

SEJTFELTÁRÁS

Ismétlés: nincs rögzített műveleti sorrend, de vannak általános irányelvek:

(1/b SEJTFELTÁRÁS: csak akkor szükséges, ha a termék intracelluláris)

Milyen erős a sejtfal?

Az állati sejtek kipukkannak a deszt vízben, a mikroorganizmusok nem – a sejtfal kibírja az ozmózisnyomást.

Mekkora ez?

→ 0,9 %-os NaCl → ~1/6 mól → ~ 1/3 ozmól → $p \sim 24/3 = 8 \text{ bar}$ → nyomástartó edény



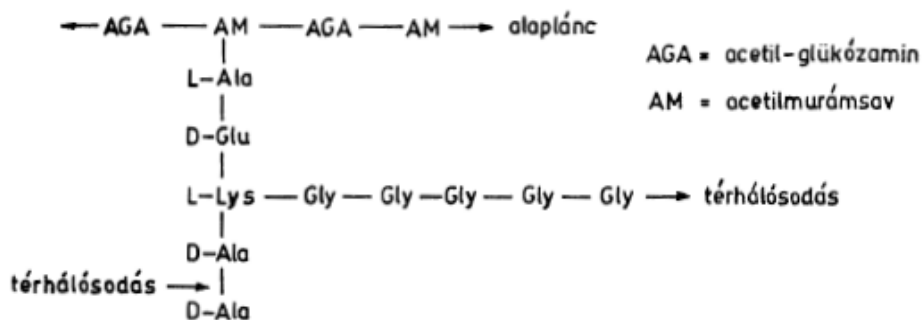
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

A SEJTFAL

A Gram pozitív baktériumok sejtfalának szerkezete:

Szénhidrát alaplánc, peptid oldalláncok

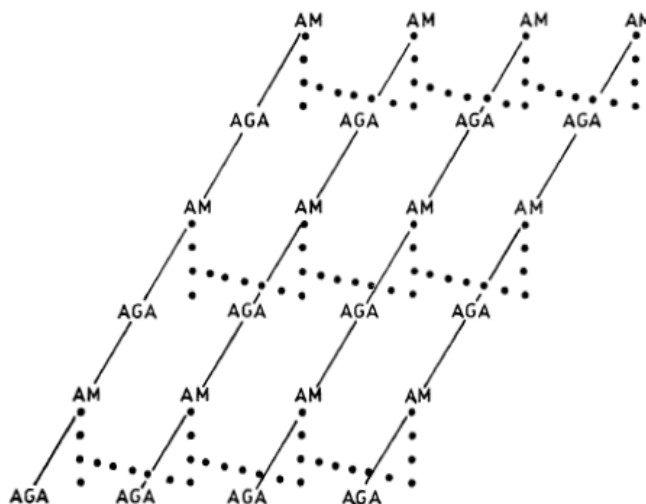


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

A SEJTFAL

Térhálósodás:
a peptid oldallán-
cokon keresztül
(penicillin!)

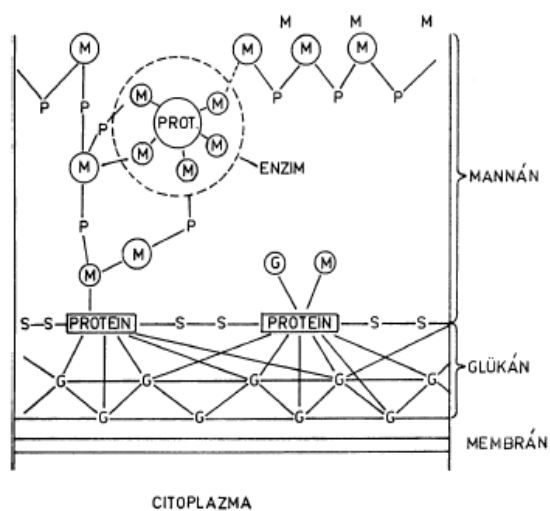


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

AZ ÉLESZTŐK SEJTFALA

Glükán- és mannán-fehérje
komplex rétegek



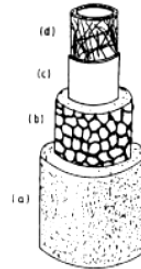
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

A PENÉSZEK SEJTFALA

Több réteg, változatos kémiai összetétel:

- β -glükán
- kitin
- kitozán
- cellulóz
- peptidoglükán



A *Neurospora crassa* sejtfalának vázlatos szerkezete.
Az egyes rétegek:

