

5. A végtisztítás műveletei

5.1	Affintechnikák.....	2
5.1.1.	Affinkromatográfia	3
5.1.2.	Affin-ultraszűrés	8
5.1.2.1.	Alkalmazások.....	9
5.1.2.2.	Lehetőségek és korlátok.....	9
5.1.3.	Affin-extrakció.....	10
5.1.3.1.	Technológiai paraméterek.....	11
5.1.3.2.	Alkalmazások.....	13
5.1.3.3.	Lehetőségek és korlátok.....	13
5.1.4.	Affin-kicsapás.....	13
5.1.4.1.	Affin-kicsapás homobifunkciós ligandumokkal	14
5.1.4.2.	Affin-kicsapás heteropolifunkciós ligandumokkal	14
5.1.5.	Szintetikus ligandumok.....	18
5.2	Elektroforézis technikák.....	21
5.2.1.	Free flow (szabad folyású) elektroforézis.....	22
5.2.2.	Gélelektroforézis.....	25
5.2.2.1.	Mintaelőkészítés	26
5.2.2.2.	Készülékek.....	27
5.2.2.3.	A gélek összetétele, fajtái	29
5.2.2.4.	A gélek kiértékelése	31
5.2.3.	Kapilláris elektroforézis	33
5.2.3.1.	Az elektroozmotikus áramlás (EOF).....	34
5.2.3.2.	Az elválasztás elve	36
5.2.3.3.	Műszaki paraméterek hatása	38
5.3	Porlasztva szárítás	40
5.3.1.	A porlasztó fejek kialakítása.....	43
5.3.2.	A cseppelpárolgás mechanizmusa	46
5.3.3.	Szemcseméret	48

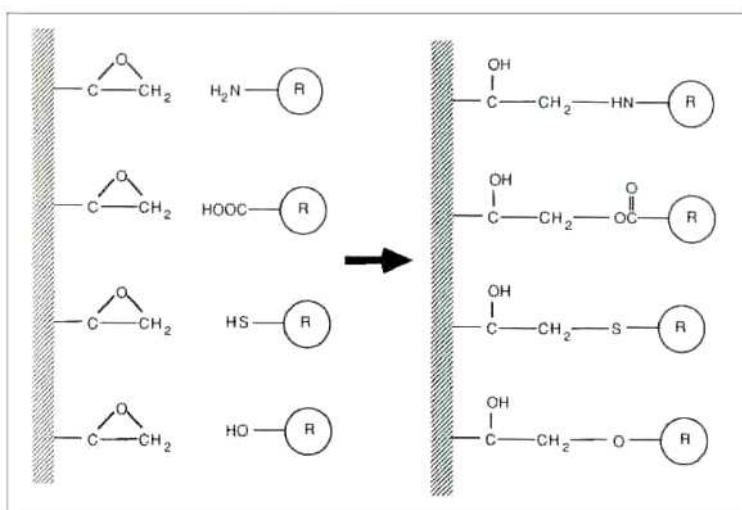
5.1 Affintechnikák

A komplex, biológiai eredetű elegyekből való tisztítást hagyományosan a különböző anyagok eltérő általános fizikai-kémiai tulajdonságain (méret, töltés, oldhatóság) alapuló elválasztási műveletekkel valósítják meg. A hosszadalmas tisztítás azonban megnöveli a veszteségeket és a költségeket. Számos génmanipulációval előállított fehérje esetében a tisztítás költségei eléri az önköltség 90 százalékát is. Így érthető, hogy általános a törekvés a híg oldatban lévő érzékeny termékek kinyerésére alkalmas új, hatékony tisztítási eljárások kidolgozására. Az utóbbi évtizedben számos eredményt értek el olyan tisztítási módszerekkel, amelyek a molekulák biológiailag aktív centrumai és a komplementer ligandumok közötti kölcsönhatáson alapulnak. A biokémiában számos olyan vegyületcsoport létezik, amelyek működésének lényege valamely partnermolekula specifikus felismerése és megkötése (1. táblázat).

Specifikus kötődésű reakciópartnerek	
Szubsztrátok, analógok koenzim, kofaktor, inhibitor	enzimek
Antigén	antitest
DNS	komplementer DNS
Effektor	receptor
Hormon, gyógyszer, stb.	karrier fehérje

1. táblázat Affin-kölcsönhatásra képes reakciópartnerek

Ezt a szelektív kötést úgy lehet elválasztási műveletként kihasználni, ha a partnerek egyikét valamilyen hordozón (szilárd tölteten, vagy oldható makromolekulán) megkötik, és ezt érintkeztetik a sokféle fehérjét tartalmazó feldolgozandó oldattal. A megkötendő aktív molekula (ligandum) és a hordozó összekapcsolására sokféle könnyen kivitelezhető kémiai reakciót dolgoztak ki (1. ábra).

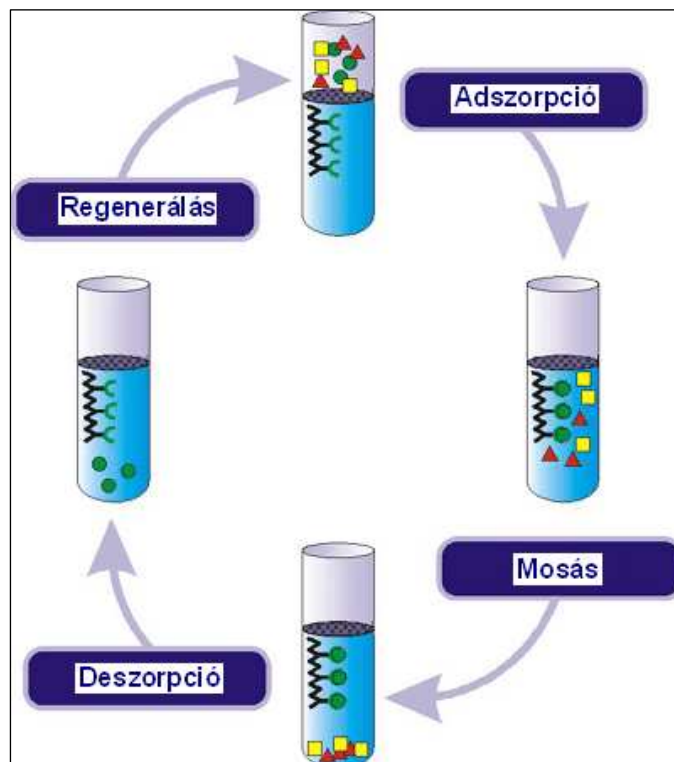


5.1. 1. ábra Különböző ligandumok kötése epoxi-hordozóhoz

Az affinkölcsönhatáson alapuló elválasztási műveletek mindegyike azonos lépéssorral működik, függetlenül attól, hogy milyen típusú hordozóhoz kapcsolódnak a ligandumok.

A ligandumokat tartalmazó anyagra felviszik a fehérjéket tartalmazó feldolgozandó levet. A sokféle fehérje közül a ligandumokon csak az az egy kötődik meg, amelyik szelektív kölcsönhatásra

képes. Az többi, szennyezésnek tekintett fehérje oldatban marad és kimosható a rendszerből. A következő lépésben egy más összetételű eluáló oldattal megbontjuk az affinkomplexet, azaz leválasztjuk a kötött fehérjét a ligandumokról. A tiszta fehérje oldatot kivezetjük a rendszerből, a ligandumok pedig újra felhasználhatók (2. ábra).



5.1. 2. ábra Az affín-elválasztások jellemző lépései

5.1.1. Affinkromatográfia

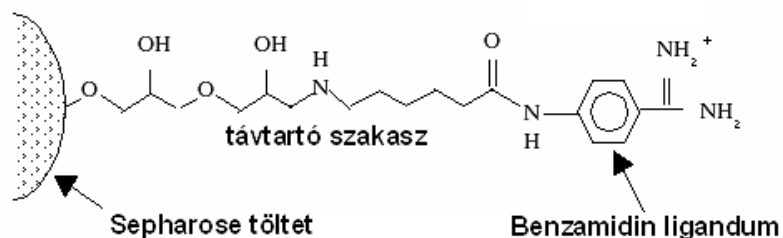
Az elv klasszikus - és hosszú időn keresztül egyedüli - alkalmazása az affinkromatográfia volt. 1968 óta, amikor az affinkromatográfia kifejezést először használták, sok száz különböző ligandumot azonosítottak és alkalmaztak kromatográfiai célokra. Még ma is az affinkölcsönhatáson alapuló eljárások nagyobb része oszlop-kromatográfiaiként működik, ahol a ligandumok a szilárd hordozó felületéhez kapcsolódnak kovalens kötéssel. Ilyen kromatográfiai rendszerek mind laboratóriumi, mind ipari méretekben működnek, bár a léptéknövelés nehézségekbe ütközik.

Egy szakirodalmi áttekintés szerint az affinkromatográfia a második legelterjedtebb kromatográfiai technika az ioncsere után. Gyakran mindkét módszer szerepel a közleményekben, így a gyakoriság elérheti a 60 %-ot is. A széleskörű alkalmazás annak ellenére alakult ki, hogy az alapelv gyakorlati megvalósításánál több korlátozó feltételt is figyelembe kellett venni. Az affinkromatográfia a gyakorlatban költséges és időigényes, a teljesítménye (feldolgozott oldat térfogat/töltet térfogat) más elvű kromatográfiaikkal összevetve korlátozott; a töltet élettartama rövidebb, az oszlop érzékenysége a szennyezőkre és az eltömődésre nagyobb, mint az egyéb eljárásoké. Mindezek együttesen meghatározzák a művelet helyét a feldolgozási technológián belül. Az affinkromatográfia tipikusan a downstream folyamat végső, nagy felbontású tisztítási szakaszába illik, nem alkalmazható pl. nyers fermentáléból való kinyerésre. Így érthető, hogy nem kapott nagy szerepet a fermentációs ipar bulk termékeinek feldolgozásában, alkalmazásai inkább a kisebb mennyiségű, de nagy értékű termékek (urokináz, interferon, antitrombin III) kinyerését célozták. A sok leírt alkalmazás tehát elsősorban laboratóriumi léptékre vonatkozik, illetve olyan termékekre, amelyek kis mennyiségben is komoly termelési

értéket képviselnek. Az affinkromatográfia felsorolt korlátainak lebontására több irányban is folyik kutatás és fejlesztés.

Az ár és élettartam vonatkozásában előrelépést jelent a szintetikus ligandumok alkalmazása. A kényes és nehezen hozzáférhető biológiai eredetű anyagok (fehérjék, antitestek, inhibitorok) helyett szintetikus úton előállított szerkezet-analógok beépítése ligandumként olcsóbbá teszi a töltetet és növeli az élettartamát. A klasszikus szintetikus szubsztrátanalógok (pl.: p-fenil-azofenol – tripszin, p-amino-szalicilsav – laktát-dehidrogenáz, meta-amino-benzamidin – tripszin) mellett egyre szélesebb körben alkalmazzák a triazin vázat tartalmazó ún. reaktív színezékeket (Cibacron sorozat, Procion sorozat). Ezek a textiliparban használatos színezékek nukleotid analógok, ezáltal az enzimek ATP és NAD kötőhelyeivel képesek kölcsönhatásba lépni. Sokféle enzimmel kapcsolódhatnak, így alkalmazási területük széles (oxido-reduktázok, kinázok, transzferázok) bár szelektivitásuk éppen emiatt nem tökéletes.

