorimer JP. Applied sonochemistry: The uses of power ultrasound in chemistry and processing. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2002: 1-24. <https://doi.org/10.1002/352760054X>
- Zhang R, Grimi N, Marchal L, Lebovka N, Vorobiev E. Effect of ultrasonication, high pressure homogenization and their combination on efficiency of extraction of bio-molecules from microalgae *Parachlorella kessleri*. Algal Res. 2019;40:101524. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101524>
- Ke Y, Chen J, Dai T, et al. Developing industry-scale microfluidization for cell disruption, biomolecules release and bioaccessibility improvement of *Chlorella pyrenoidosa*. Bioresour Technol. 2023;387:129649. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129649>
- Tribst AA, Augusto PE, Cristianini M. The effect of high pressure homogenization on the activity of a commercial β -galactosidase. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012;39(11):1587-96. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1179-9>

18. Grigorov E, Kirov B, Marinov MB, Galabov V. Review of microfluidic methods for cellular lysis. *Micromachines* (Basel). 2021;12(5):498. <https://doi.org/10.3390/mi12050498>
19. Chandrapala J, Zisu B, Palmer M, Kentish S, Ashokkumar M. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrason Sonochem*. 2011;18(5):951-7. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.12.016>
20. Ferdous S, Dopp JL, Reuel NF. Optimization of *E. coli* tip-sonication for high-yield cell-free extract using finite element modeling. *AIChE J*. 2021;67(10):e17389. <https://doi.org/10.1002/aic.17389>
21. Adamou P, Harkou E, Villa A, Constantinou A, Dimitratos N. Ultrasonic reactor set-ups and applications: A review. *Ultrason Sonochem*. 2024;107:106925. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106925>
22. Qsonica. Best practices for ultrasonic homogenization, 2020. Newtown, Connecticut: Qsonica, LLC. [<https://www.sonicator.com/best-practices-ultrasonic-homogenization>] (Erişim Tarihi: Eylül.2025)
23. Diels AM, Michiels CW. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Crit Rev Microbiol*. 2006;32(4):201-16. <https://doi.org/10.1080/10408410601023516>
24. Liu W, Liu J, Xie M, Liu C, Liu W, Wan J. Characterization and high-pressure microfluidization-induced activation of polyphenoloxidase from Chinese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J Agric Food Chem*. 2009;57(12):5376-80. <https://doi.org/10.1021/jf9006642>
25. Wu M, He X, Feng D, et al. The effect of high pressure homogenization on the structure of dual-protein and its emulsion functional properties. *Foods*. 2023;12(18):3358. <https://doi.org/10.3390/foods12183358>
26. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1399-408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>