- (a) külső α - és β -glükán réteg,
- (b) glükoprotein hálózat, benyúló glükán részekkel
- (c) túlnyomórészt fehérjéből álló réteg
- (d) kitines réteg, fehérjébe ágyazott mikrofibrillumok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

A beltartalom kiszabadulását a feltárási módszertől függetlenül elsőrendű kinetikával lehet leírni:

$$\frac{dP_i}{dt} = -kP_i$$

P_i a sejtben lévő termék koncentrációja

Szétválasztással integrálva a P_i időben exponenciálisan csökken.

$$\int_{P_{i0}}^{P_i} \frac{dP_i}{P_i} = - \int_0^t k dt$$

Praktikusan inkább a kinyert termékmennyiséget fejezzük ki:

$$R = P_{i0} - P_i$$



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

A kinyert termék mennyisége ekkor így alakul:

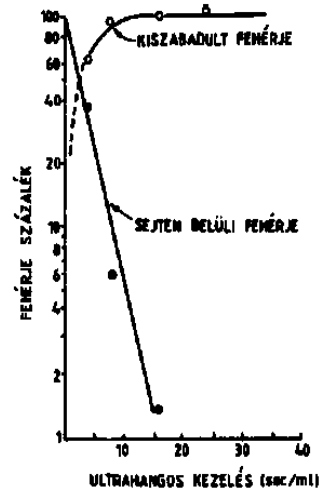
$$R = P_{i0} [1 - e^{-kt}]$$

Ugyanakkor a termék is károsodhat (bomlás, denaturálódás), amit szintén elsőrendű kinetikával közelíthetünk:

$$\frac{dS}{dt} = -K_d S$$

ahol:

S – specifikus aktivitás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

Az inaktíválódás is exponenciálisan megy végbe:

$$S = S_0 e^{-K_d t}$$

Az eredő termékkihozatal a két tényező kombinációjával fejezhető ki:

$$R_e = RS$$

azaz:

$$R_e = P_{i0} [1 - e^{-kt}] [S_0 e^{-K_d t}]$$

A konstansokat összevonva:

$$R_e = K(1 - e^{-kt}) e^{-K_d t}$$



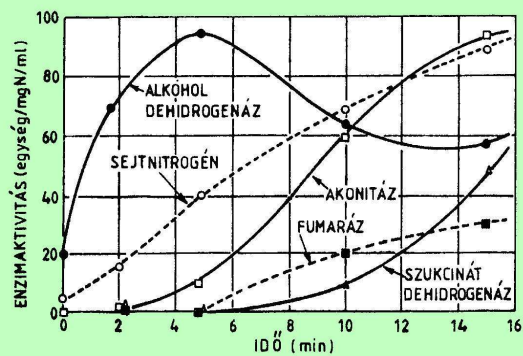
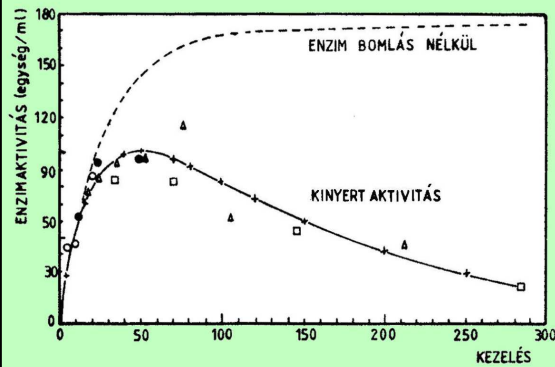
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8