Az affinkromatográfia lassúságát és gyengébb hatékonyságát több tényező egyenkénti vagy együttes hatása okozhatja. Fellephet sztérikus árnyékolás, termodinamikai, kinetikai korlát és diffúziós gátlás. A két első tényezőt a ligandum megfelelő kialakítása befolyásolja. A térbeli hozzáférhetőség javul, ha a ligandum egy optimális hosszúságú kar végén, a hordozó felületétől megfelelő távolságra helyezkedik el (3. ábra).



5.1.1. 1. ábra Távtartó molekulaszakasz kialakítása

A termodinamikai viszonyok a fehérje-ligandum komplex keletkezésének sebességében, az egyensúlyi állandó értékében jelennek meg. A spontán biológiai folyamat általában gyors, és jó hatásfokú, így ennek reprodukálására célszerű törekedni. Minél inkább hasonlít a ligandum szerkezete a natív anyagéhoz, annál jobb lesz a komplexképzés (bár a kovalens kötés a hordozóhoz mindenképpen valamilyen mértékű változást jelent).

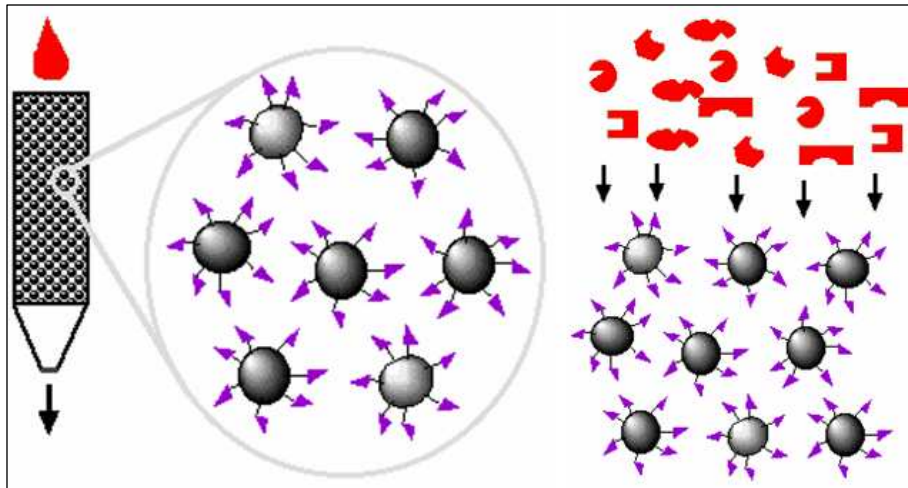
A diffúzió sebesség-meghatározó voltát a töltet porozitásának megfelelő kialakításával lehet megszüntetni. A fehérje molekulák viszonylag nagy mérete miatt a töltet pórusméretének is kellően nagyoknak és egyenletesnek kell lennie. Ez egyúttal megakadályozza azt is, hogy az affinkromatográfia mellett kizárásos kromatográfiai hatások is fellépjenek. A töltet anyagával szemben jelentkezik egy ellentétes igény is, a mechanikai szilárdság kérdése. A léptéknövelés (nagy oszlopok építése) illetve a nagy nyomásesés (nagy felbontású technikák) merev, szilárd tölteteket igényelnek. A két ellentétes igény közötti kompromisszumként sokféle, különböző célra alkalmazható hordozót fejlesztettek ki.

Más fejlesztési elképzelések gyökeresen szakítottak magával a kromatográfiával, mint technikával. Ezek vagy más műveletekben alkalmazzák a szemcsés hordozón kötött ligandumokat, vagy elhagyják a szilárd hordozót is, és vízoldható makromolekulákhoz kötött ligandumokat használnak. Az első megoldásnál a batch alkalmazások kétségtelen előnye a szinte korlátlan léptéknövelhetőség. Használatát az teszi lehetővé, hogy az affinkromatográfiai elválasztásoknál legtöbbször nem értelmezhető az elméleti tányérszám fogalma, ez a művelet sokkal inkább adszorpció, mint kromatográfia. Általában csak egy komponens kötődik, a többi a puffer kimossa. Az elúció leggyakrabban más összetételű oldattal történik, így a klasszikus elválasztási jellemzők (tányérszám, felbontás, retenció) nem értelmezhetők.

A másik lehetőség az oldatban szabadon megvalósított affinkomplex-képzés, ami a sztérikus és diffúziós korlátok megszüntetését jelenti. Jelentőségét még fokozza az egyszerű léptéknövelés.

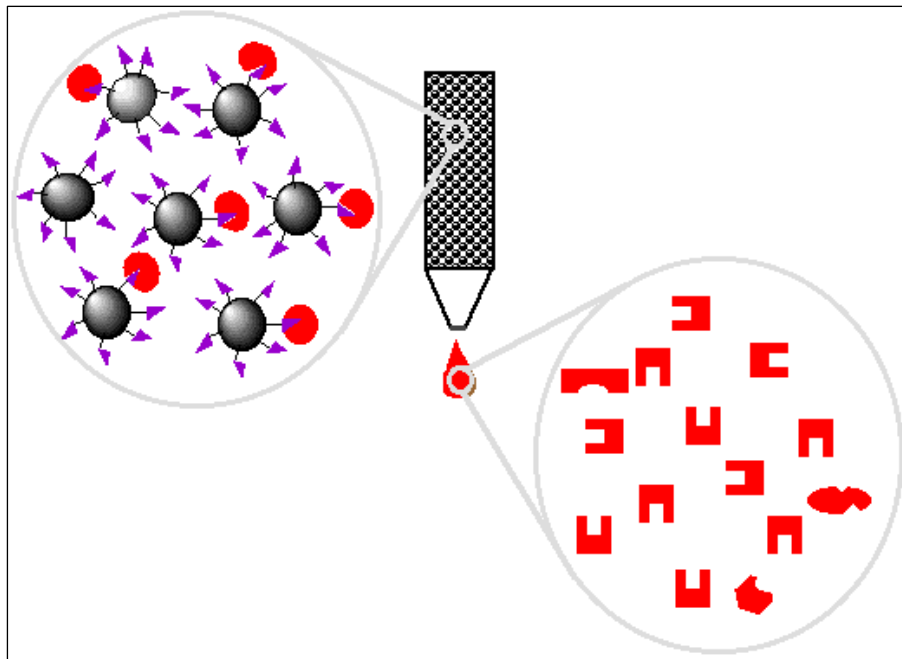
A tárgyalt műveletek tehát megtartják az affinkölcsönhatás nagy specificitását, ugyanakkor az elválasztás gyors, léptéknövelhető és könnyen irányítható. Nagy előnyük továbbá, hogy a feldolgozási sorban a végső tisztítás helyett már az első, elválasztási szakaszban is alkalmazhatók. Az alkalmazási példák között elsősorban a fermentációs termékeket és a nagyobb léptékben végrehajtott elválasztásokat tárgyaljuk.

A hagyományos affinkromatográfiában a termék szilárd hordozóhoz kovalens kötással rögzített ligandumhoz kapcsolódik (4. ábra).



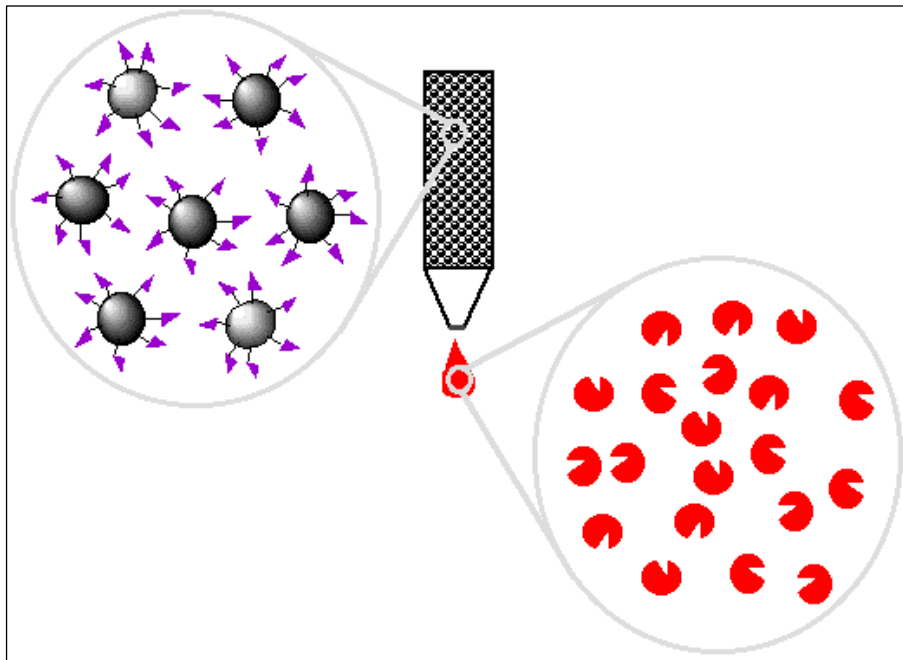
5.1.1. 2. ábra Affinkromatográfia-1

Az oldatban jelenlévő egyéb szennyező fehérjék kötődés nélkül áthaladnak a kolonnán (5. ábra).



5.1.1. 3. ábra Affinkromatográfia-2

Ezután következik az elúció, az eluens olyan körülményeket teremt (pH, ionerősség, hőmérséklet) ahol az affinkomplex disszociál, és a termék kilép az oszlopról (6. ábra).



5.1.1. 4. ábra Affinkromatográfia-3

Az affinkromatográfia működését az állóképeken túl grafikus animációval is bemutatjuk.

5.1.1. 1. animáció [Az affinkromatográfia működése](#)

A művelet fázisait áttekintve megállapíthatjuk, hogy az affinkromatográfia elnevezés téves, ez a művelet valójában oszlopban végrehajtott adszorpció. Hiányzik a komponensek vándorlása a töltet felületén. Nem értelmezhető a retenciós idő vagy térfogat, a kötött anyag akkor távozik a töltetről, amikor az eluenssel lemoszuk róla. A művelet célja nem több hasonló komponens szétválasztása, hanem egyetlen komponens elkülönítése az összes többitől, beleértve vizet is. A kromatográfiánál az oszlop kapacitásának csak néhány százalékát használjuk ki, az adszorpciónál – így az affinkromatográfiánál is - a telítésre törekszünk. Mindezek alapján a helyes megnevezés affin-adszorpció lenne, de a kromatográfia kifejezés annyira mélyen rögzült mind a magyar, mind a nemzetközi szaknyelvben, hogy megváltoztatására nincs esély.

Az affinkromatográfia gyakorlati, laboratóriumi megvalósítását a festékkromatográfia példáján videofelvételen is bemutatjuk (5.1.1. 1. video). A festékkromatográfiáról részletesen az [5.1.5. fejezetben](#) esik szó.