A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

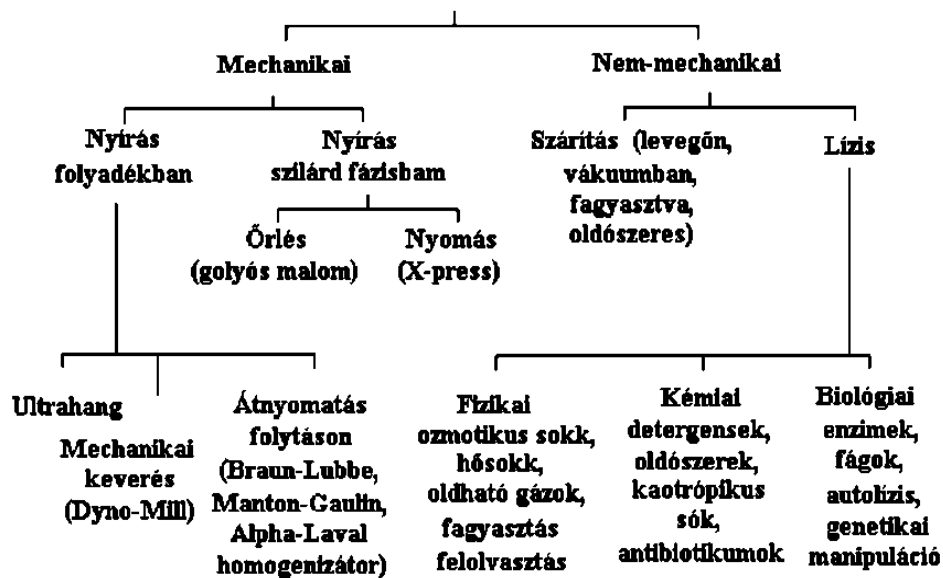
Kísérleti eredmények: van optimális feltárási idő



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

A SEJTFELTÁRÁS MÓDSZEREI



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

ULTRAHANGOS FELTÁRÁS

„Szonikálás”
15-25 kHz
Kavitációs mechanizmus
Melegszik → hűtés
szabad gyökök

Csak laborban.



SONOPULS HD 2070



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

GYÖNGYMALMOK

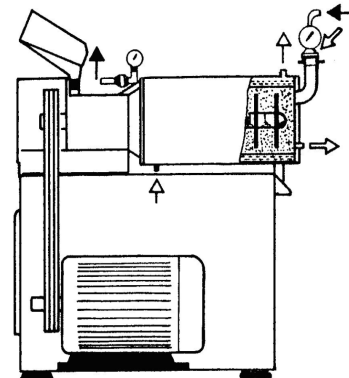
Festékipari pigment-homogenizátorok

0,1-2 mm kopásálló üvegyöngyök

Dörzsölő-koptató hatás

Tárcsás keverők

- SZUSZPENZIÓ
- ⇔ ÜVEGGYÖNGYÖK
- HŐFOKSZABÁLYOZÁS



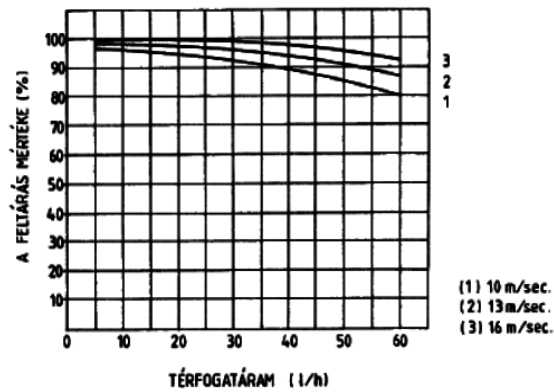
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

GYÖNGYMALMOK



Tárcsás keverők, nagy fordulatszám



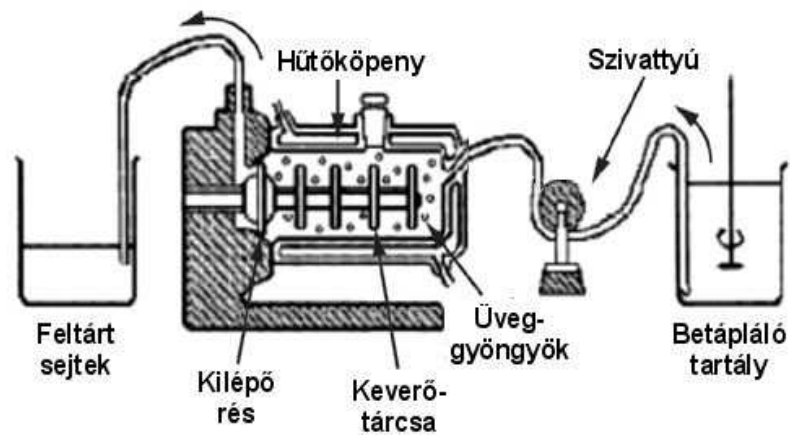
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

GYÖNGYMALMOK

Folyamatosan üzemeltethetők – az üvegyöngyöket vissza kell tartani.