5.1.1. 1. video [Affinkromatográfia a gyakorlatban](#)

A művelet terméke általában tiszta, az egy lépésben elérhető tisztítási tényező értéke nagy. A hatékony tisztítás és a jó visszanyerési hatások azt sugallják, hogy ez a technika ideális a fermentált fehérjék kinyerésére, de a művelet alkalmazásánál és léptéknövelésénél az előzőekben felsorolt korlátozó tényezőket figyelembe kell venni. A korlátot hosszú időn keresztül nem is a folyamat

lassúsága jelentette, hanem az, hogy a nagy oszlopoknál a töltet szemcséi deformálódtak és ezáltal lerontották az áramlási viszonyokat.

A töltetnek számos, sokszor ellentmondó feltételnek kell megfelelnie:

- oldhatatlanság
- merevség
- permeabilitás
- makroszkópos jelleg
- hidrofil jelleg
- kémiai reakcióba vihető csoportok a ligandumok kötéséhez
- minimális mértékű nem-specifikus adszorpció
- ellenálló képesség a mikrobiológiai és enzimes lebontással szemben
- egyszerű előállítás vagy beszerezhetőség

Az affinkromatográfia (helyesebben affin-adszorpció) értékelését tömören összefoglalva a következőket állapíthatjuk meg:

Előnyök:

- nagy szelektivitás, azaz hatékony tisztítás
- nagy affinitás, azaz nagyon híg oldatokból is jó kihozattal lehet fehérjét kinyerni

Hátrányok:

- lassúság - a nagyméretű fehérje molekulák lassan diffundálnak
- rövid élettartam – a ligandumként használt biomolekulák hamar elbomlanak, vagy leválnak
- hozzáférhetőség – minden elválasztási feladathoz más töltetet kell kifejleszteni és előállítani, ezeket általában nem lehet készen megvenni.
- problémás a töltet anyaga – egyszerre kellene makropórusosnak és szilárdnak lennie

Bár a működési elv némileg eltérő, mégis ebben a fejezetben kell megemlíteni a Sartorius cég által kifejlesztett, ligandummal borított membránokat. A viszonylag olcsó reaktív színezékeket inert, szintetikus polimer membránokhoz (pórusméret: 0,45 μm) kötötték (7. ábra). Az így létrehozott szűrőben az áthaladó oldatból megkötődik a NAD vagy az ATP-kötő fehérje, ami egy második, elúciós lépésben leoldható. A membránok kapacitása meglepően nagy, tejsav-dehidrogenázzal kalibrálva 0,1-0,5 mg/cm^2 , stabilitásuk is jó, autoklávban sterilizálhatók.

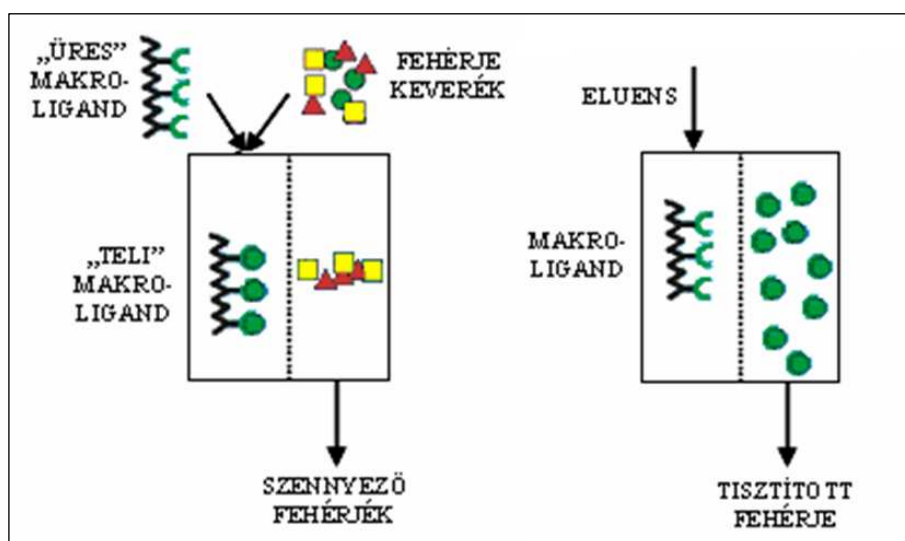


5.1.1. 5. ábra Festékligandumokkal borított szűrőmembrán

Nemcsak szűrőkorongok formájában gyártják, hanem üzemi léptékben is. Ez utóbbi felhasználáshoz egy félfolytonos berendezést is kifejlesztettek, amelyben az egyik dobról a másikra áttekeredő membránszalag egy szűrőkamrán halad át, ahol a folyamatosan bevezetett fehérje oldattal érintkezik. A membránon adszorbeált termék egy következő lépésben egy más összetételű oldattal akár ugyanabban a kamrában is eluálható.

5.1.2. Affin-ultraszűrés

Az affinkölcsönhatás és a membrános elválasztás kombinálásából jött létre az affin-ultraszűrésnek, vagy affin-keresztáramú szűrésnek nevezett művelet (8. ábra).



5.1.2. 1. ábra Az affin ultraszűrés elve

Az eljárás alapja egy olyan ultraszűrő membrán, amely a tisztítandó elegy minden komponensére áteresztő, beleértve a célterméket is. Az elválasztást úgy valósítják meg, hogy a kívánt terméket nagy mólsúlyú, de oldható polimeren kötött ligandumokkal (makroligand) kapcsolják össze. A szennyező anyagok átjutnak a membránon, míg a makroligand komplex már nem. Az így tisztított makroligand-termék komplex a második lépésben megfelelő „eluáló” oldattal disszociáltatható, és ugyanazon a membránon szűrve a fehérje és a makroligand elválasztható.

Az affinkötés létrehozása egyszerű. A nyers levét meg kell tisztítani a lebegő részecskéktől (centrifugálással vagy szűréssel), mert ezek zavarják a membránszűrést. Ehhez az oldathoz ugyancsak oldatban hozzáadva a makroligandot a komplex rövid idő alatt létrejön. Ehhez nem is szükséges külön reaktor, a szűrő terében is végbemehet a folyamat, ha megfelelőek a keverési viszonyok. A membrános elválasztás után a komplex megbontásánál az affinkromatográfiában bevált módszerek alkalmazhatók (pH-, ionerősség-, koncentrációváltozás), csak a harmadik partner, a membrán érzékenységét is figyelembe kell venni. A makroligand és a termék szétválasztása után a polimer újra felhasználható, de a recirkuláció előtt az oldat paramétereit vissza kell állítani az adszorpció számára kedvező értékre. Ezt is végre lehet hajtani egy külön ultraszűrési lépésben

5.1.2.1. Alkalmazások

Sikerrel alkalmazták az affin-ultraszűrést konkanavalin-A kinyerésére növényi magvak (*Concavalia ensiformis*) nyers extraktumából. „Makroligandumként” hővel előlt élesztősejteket (*Saccharomyces cerevisiae*) használtak. Az élesztő sejt falának szénhidrát láncain ugyanis a konkanavalin affinkölcsönhatással kötődik meg. Mosás után D-glükóz oldattal (0,8 M) eluálva jó tisztítást és kb. 70 %-os végső kitermelést lehet elérni. A komplexképzést a konkanavalin A ($M_s = 102$ kD) és az előlt sejtek (átlagos átmérő $5 \mu\text{m}$) között egy keverőkamrában valósították meg, a puffercserét és a disszociációt a membránegységben (vágás: 300-1000 kD) végezték. A szabad fehérjék könnyen átléptek a membránon, míg a sejtekre kötött anyagok visszamaradtak.

A mikrobiológiai termékek közül a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) alkohol-dehidrogenáz enzimének (ADH) preparálását írták le. Ligandumként Cibacron blue-t, egy nukleotid analóg szerkezetű reaktív színezéket immobilizáltak keményítő szemcsék felületére. A feltárt élesztősejt tömegből centrifugálással eltávolították a szilárd részecskéket, majd hozzáadták a makroligandumot. Az elválasztást 500 kD vágású hollow fiber szűrővel oldották meg, az elúciót koncentrált sóoldattal (0,55 M pufferrel) hajtották végre.

Hasonló elvet alkalmaztak az *Escherichia coli* béta-galaktozidáz enzimének tisztításánál is. A rendszer a folyamatos működés érdekében két szűrőelemet tartalmazott (adszorpció-deszorpció). Makroligandumként az affinkromatográfiás töltésként forgalmazott p-amino-benzil-1-tio-beta-D-galaktopiranoziddal szubsztituált agarózt használtak. A szemcseméret lehetővé tette, hogy az ultraszűrés helyett mikroszűréssel ($20 \mu\text{m}$ pórusméret) válasszák el a komplexet. A töltet részecskéit állandó rázatással tartották szuszpenzióban, és ezt a szuszpenziót keringették a két reaktor között. Az adszorpció pH = 7,3-nél, a deszorpció pH = 10-nél történt. *E. coli* sejt-homogenizátumból kiindulva az eredő kitermelés elérte a 70 %-ot.

5.1.2.2. Lehetőségek és korlátok

Úgy tűnik, hogy az affin-ultraszűrés elterjedését elsősorban a megfelelő makroligandumok hiánya gátolja. A szemcsékhez kötött ligandumok esetében ugyanazok a problémák lépnek fel, mint az affinkromatográfiánál. Segítség a flexibilisen kialakítható vízoldható makroligandumok kifejlesztése jelent. Minden termék, minden elválasztási probléma más és más megoldást igényel.

A hasnyálmirigy proteolitikus enzimeinek (tripszin, kimotripszin) elválasztásánál a dextránhoz kötött p-amino-benzamidin ligandum (tripszinre specifikus) nem volt sikeres, mert bár affinkomplex létrejött, de a dextrán alapvázra jelentős mennyiségű kimotripszin szennyezés kötődött nem-specifikus adszorpcióval. Tehát nem csak a ligandumok specifikitását kell szem előtt tartani, hanem az egész molekula tulajdonságait az elválasztási feladatnak megfelelően szükséges kialakítani. Ugyanerre a

célra a vízdoldható akrilamid polimerhez kötött ligandumok jobban beváltak. A beépített ligandumok mennyiségére vonatkoztatva a megkötött tripszin aránya nagy (120 g/g), ez gyakorlatilag száz százalékos kihasználást jelent, és jóval nagyobb érték, mint amit szilárd hordozóval elértek. Ráadásul a homogén fázisban végbemenő reakció sokkal gyorsabb, a komplexképzés gyakorlatilag pillanatszerű. A tripszin-ligand kötődés 0,5 M arginin oldattal könnyen bontható. Tripszin-kimotripszin 50-50 %-os keverékéből a tripszin szakaszos művelettel 90 %-os kitermeléssel és 98 %-os tisztaságban nyerhető ki. Hasnyálmirigy extraktumból hasonló elven, de folytonos műveletben az aktivitás 45 %-át nyerték ki és a termék elektroforetikusan homogénnek bizonyult.

Nagy lendületet adott a további fejlesztéseknek, hogy az affin-szűréssel jó elválasztás és nagy kihozatal érhető el, valamint az, hogy tisztítatlan és nagy viszkozitású oldatok is feldolgozhatók. Ez a technika a fermentlé feldolgozásának első szakaszában is alkalmazható. Egy kiválasztott új folyamat kialakításánál nem annyira a ligandumnak a makromolekulához való kötése okoz problémát, - erre számos kipróbált módszer áll rendelkezésre - hanem inkább a megfelelő ligandum kiválasztása, mivel ezen múlik a rendszer hatékonysága, specifikitása és élettartama is. Ha az alkalmazott makroligand kevésbé érzékeny a pH-ra, hőmérsékletre, nyíróerőre, stb., akkor szabadabban választhatjuk meg a technológiai paramétereket és hosszabb élettartamra számíthatunk. Ezeknek a feltételeknek elsősorban a szintetikus ligandumok felelnek meg, a biokémiai eredetű ligandumok általában érzékenyebbek és élettartamuk rövidebb.

Az affin-szűrés másik korlátja technológiai jellegű: kevés a megfelelő membrán, amelynek vágása, áteresztése, stabilitása, élettartama egyaránt kielégítő. A stabilitás elsősorban a tisztítás során alkalmazott anyagokra értendő, így a membránnak savas, bázikus, oldószeres közegeket viszonylag magas hőmérsékleten is tolerálnia kell. Az igényelt vágási érték nagy molekulatömegeknél helyezkedik el (10^5 - 10^6). Tömören fogalmazva az affin-ultraszűrésnél a membránnak a következő feltételeket kell teljesítenie:

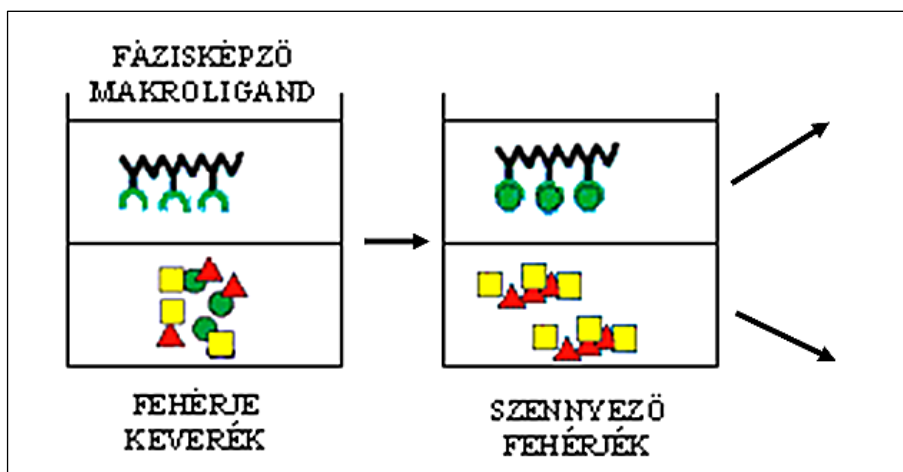
- nagy permeabilitás vizes közegre
- kémiai, mechanikai, és hőstabilitás
- egyszerű tisztíthatóság
- éles móltömeg szerinti vágás
- kis eltömődési hajlam
- hosszú élettartam
- sterilizálhatóság.

Külön ki kell emelni, hogy az eltömődés a biológiai levekkel végrehajtott membránműveletek egyik legnagyobb veszélye. Az affin-ultraszűrés esetében külön figyelembe kell venni a makroligand és a membrán esetleges kölcsönhatását. A makromolekulák adszorbeálódhatnak a membránszűrő felületére, ezáltal sajátos áteresztési paraméterekkel rendelkező ún. dinamikus membrán jön létre, aminek következtében a fluxus jelentősen csökken. A probléma más membrán műveleteknél is felmerül, és a megoldás is hasonló: a makromolekulákra és a membránra azonos előjelű elektrosztatikus töltést célszerű felvinni, ezáltal az adszorpció elkerülhető.

Az affin-ultraszűrés előnyeinek és nehézségeinek ismeretében valószínűsíthető, hogy elterjedésével számolhatunk a jövőben.

5.1.3. Affin-extrakció

A fehérjék és enzimek megoszlása a vizes kétfázisú rendszerekben jól ismert jelenség (ld. a 4.1.5.1. fejezetet). Ez a megoszlás nagymértékben befolyásolható, ha a fázisképző polimerekhez biospecifikus vagy csoportspecifikus ligandumokat kapcsolunk (9. ábra).



5.1.3. 1. ábra Az affinextrakció elve

Ha az összes fehérje túlnyomó része az egyik fázisban koncentrálódik, akkor a másik, "üres" fázis polimerjéhez a kívánt termékre specifikus ligandumot kötve, ez az egy fehérje dúsul fel ebben a fázisban.

A hagyományos vizes kétfázisú extrakciónál ahhoz, hogy egy lépésben kellő tisztaságot érjünk el, a termék K értékének meg kell haladnia a hármat, a szennyezéseknél pedig lehetőleg $K < 0,1$ -re kell törekedni. Affinkölcsönhatásra képes ligandumok beépítésével mindez tovább bonyolódik. Ezen esetben a megoszlás kvantitatív leírására a megoszlási hányadosok logaritmusának különbségét használják:

$$\Delta \log K = \log K (\text{ligandummal}) - \log K (\text{ligandum nélkül})$$

Jó hatékonysággal extrahálható egy enzim, ha a $\Delta \log K > 2$.

5.1.3.1. Technológiai paraméterek

A folyamatot befolyásoló paramétereket még csak a triazin-ligandumokra nézve vizsgálták szélesebb körben. Ezeknél a legfontosabb paraméterek:

1. A makroligand mennyisége a termékhez viszonyítva. A ligandum-koncentráció növelésével a $\Delta \log K$ egy telítési értéken állandósul.

2. A polimerek koncentrációja. A makroligandum koncentrációjának emelésével a megoszlási hányados értéke csak nagyobb koncentrációnál kezd el csökkenni, mint a szubsztituátlan polimereknél, így a különbség ($\Delta \log K$) növekszik.

3. Sók hatása. A jelenlévő sók általában csökkentik az affin-megoszlás mértékét. Erre a körülményre nem adható általános szabály, a hatás erősen változik az enzim, a ligandum, az ionok anyagi minőségének és koncentrációjának függvényében.

4. pH. A $\Delta \log K$ értékek erősen változnak a pH függvényében. Általában alacsony pH-nál ($\text{pH} < \text{pI}$) az affin-megoszlás mértéke növekszik.

5. Hőmérséklet. Általános tapasztalat, hogy a hőmérséklet növelésével a $\Delta \log K$ csökken. A vizsgálható tartomány $-2 - +60$ °C. A legtöbb enzim stabilitása a polimerek jelenlétében javul, így magasabb technológiai hőmérséklet engedhető meg.

6. Az egyes színezékek eltérő affinitással kötik az enzimeket, így a kötőcsoportok anyagi minősége is nagymértékben befolyásolja a megoszlást.

7. A polimerek móltömegének változtatásával befolyásolható a $\Delta \log K$ értéke, de ez csak szűk határok között mozog.

Az egyes fehérjék affin-extrakciója nem tervezhető pontosan, de a fenti szempontok figyelembe vételével tervezett, módszeres kísérletekkel optimalizálható.

Az eddigi fejtegetések és mérési eredmények egyszeri extrakcióra vonatkoztak. A tisztítási technológia hatékonysága nagymértékben javítható több extrakciós lépés összekapcsolásával, esetleg folytonosításával. Az adott feladatnak megfelelően többféle kiegészítő művelet jöhet számításba:

1. A nagy K értékű szennyezések eltávolítására előzetes extrakciót alkalmazhatunk ligandum nélküli PEG felső fázissal. Így némi termékvesztés árán a tisztaság lényegesen növelhető.

2. A szennyező anyagok mennyiségét célzottan csökkenteni lehet, ha az előzetes extrakciót egy másfajta makroliganddal hajtják végre, amely nem a termékre, hanem valamely nehezen elválasztható fehérjére specifikus.

3. A kihozatal tetszés szerint javítható az extrakció többszöri megismétlésével, a felső fázis cseréjével. Így az alsó fázisban alig marad enzim, viszont megnő a térfogat és az átvitt szennyezések mennyisége.

4. A tisztítás javítása érdekében viszont az extrakció után a terméket tartalmazó felső fázist célszerű többször mosni friss, fehérjementes dextrans oldattal. Az átvitt fehérjék közül elsősorban a kevésbé kötődő szennyezések oldódnak vissza, míg a termék nagyobb megoszlási hányadosa miatt csak kisebb mértékben oldódik. A felsorolt technológiai lépések tetszőleges variálásával sokféle, a lehetséges termékek széles körére alkalmazható, gazdaságilag optimált technológia alakítható ki.

Az extrakciós művelethez hozzátartozik még a termék elválasztása a fázisképző makromolekulától, és a polimer esetleges visszanyerése és újrafelhasználása is.

A felső fázisból a termék kinyerésére a legegyszerűbb és leggazdaságosabb módszer a só adagolás. Az elválasztott makroligandos fázishoz minimum 15 % szilárd foszfát sót adnak, amely pH = 7 - 9 közötti értéket eredményez (itt a $\Delta \log K$ érték kicsi). A sók hatására újabb két vizes fázis keletkezik, amelyben a fehérjék túlnyomó többsége az alsó, sóoldat fázisban dúsul fel. Az elválasztott alsó fázis diaszűréses vagy dialízises sómentesítés után tovább feldolgozható.

A másik lehetséges út a PEG-fázis többszörös hígítása kis koncentrációjú (pl. 5 mM) foszfát pufferrel. (A pH az előzőekhez hasonlóan 7-9). Ettől az affin kölcsönhatás visszaszorul, és az oldat viszkozitása is olyan mértékben lecsökken, hogy ioncserélő oszlopra vihető. A PEG és a fehérjék egy része nem kötődik az oszlopon, ezek pufferrel kimoshatók, majd a termék és a makroligand növekvő koncentrációjú sógradienssel elválasztható.

Általában a polimerek visszanyerése nehézkes és munkaigényes feladat, a tiszta anyagok magas piaci ára ellenére sem egyértelműen gazdaságos.

Az affinextrakció léptéknövelése - a vizes kétfázisú extrakcióhoz hasonlóan - nem ütközik nehézségekbe. Néhány literes nagyságrendben még rázótolcsérben is megoldható. Az egyensúly gyorsan beáll (kb. egy perc), a fázisok szétválása spontán 30 - 60 perc alatt következik be, ez az idő preparatív centrifugában enyhe centrifugálás mellett is néhány percre rövidíthető. Nagyobb térfogatoknál keverővel ellátott készüléket szükséges alkalmazni, a fázisok elkülönülése itt már több óráig is eltarthat. Ehelyett célszerű a vegyiparban használatos szeparátor centrifugák valamelyikét alkalmazni.

A művelet a hagyományos extrakcióhoz és a vizes kétfázisú extrakcióhoz hasonlóan folytonosítható, a folytonos üzem valamennyi előnyével együtt. A gyakorlatban a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz és a tejsav-dehidrogenáz folytonos affin-extrakcióját valósították meg.