Hűtés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

IPARI BERENDEZÉSEK

DYNO-MILL

		Technische Daten		Technical Data		Données techniques			
DYNO-Mill Typ/Type		KDL	KDL SPECIAL	KDL PILOT	KD 5	KD 15	KD 50 CN	KD 200 C	KD 250 C
Mahlbehälter Grinding container Récipient de broyage	Liter	0.6 cont. 0.3 batch 0.15 batch	0.6	1.4	5	15	49	215	275
Motor Motor Moteur	kW	1.85	1.85	3.3	11	17.5	30	55	75
Höhe Height Hauteur	mm	470	470	520	1475		1680	1920	2090
Länge Length Longueur	mm	520	520	520	935	1040	1440	2220	2730
Breite Width Largeur	mm	600 710	600 710	520 650	665		840	1050	1230
Gewicht ca. Approx weight	kg	82	82	95	390	550	1050	2150	2800



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

GYÖNGYMALMOK

Előnyök:

- Folytonosítható
- Léptéknövelhető

Hátrányok:

- Nagy energiafogyasztás (+ hűtés)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

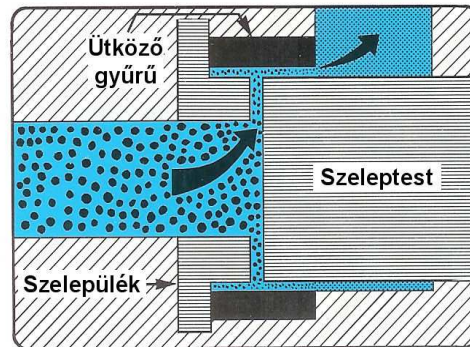
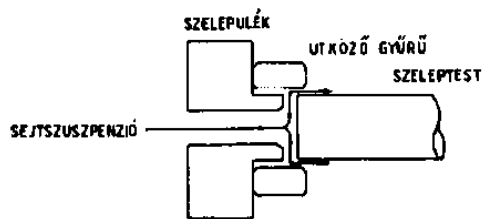
16

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Speciálisan kialakított fojtáson (homogenizáló szelep) nagy nyomással (200 - 600 - 1000 bar) átnyomják a szuszpenziót. Eredetileg tejipari berendezés.

Feltárási mechanizmusok:

- áramlási
- ütközési



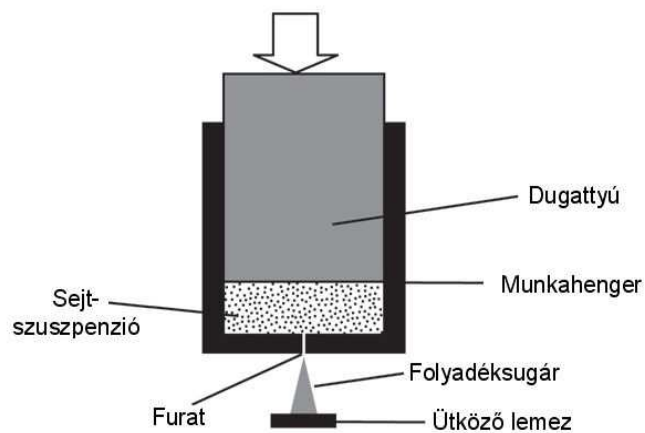
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Szakaszos megoldás (French press)

Hidraulikusan mozgattott dugattyú préseli át a folyadékot a nyíláson. A folyadéksugarat fém felületnek ütköztetik.

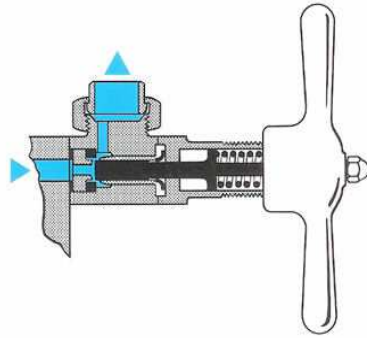


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

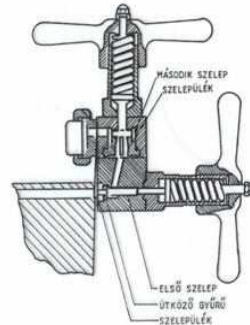
18

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Folytonos megoldás: szabályozható szelepek
Egyfokozatú (200 – 600 bar) és
Kétfokozatú (600 -1000 bar) homogenizátorok