Kulcskérdés a polimerek regenerálása és újrafelhasználása. A PEG és a ligand-PEG esetében ez megoldható, ha a felső fázis kevés fehérjét tartalmaz. A PEG tartalmú fázisból sómentesítés vagy kloroformos extrakció után a polimer újra felhasználható. Az alsó fázisképző regenerálása viszont nem gazdaságos, mivel túlságosan sok fehérjét, membránanyagot és sejttörmelékot tartalmaz. Valamelyes megtakarítást jelenthet, hogy a hidroxipropil-keményítő biológiailag jól lebontható anyag, sőt elfogadott takarmányadalék. Így a fehérjével és más sejtanyagokkal "dúsított" alsó fázis állati takarmányozásra használható.

5.1.3.2. Alkalmazások

Tripszin elválasztására vizes kétfázisú PEG-dextrán rendszert alkalmaztak. Ligandum a nélkül bevitt 10^{-4} M tripszin oldatból csak az aktivitás 40 %-át tudták a felső, PEG fázisból viszonylag tisztán kinyerni. Ha a PEG-hez p-amino-benzamidint (szintetikus szubsztrát analóg, egyúttal erősen kötődő inhibitor) kapcsoltak, az így létrehozott makroliganddal a kihozatal 92 %-ra növekedett.

Humán vérszérumból az albumin frakciót elválasztására a bevált PEG-dextrán rendszert alkalmazták, de a PEG molekulákat palmitinsav ligandummal szubsztituálták. Igen jó szelektivitást sikerült elérni, az albumin 90 %-ban a felső fázisban kötődött, míg az összes többi fehérje gyakorlatilag teljesen a dextrán fázisban maradt.

Triazin színezékek felhasználásával péklesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) glikolitikus enzimeit nyerték ki PEG-dextrán rendszerben. A glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz kb. 95%-os kihozattal nyerhető ki, a foszfo-frukto-kináz 58-szoros tisztítással és 67 %-os végső kitermeléssel preparálható.

A legnagyobb léptékű publikált gyártásban egy lépésben 45 kg *Candida boidini* sejtömeget dolgoztak fel egy 200 l hasznos térfogatú keverős extraktorban. A PEG-molekulákhoz Procion Red HE-3B ligandumokat kapcsoltak, ennek segítségével 450,000 egységnyi formiát-dehidrogenáz enzimet nyertek ki.

5.1.3.3. Lehetőségek és korlátok

Az affin-extrakció alkalmazását, elterjedését korlátozó tényezők nem annyira technikai, mint inkább gazdasági jellegűek. Műszakilag nem jelent problémát az egyszerű berendezések kialakítása, a léptéknövelés is könnyen megoldható. Nehézséget okoz viszont a fázisképző polimerek ára és a makroligandumok hiánya. A dextrán esetében az olcsóbb nyers termék nem megfelelő erre a célra, mivel nagy móltömege miatt nagy az oldat viszkozitása. A kisebb molekulájú frakciók kezelhető viszkozitású oldatot adnak, viszont költségesek.

Nagyobb léptékben csakis olyan ligand-polimer jöhet számításba, amely mérsékelt költséggel állítható elő. Ennek a feltételnek leginkább a triazin színezékekkel szubsztituált polimerek felelnek meg, és ezeket már sikeresen alkalmazták dehidrogenázok és kinázok kinyerésére.

A makroligandumok jelenleg a kereskedelemben nem kaphatók, előállításuk az alkalmazó feladata. Beszerezhetőek viszont olyan szubsztituált polimerek, amelyekhez egyszerűbben kapcsolhatóak a ligandumok (N-amino-dextrán, oktadecil-amino-dextrán, oktadecil-amid-dextrán, PEG-monopalmitát, etilén-diamin-PEG, trimetil-amino-PEG, PEG-szulfonát), viszont ezek ára is költségnövelő tényező. A ligandumokat tekintve a szintetikus molekulák ára és élettartama sokkal kedvezőbb, mint a biokémiai eredetű csoportoké, így a gazdasági kényszer ezeket tolja előtérbe, még ha szelektivitásuk nem is tökéletes.

5.1.4. Affin-kicsapás

Az affin-kicsapás során a szelektív ligandum-fehérje kölcsönhatást arra használják fel, hogy a létrejött komplex magától, vagy enyhe külső behatásra kicsapódjon, ezáltal a bonyolult fehérje-elválasztási probléma szilárd-folyadék fázisszétválasztási műveletté egyszerűsödik. A megfogalmazott feladat két, elvileg különböző úton valósítható meg. Az egyik út két, megfelelő hosszúságú molekulalánccal összekötött ligandum (homobifunkciós ligandum) segítségével hozza létre a csapadékot. A másik lehetőség az eddigiekben sokszor említett polifunkciós makroligandumon alapul, de ennek a makromolekulának olyan sajátosságokkal kell rendelkeznie, hogy a körülmények megváltoztatásának hatására kicsapódjon (heteropolifunkciós ligandum). Szintén affin-precipitációnak nevezik azt az eljárást is, amelyben az oldott fehérjék gélben mozognak koncentráció-gradiens (diffúzió), vagy elektromos tér (elektroforézis) hatására, ahol is affinkölcsönhatásra képes partnerrel találkozva kicsapódnak, a mozgás megáll, és az így létrejött zónák festési eljárásokkal láthatóvá tehetőek. Ez az eljárás csak vizsgálati módszer, elválasztási műveletként nem jöhet szóba.

5.1.4.1. Affin-kicsapás homobifunkciós ligandumokkal

Ez a technika az immunológiai csapadékképzési módszereket és az affinkromatográfiánál bevált kölcsönhatásokat kísérli meg egyesíteni. A két összekötött, egyforma ligandum (leggyakrabban NAD) két enzim megfelelő kötőhelyéhez kapcsolódik, ezáltal dimer fehérje jön létre. Mivel legtöbbször ez még oldható, csapadék csak akkor képződik, ha az enzimnek több kötőhelye is van (pl. önmagában is oligomer), és a kettős kapcsolatok rendszeréből egy nagy aggregátum alakul ki. Mindez behatárolja az alkalmazási kört, de ugyanakkor a lehetséges tisztítási és analitikai felhasználás mellett ezzel a módszerrel az enzimek molekuláris felépítéséről és alegységeiről is információt szerezhetünk.

A homobifunkciós csapadékképzés kritikus pontja a ligandum csoportokat összekötő szénlánc hossza. Ha a kötő szakasz túlságosan rövid, a molekula nem képes összekötni a két különálló fehérjét. Ennek különösen akkor van jelentősége, ha az aktív hely az enzim "felületének" egy "bemélyedésében" található. Ha az összeköttetés túl hosszú, felléphet a lánc "visszahajlásának" (az affinkromatográfiából is ismeretes) jelensége, ami a ligandum sztérikus árnyékolásával járhat. Hosszú molekulánál előfordulhat az is, hogy mindkét ligandum egyazon enzim aktív centrumaihoz kapcsolódik. Ez érdekes lehet az enzim struktúrájának megismerése szempontjából, de csapadék semmiképpen sem képződik. A legáltalánosabban használt ligandum az ún. Bis-NAD (N₂,N₂ adipinsav-dihidrazido-bis (N₆-karboximetil-NAD)) összekötő szakasza pl. 1,7 nm hosszúságú.

Sok enzimmél a különböző kötőhelyek szerkezete így kötőképessége is összefügg egymással. Így a dehidrogenázoknál a szubsztrát kötőhely és a NAD koenzim (helyesebben koszubsztrát) befolyásolják egymás aktivitását. Tejsav-dehidrogenáz esetében pl. a szubsztrát (piruvát) jelenlétében a ligandum kötés nagyságrendekkel erősebbé válik.

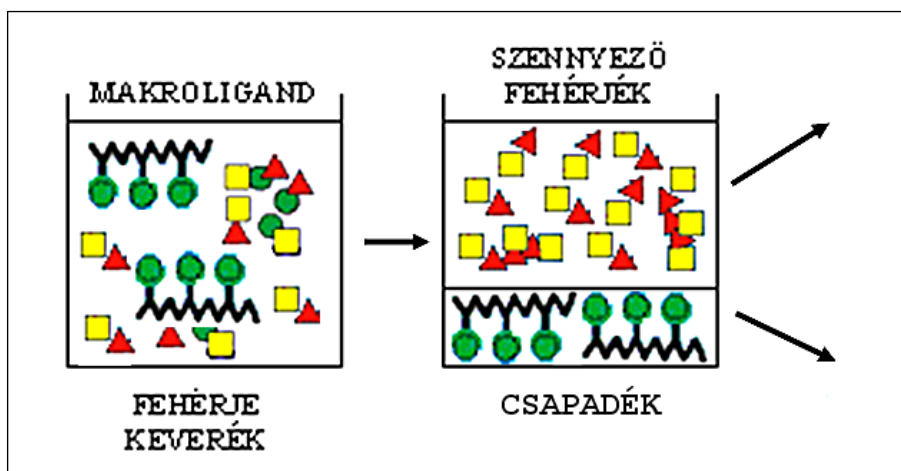
Fontos paraméter a ligandum-kötőhely arány is. Elvileg a sztöchiometriai egyenlőség esetén maximális a csapadékképzés, a gyakorlatban a sok alegységből álló enzimeknél (pl. glutamát-dehidrogenáz (GDH), amely hexamer) már jóval kisebb mennyiség is elegendő. A kicsapódott komplex megbontására a szabad ligandum (NAD) megfelelő koncentrációjú oldata használható. A feleslegben adott szabad ligandum oldatba viszi a fehérjét, amely ezután a kis molekulatömegű anyagoktól gélkromatográfiával választható el.

Alkalmazások A módszer - minden bizonnyal a homobifunkciós ligandumok magas ára miatt - eddig csak laboratóriumi méretekben terjedt el, a néhány grammos feldolgozott anyagmennyiség legfőljebb a preparatív jelzöt érdemli ki.

Legtöbbet a tejsav-dehidrogenáz (LDH) enzim tisztításával foglalkoztak. Vizsgálták a csapadékképzés paramétereit a bis-NAD vegyületekkel, és triazin színezékekkel. Ez utóbbiaknál nem egyszerűen két színezék molekulát kapcsoltak össze, hanem p-amino-benzolszulfonsav csoport bevitelével (szintén nukleotid-analóg) alakították ki a második ligandumként működő szerkezetet. A NAD-dependens enzimek közül vizsgáltak folytak a már említett GDH kicsapására is. Lektin jellegű bis-ligandumként alkalmazható az N,N'-bis-3-(dihidroxi-boril-benzil)-adipamid. A bórsav-vegyületek komplexképzésre hajlamosak a szénhidrátok vicinális hidroxil csoportjaival.

5.1.4.2 Affin-kicsapás heteropolifunkciós ligandumokkal

A módszer alapja egy kettős tulajdonságú makromolekula. Az egyik funkciója az, hogy affin-kölcsönhatásokra képes ligandumokat tartalmaz, ezáltal szelektíven magához kapcsolja a kívánt terméket. Ennyiben megegyezik az eddigiekben leírt makroligandumokkal. A második funkció abban áll, hogy ez a makromolekula a környezet enyhe megváltoztatására (pl. hőmérséklet, pH, ionerősség változás, keresztkötést létrehozó molekula megjelenése) kicsapódik. A csapadékképzésnek a fehérjék jelenlétében is végbe kell mennie, a változás pedig nem károsíthatja a termék biológiai aktivitását (10. ábra).