Egyfokozatú homogenizáló szelep



Kétfokozatú homogenizáló szelep



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

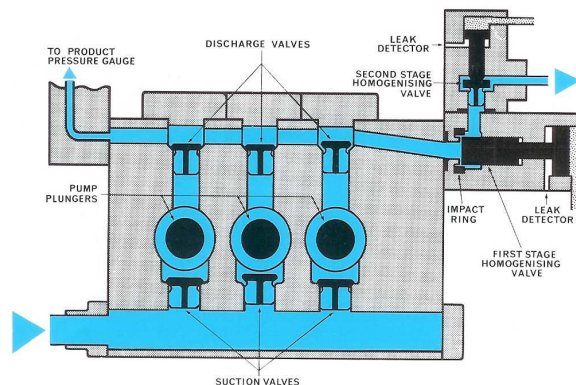
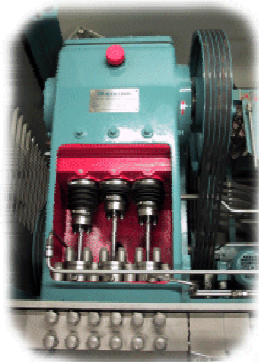
19

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Milyen szivattyú képes ilyen nyomást létrehozni?

Csak a dugattyús.

Az egyenletesebb működés érdekében 3 dugattyú dolgozik, fázistolással

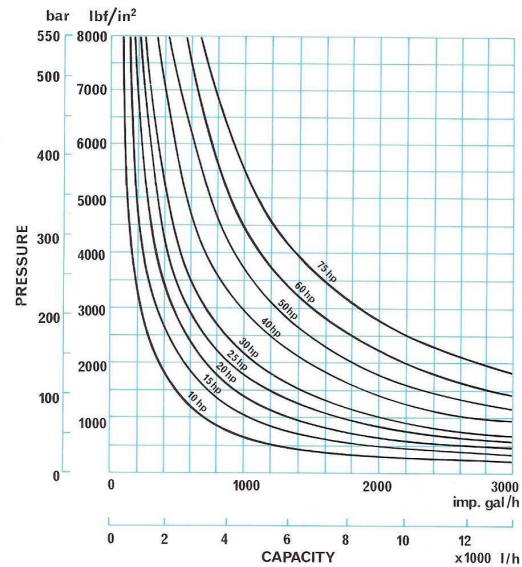


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

A homogenizátor működési jelleggörbéje lényegében azonos a szivattyúéval.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

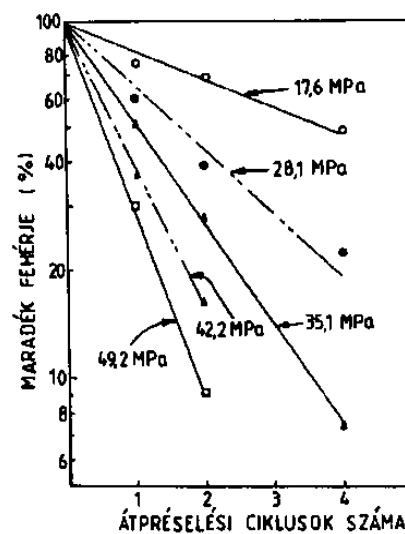
21

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Rendszerint többszöri átnyomatásra, cirkuláltatásra van szükség (Hűtés!)

$$\ln \left[\frac{1}{1-R} \right] = k N_p P^a$$

ahol: N - átnyomatások száma
P - nyomás
a - mikroba konstans
k - sebességi állandó



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

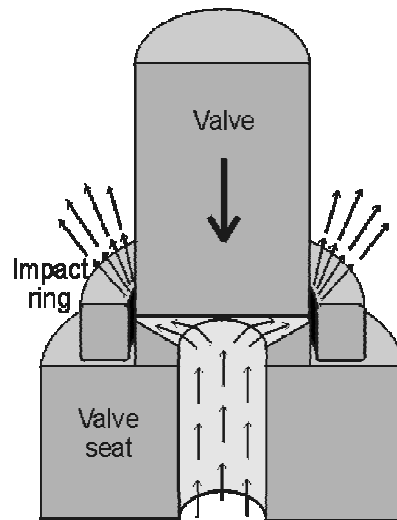
NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Előnyök:

- Folytonosítható
- Léptéknövelhető

Hátrányok:

- Nagy energiafogyasztás
- masszív szerkezet
- eltömődésveszély



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

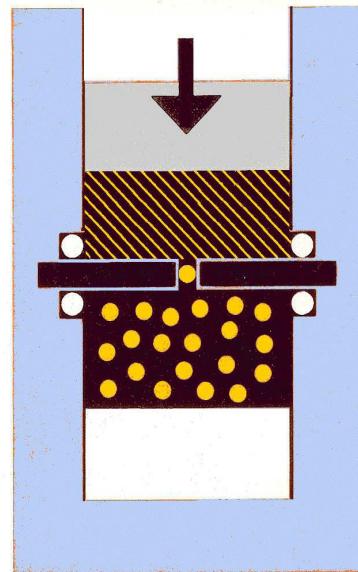
23

X-PRESS

A sejszuszpenziót fagyott állapotban préselik át egy furaton.