5.1.4.2. 1. ábra Az affinkicsapás elve

A csapadék létrejötte után azt el kell választani az oldatban maradt szennyezésektől (leggyakrabban centrifugálással, néha szűréssel vagy flotálással). A kimosott szilárd fázis megfelelő körülmények között újra feloldódik, és ebben az oldatban következik az affinkomplex megbontása, vagy a körülmények megváltoztatásával, vagy kompetitív vegyületek (pl. szubsztrát) bevitelével. Optimális esetben a makromolekula újra kicsapható, ezúttal a termék nélkül. Ezzel az egyszerű elválasztással egyrészt nagy tisztaságban kapjuk a terméket, másrészt a makroligand (némi mosás után) újra felhasználható.

A hagyományos affinkromatográfiával összehasonlítva az affin-kicsapás legnagyobb előnye a gyorsaságában rejlik, ami a nagyobb léptékeknél szembeűnő. Szabad oldatban a kapcsolat a ligandumok és a céltermékek között gyorsabban létrejön, mint a kromatográfiánál. Az első lépés a csapadékképzéssel együtt sem tart tovább egy óránál, az alkalmazott léptéktől függetlenül. Az affinkromatográfiánál a térfogatsebesség gyakran csak 50 ml/cm²h, ami 0,5 m kolonna-átmérő mellett azt jelenti, hogy 500 l oldat felvitele ~ 5 órába telik, az elúció is kb. ugyanennyi időt vesz igénybe, és ezekhez adódik még a mosás és regenerálás ideje is.

Különösen hasznos a precipitációs technika akkor, ha az érzékeny terméket gyorsan el kell távolítani a károsító hatású közegből (pl. proteázokat tartalmazó homogenizátumból). A kromatográfiás elválasztás általában csak a végső tisztításban kap szerepet, ahol már tiszta oldatokból kell kinyerni a terméket. A csapadékképzés viszont a feldolgozási technológia korábbi szakaszaiban is alkalmazható.

A disszociációs állandó szerepe: A műveletet befolyásoló paraméterek jelentősen eltérnek az affinkromatográfiánál felsoroltaktól. Homogén fázisban nincs szerepe a tömegátadásnak és a térbeli gátlásoknak. Fontosabbá válik ugyanakkor a disszociációs állandó, valamint az enzim- és ligandumkoncentráció. A rendelkezésre álló ligandumok száma a bevitt makroligand koncentrációjával változtatható. Homogén oldatban az affin-kölcsönhatás a következőképpen írható le:



Az egyensúlyi folyamatot jellemző egyensúlyi állandó:

$$K_e = \frac{(L)(F)}{(X)}$$

ahol: L - szabad ligandum koncentráció
F - szabad fehérje koncentráció
X - a létrejött affinkomplex koncentrációja

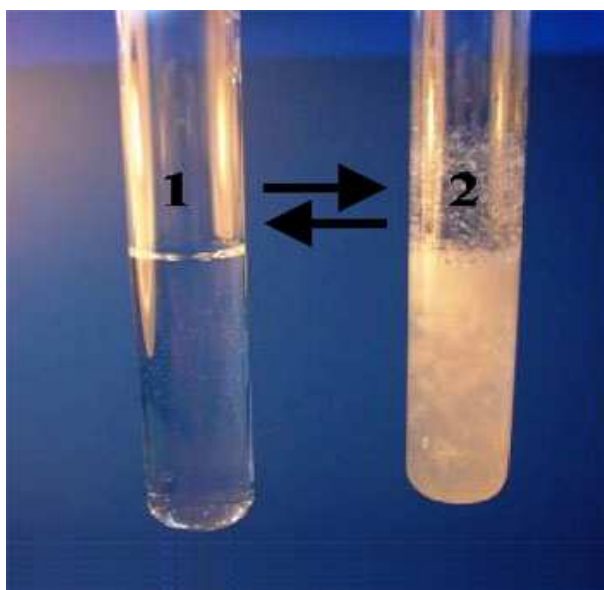
A fehérje feldolgozásnál a keresett enzim moláris koncentrációja általában nagyon kicsi, sokszor a 10^{-5} -t sem éri el. Ennek ellensúlyozására a teljes enzimmennyiség megkötéséhez nagy ligandum-koncentrációra lenne szükség, ennek beállítása azonban nehézségekbe ütközik. A hordozó makromolekulára csak korlátozottan lehet ligandumokat felvinni, az ösztömögnek csak néhány százaléka a ligandum. A makroligand oldat koncentrációja is csak néhány százalékos lehet, azaz a ligandumok moláris koncentrációja is kicsi. Így jó hatásfokú leválasztást csak akkor remélhetünk, ha a K_e értéke kisebb, mint L_0 , azaz lehetőleg 10^{-8} alatt van. Affin-kölcsönhatásoknál ilyen erős kötődés egyáltalán nem ritka.

A kicsapás körülményei Az affin-kicsapás egyik kényes pontja a csapadékképzés körülményeinek beállítása. A művelet során úgy kell megváltoztatni a paramétereket, hogy a ligandumokat hordozó polimer kicsapódjon. Ugyanakkor az enzim-ligandum komplex nem disszociálhat, és a szennyező egyéb fehérjék sem csapódhatnak ki.

A fehérjék kicsapása fizikai hatásokkal jól ismert, de nem eléggé specifikus eljárás. Megvalósítható pH-állítással (izoelektromos pont), kisózással (pl. ammónium-szulfáttal), oldószerrel (etanol, aceton), vagy ellentétes töltésű polielektrolit hozzáadásával. Az affin-kicsapásnál viszont nem maga a fehérje csapódik ki, hanem a ligandot hordozó polimer, ami merőben más megközelítést tesz szükségessé. A vízzoldható és egyszerűen kicsapható polimerek köre eléggé szűk, ezért könnyen áttekinthető:

A) Sav hatására kicsapódó polimerek. Ezek olyan gyenge savcsoportokat tartalmaznak, amelyek disszociációja erős savak (pH-csökkenés) hatására visszaszorul, és az ionizáció megszűntével oldhatóság erősen csökken. Így viselkedik például az N-akril-p-amino-benzoésav és akrilamid kopolimerizációjával létrehozott makromolekula. Megfelelő ligandum bevitelével pH = 8,0 -nál tripszin köthető meg, míg sav adagolására pH = 4,0 -nál a komplex kicsapódik. Más célra fejlesztették ki (gyógyszeripari drázsírozó segédanyag), de hasonlóan működik az EUDARGIT termékcsalád három tagja (L100, S100, L300). Ezek metakrilsav és akrilészterek kopolimerjei, oldhatósági határuk pH 5,5 - 7 közé esik. Természetes eredetű polimer az alginát, amely savas közeg (pH = 2,6), ill. Ca^{2+} ionok hatására kicsapódik. Amino-csoportjai miatt fordított viselkedésű a kitozán: bázikus körülmények között oldhatatlan, és pH = 6,5 alatt oldódik. A kitozán ligandum nélkül is alkalmazható, jól köti a lektin jellegű fehérjéket.

B) Hőmérséklet változás hatására kicsapódó polimerek. A hűtés következtében kicsapódó polimereket nem alkalmazták erre a célra, feltehetően az erős nem-specifikus adszorpció miatt. Melegítés hatására egyetlen vízzoldható polimer rendszer precipitál: a poli-(N-izopropil-akrilamid). A kritikus hőmérsékletkülöbség a biológiailag elfogadható tartományba esik, a homopolimernél 32 °C. Kopolimerizációval, illetve más paraméterek megváltoztatásával ez a hőmérséklet szinte tetszés szerint szabályozható.



5.1.4.2. 2. ábra Kézmeleg hatására kicsapódó *N*-izopropil-akrilamid

C) Ionerősség, polaritás változtatása. Az ionerősség növelésével egyes polimerek kicsaphatók, de nagy a kockázata annak, hogy a ligand-enzim komplex disszociál. Az affinkromatográfiánál tipikus elúciós módszer a sógradiens alkalmazása, és ugyanez a disszociációs hatás oldható hordozóknál is fellép. Emiatt a kicszást önmagában sehol sem alkalmazták. Részletesen vizsgálták viszont a poli-(*N*-izopropil-akrilamid) viselkedését a hőmérsékletváltozás és a sókoncentráció függvényében. Megállapították, hogy minden százalékos NaCl hozzáadásával 2,3 °C-kal csökken a kicsapódás hőmérséklete. Sóadagolás hiányában a kiváló polimer olyan kolloidot ad, amely gyakorlatilag nem izolálható, így kis mennyiségű só hozzáadására feltétlenül szükség van.

Egyes esetekben az oldószeres kicsapás is eredményes lehet. Pullulanáz enzim esetében a makroligandum maga a szubsztrát, a pullulán. Az enzim-szubsztrát komplex másfélszeres mennyiségű -8 °C-os etanol hozzáadására kicsapódik és elválasztható.

D) Specifikus, keresztkötések létrehozó ágensek alkalmazása. A ligandumokat hordozó polimerlánc kölcsönhatásba léphet más molekulákkal is, ami térhálósodáshoz és ez által csapadékképződéshez vezethet. Ilyen célra kihasználhatók pl. a szénhidrát-lektin kölcsönhatások. A Blue Dextrán-DLH komplex kicsapását Concanavalin-A hatására írták le.

A visszanyerés körülményei: Elvileg az lenne célszerű, ha úgy lehetne visszanyerni az enzimet, hogy közben a makroligand szilárd fázisban marad. Ez esetben a disszociáció és a komplex két komponensének fizikai szétválasztása egy lépésben valósulna meg. A gyakorlatban ez ritkán valósítható meg. A tripszin izolálásánál savas hatásra kicsapódó makroligandummal az enzim pH = 8-nál kötődik optimálisan, pH = 4-nél a komplex kicsapódik, és így elválasztható; tovább savanyítva pH = 2-nél disszociál, ezáltal a termék mintegy "lemosható" a csapadékról. A többi leírt esetben a disszociáció csak a komplex újraoldásával valósítható meg. A komplex bontására az affinkromatográfiánál bevált hatásokat alkalmazhatjuk. Nem specifikus elúciót lehet elérni növekvő sókoncentrációval, ami jól alkalmazható az affin-kicsapásnál is. Szelektívebb, bár drágább eljárás, hogy a kötőhelyért versengő molekulákkal bontják meg a komplexet. Erre több példa is akad: tripszin esetében az arginin vagy *m*-amino-benzamidin, a tejsav-dehidrogenáznál a NADH vált be legjobban.

Az affin-kicsapásos eljárások hatásfoka meglepően jó, a különböző szerzők 80-95 %-os visszanyerésről számoltak be.

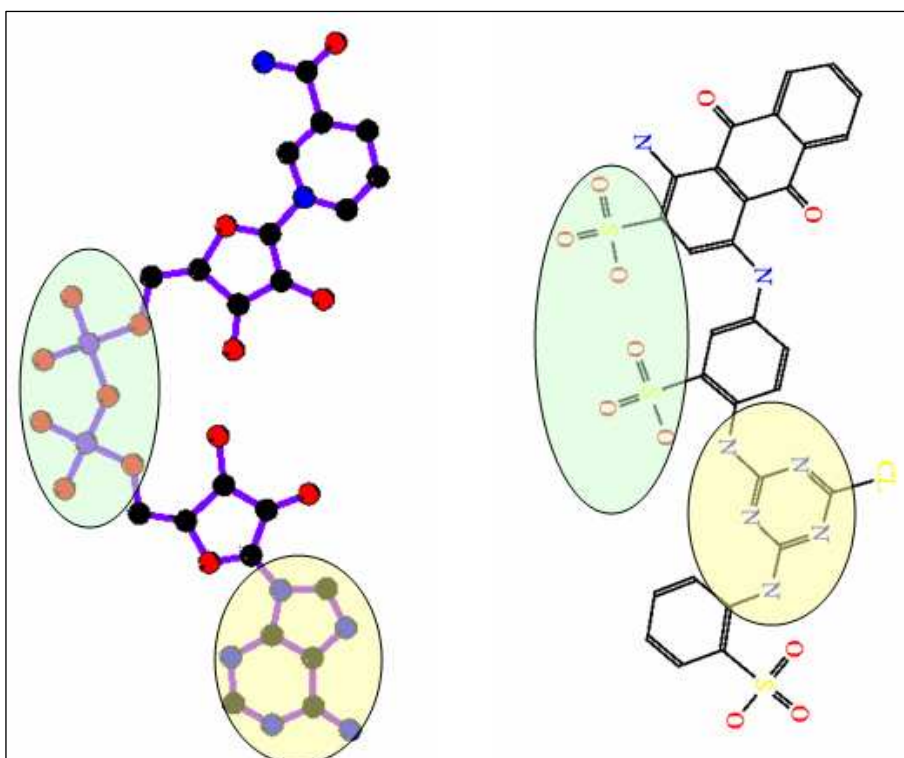
Lehetőségek és korlátok: Az eddigiek alapján látható, hogy az affin-kicsapás hatékony technika a preparatív enzimmtisztítás terén. Ez a művelet ígéri nagy léptékben a makroligandumok leggazdaságosabb alkalmazását a gyors és specifikus fehérje elválasztásban. Lehetségesnek tűnik, hogy az affin-kicsapás a fehérjék és egyéb biológiai anyagok nagyobb léptékű tisztításában szélesebb körben is elterjed, de a fejlesztés az affin-szűréssel és az affin-extrakcióval összehasonlítva mindmáig lassabb, pedig a technikának számos előnye van.

- Specifikus és egy lépésben jelentős tisztítást lehet elérni.
- Egy céltermék eltávolítása után az oldat tovább feldolgozható más termékek kinyerésére.
- A ligand-polimer újrafelhasználásával a folyamat gazdaságossá tehető.
- A homogén fázisban végbemenő ligandum-fehérje kölcsönhatás egyrészt gyorsabb, másrészt jobban kihasználja a bevitt ligandumokat.
- Nem igényel különleges berendezéseket
- A készülékek léptéknövelése sem okoz problémát.

5.1.5. Szintetikus ligandumok

Az affinelválasztások fejlesztésében tartós kutatási irány, hogy egyszerű szerkezetű, kémiai úton előállítható, robosztus, hosszú élettartamú ligandumokat találjanak az elválasztásokhoz.

A ligandum-fejlesztés egyik útja a festék ligandumok alkalmazása. Nevüket onnan kapták, hogy ezek a vegyületek eredetileg textilfestékek, és csak több évtizedes használat után ismerték fel biokémiai aktivitásukat. Ez a vegyület család a klór-triazin típusú festékek közé tartozik, amelyekről kiderült, hogy nukleotid analógok. Szerkezeti hasonlóságuk az adenint tartalmazó molekulákkal jól felismerhető (12. ábra).

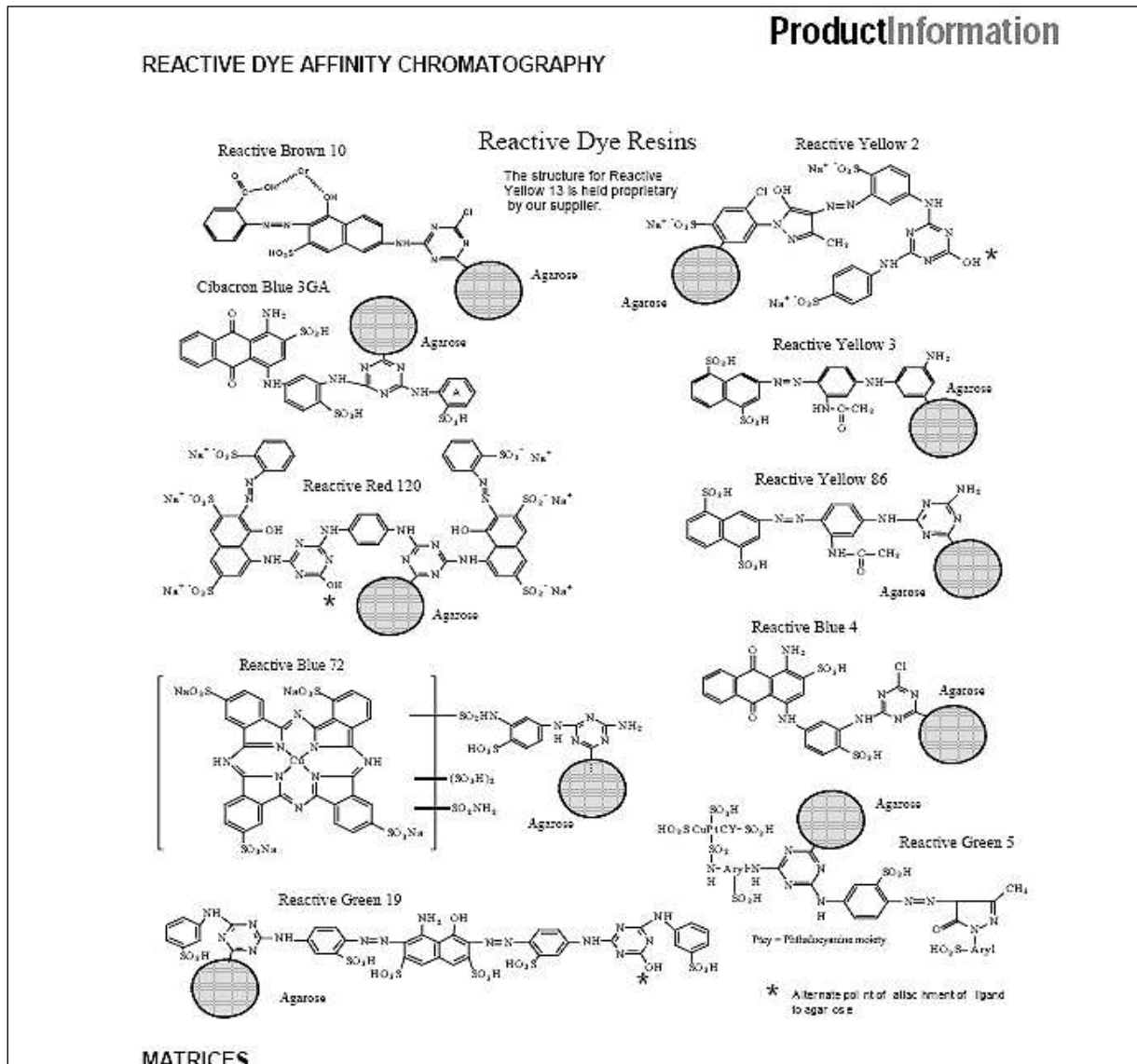


5.1.5. 1.ábra NAD és a Cibacron Blue F3G-A szerkezetének összehasonlítása

Mindkét vegyületben található egy öt nitrogén atomot tartalmazó heterociklusos részlet, valamint két erős savcsoport (a NAD-ban két foszforsav, a festékmolekulában két szulfonsav csoport).

Ezek a ligandumok mindazon enzimek megkötődhetnek, amelyeknek NAD (vagy ATP) kötőhelye van, tehát elsősorban az oxidoreduktázok, ligázok, kinázok, foszfortranszferázok, foszfodiészterázok, nukleinsav szintázok és nukleázok. A festékligandumok nem specifikusak egy bizonyos enzimre, alkalmazásukat már több száz fehérje megkötésére leírták. Az elválasztás szelektivitását más úton javíthatjuk:

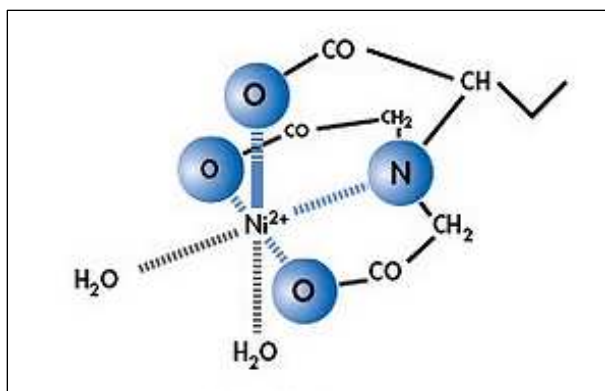
- a kötődés paramétereinek optimalizálásával (pH, ionerősség, koncentrációk, polaritás).
- a megfelelő festék-ligandum kiválasztásával (a Cibacron sorozat, és a Procion sorozat több tucat különböző molekulát tartalmaz, ezek közül néhányat mutat be az alábbi katalógusoldal, 13. ábra),



5.1.5. 2. ábra Festék ligandumok kémiai szerkezete (katalógus oldal)

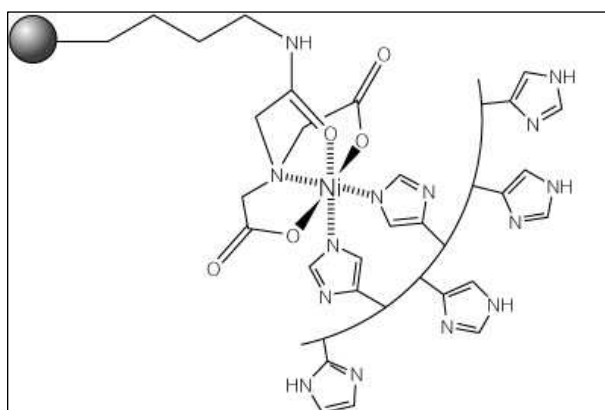
A ligandum fejlesztés másik eredménye fémkelát ligandumok kifejlesztése. Ez azon alapul, hogy a jó komplexképző fémek (Ni, Cu) hajlamosak a fehérjék hisztidin aminosavainak nitrogénjeivel kölcsönhatásba lépni. Egymás melletti hisztidinek [(His)_n szakasz] többszörös kapcsolódással stabil kötést létesítenek, ami lehetővé teszi a fehérje izolálását. Ehhez a fémionokat a „másik oldalról”

megfelelően rögzíteni kell a hordozóhoz. Erre a célra imino-triacetsavat, más néven nitrilo-triacetsavat alkalmaznak (14. ábra).



5.1.5. 3. ábra Ni-nitrilo-triacetsav ligandum

A Ni^{2+} ion hat lehetséges kötése közül négygel az imino-acetsav oxigén és nitrogén atomjaihoz kapcsolódik, a fennmaradó kettővel képes további kötésekre. Ide kapcsolódhat a hisztidinek nitrogénje (15. ábra).