Hogyan lehetséges ez?

Kellően nagy (2000 – 6000) bar nyomáson a jég összenyomható, és így deformálható.



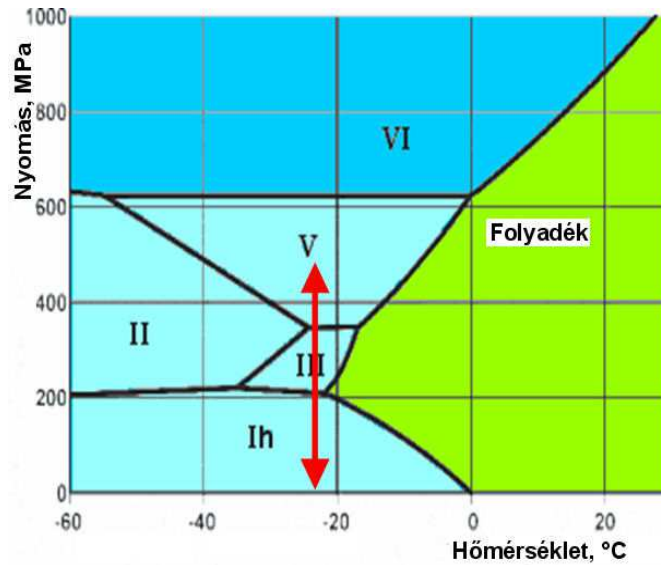
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

A JÉG FÁZISDIAGRAMJA

Az első hármaspont:
-22 °C, 211,5 MPa

A kristályok sűrűsége:
Jég-1 → 0,92
térf csökkenés: -19%
Jég-3 → 1,14
térf csökkenés: -7%
Jég-5 → 1,23



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

X-PRESS

Előnyök:

- Nagyon jó hatásfok
- Nincs denaturálódás, bomlás
- Nagyon tömény szuszpenziót is lehet kezelni

Hátrányok:

- Szakaszos
- Robosztus szerkezet
- Nem léptéknövelhető

X-PRESS Zellendesintegrator



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

FIZIKAI MÓDSZEREK

Szárítás:

A klasszikus hővel való szárítás egyrészt rossz feltárási határfokú, másrészt számos terméket denaturál. Inkább:

Fagyasztva szárítás (liofilizálás) (védőközeggel - törzseltartás, enélkül - sejtfeltárás) nincs denaturálódás

Oldószeres szárítás (acetonnal) készítés (kombinálható éterrel)



Fagyasztás – felolvasztás

Hősokk - vízben



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

FIZIKAI MÓDSZEREK

Ozmotikus sokk: nem sókkal, hanem neutrális vegyületekkel (glikolok, glicerin, glükóz)

Oldószerekkel:

- Szárítás acetonnal, majd éteres kezelés
- Élesztő autolízis toluollal

Detergenssekkel:

Beépülnek a sejtmembránba és rongálják annak szerkezetét.

- Kationos és anionos egyaránt
- Epesavak



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

FIZIKAI MÓDSZEREK

Dekompresszió

Henry törvény:

$$C^* = \frac{1}{H(t)} \cdot p_i$$

Nagy nyomáson sok gáz oldódik a folyadékban (a sejten belül is).

A nyomás csökkenésével az oldhatóság lecsökken – a gáz buborékok formájában távozik (szódavíz, keszonbetegség)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

ENZIMES MÓDSZEREK

Sejtfalat bontó specifikus enzimek

- baktériumok - lizozim
- élesztők - mannanáz (Yeast Lyase, *Cytophaga sp.*)
- penészek - kitináz, celluláz
- növényi sejtek - celluláz

Több komponensű készítmények

- csigaenzim - emésztőnedv
- *Trichoderma* indukált enzimek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

GENETIKAI MÓDSZEREK

Lizogén fágokkal
A lizogénia indukálható

Indukált autólízis, apoptózis