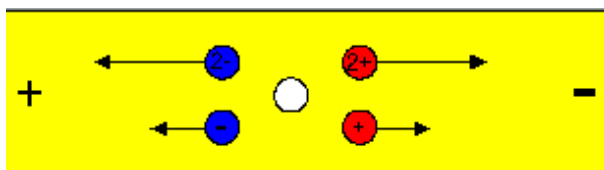
5.1.5. 4. ábra A $(\text{His})_n$ lánc és a Ni ligandum kapcsolódása

A természetben előforduló fehérjék között nem gyakori a poli-His szekvencia előfordulása. A rekombináns fehérjék előállításánál viszont módunk van a fehérjék aminosav sorrendjének szinte tetszés szerinti megváltoztatására (fehérje mérnökség – protein engineering). Ennek során viszonylag egyszerűen megoldható egy 6-12 hisztidint tartalmazó szakasz hozzáépítése a kívánt fehérjéhez. Az ilyen fehérjét azután igen hatékonyan és szelektíven választhatjuk el fémkelát kromatográfiás oszlopon. Ez az eljárás iskolapéldája annak, hogy a fehérje mérnökség nem csak a fehérjék gyártását (pl. szignál peptid beépítésével intracelluláris fehérjét extracellulárisá tehetünk), illetve a kész fehérje tulajdonságait változtatja meg, de a feldolgozást is egyszerűbbé teheti.

5.2 Elektroforézis technikák

Az elektroforézis olyan elválasztási technika, amelynek alapja az ionok elektromos térbeli mozgékonyasága. Az ionok vándorlási sebessége, elmozdulása különböző, ezért lehetséges az elválasztásuk.

Az elektroforézis alapfogalma az elektroforetikus mozgékonyaság. Induljunk ki egy részecskéből — ez lehet egy molekula, szervesetlen vagy szerves részecske, mikroorganizmus vagy egy emlős sejt — amely egy puffer oldatban található, homogén és állandó elektromos térben. Ha a részecske adott elektromos töltéssel rendelkezik, az elektromos térben elmozdul, méghozzá a felé az elektród felé, amelyik a töltésével ellentétes. A mozgató erő függ a molekula nettó elektromos töltéstől (q), és az elektromos térerősségtől (E).



5.2. 1. ábra Töltéssel rendelkező részecskék elmozdulása elektromos erőterben

Az elektromos térerősség gyorsítja a molekulát, a mozgással szemben azonban fellép a közegellenállás, ami fékezi az elmozdulást. A növekvő sebességgel egyre nagyobb lesz az ellenállás, míg a két erő egyenlővé nem válik. Ekkor (rövid gyorsuló tranziens szakasz után) a sebesség állandósul. A jelenség analóg a centrifugálással: ott is egy gyorsító erő, és a közegellenállás alakít ki egy állandósult vándorlási sebességet. Az erőegyensúlyt felírhatjuk

$$F_{\text{elektromos}} = F_{\text{közegellenállás}}$$

formában. Részletezve:

$$qE = 3d\pi\eta v$$

ahol: q – a molekula töltése
 E – a térerősség
 d – a molekula átmérője
 η – a közeg (puffer/gél) viszkozitása/térhálósága
 v – a molekula mozgási sebessége

A közegellenállás ebben a tartományban a molekula kerületével ($d\pi$) és a sebesség első hatványával arányos. Az állandósult mozgási sebesség tehát:

$$v = \frac{qE}{3d\pi\eta} = \mu E$$

Az anyagi jellemzőket egy paraméterben (μ = elektroforetikus mozgékonyaság) foglaltuk össze. A mozgékonyaság szempontjából fontos jellemző fehérjék nettó elektromos töltése, amit alapvetően a pH határoz meg (ld. 4.4.1.1. fejezet), de a környező puffer ionerőssége és más tulajdonságai is befolyásolnak. A másik, az adott molekulára jellemző paraméter a méret, ami átmérőként, pontosabban egyenértékű átmérőként szerepel az összefüggésben. Az elmozdulás, azaz az elválasztás tehát alapesetben két paramétertől függ: a töltéstől és a mérettől. Az egyes technikákkal elérhetjük, hogy csak töltés szerinti, vagy csak méret szerinti elválasztást valósíthassunk meg.

Az elektroforézis műveletét a futtató közeg jellege szerint több kategóriába sorolhatjuk:

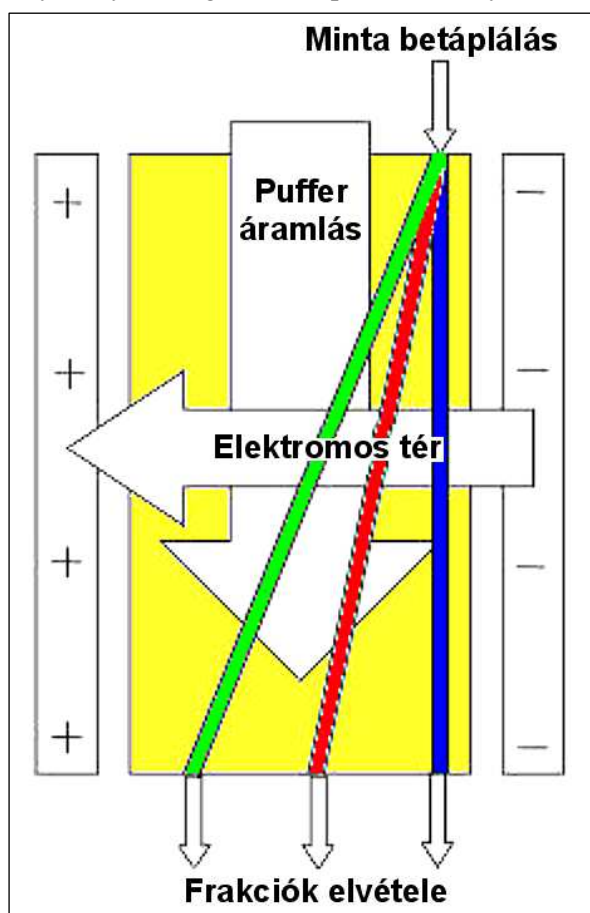
- free flow elektroforézis
- gélelektroforézis
- kapilláris elektroforézis

5.2.1. Free flow (szabad folyású) elektroforézis

A szabadon folyó elektroforézis (FFE) egy folyékony (nem gélesített) pufferben folyamatosan szeparálja a minta komponenseit. Ezért a FFE elválasztás esetén a minta komponensek nettó elektromos töltése a legfontosabb a mozgékonytató meghatározó tényezők közül.

A "szabadon folyó" kifejezés azt is jelenti, hogy a puffer folyamatosan áramlik, és az elválasztás is folyamatos. Az elválasztandó fehérje oldatot folyamatosan táplálják be, és a szétválasztott komponensek is folyamatosan távoznak.

Az elválasztás úgy jön létre, hogy a hordozó puffer egy lapos folyadékcellán áramlik át. Az áramlási kép ideális esetben teljesen homogén, párhuzamos és állandó sebességű. A cella egyik oldalán teljes szélességben folyik a puffer betáplálása, a szemben lévő oldalon pedig az elvétele. Az elvétel sok, szorosan egymás mellé helyezett csővégen/résen keresztül történik, így vezetik el az elkülönített frakciókat. Az elválasztandó mintát a belépési oldal egy meghatározott pontján keverik a pufferhez. A cella másik két oldalát alkotják az elektródák, amelyekre feszültséget adva az áramlás irányára merőlegesen homogén elektromos tér alakul ki. Ennek hatására a minta komponensek töltésüknek megfelelően elmozdulnak az egyik vagy a másik elektród felé (2. ábra).



5.2.1. 1. ábra A szabadon folyó elektroforézis működési elve

A molekula elmozdulása e két vektor eredője. Az áramlási sebesség, az ábrán függőleges irányú mozgás minden molekulánál azonos. Különbség a keresztirányú mozgásban van, ennek mértéke elsősorban a töltéstől függ.

A művelet technikai megvalósítása, a berendezés kialakítása bonyolult, sok szempontot kell figyelembe venni, sok nehézséget kell legyőzni. Az első mindjárt az *egyenletes áramlás* biztosítása. A lamináris áramláshoz a közeg csak nagyon lassan mozoghat. A laminaritás megtartása miatt a cella vastagsága nagyon kicsi, nem haladhatja meg a 2-3 mm-t. Emellett a betáplálást és az elvételt is igen egyenletesen kell megoldani, a szivattyúk okozta lüktetést is ki kell küszöbölni.

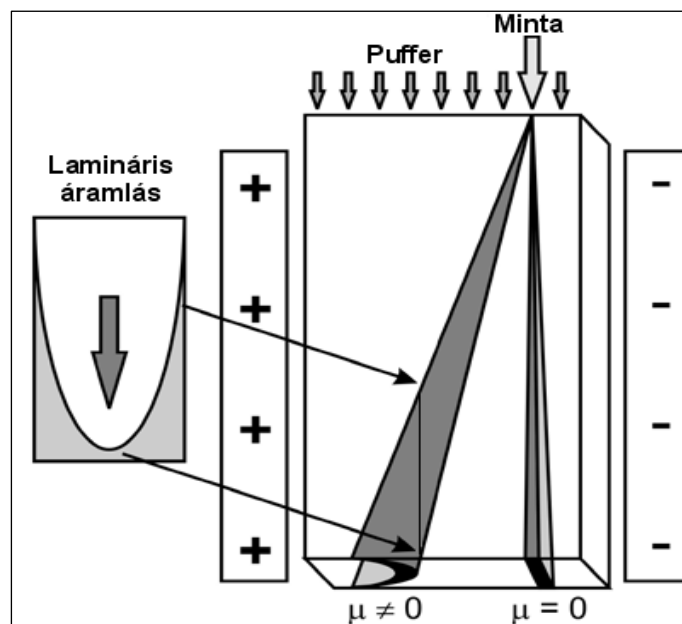
A FFE technika fejlődése során tisztázták az áramlást befolyásoló tényezőket. Ezt a problémát leíró dimenzió-mentes kritérium a Grashof-szám:

$$Gr = \frac{g\beta\Delta t d_n^3}{\eta^2}$$

ahol: g – nehézségi gyorsulás
 β – a hordozó folyadék hőtágulási együtthatója
 Δt – a folyadék és a fal hőmérséklet különbsége
 d_n – a kamra hidraulikus átmérője
 η – a folyadék kinetikai viszkozitása

A cella tartalmának összekeveredése akkor fordul elő, amikor a Gr szám meghalad egy kritikus értéket. Az FFE készülékek tervezésekor a d_n csökkentésével a Gr szám értéke a kritikus érték alatt tartható. Adott geometriájú FFE készülék esetén pedig az anyag és a fal közötti hőmérséklet különbség a legjelentősebb faktor. Csökkenthető a Gr értéke a közeg viszkozitásának (η) növelésével is, ezt például glicerin adagolásával érhetjük el.

A lamináris áramlási profil parabola alakja automatikusan a sávok alakjának torzulását okozza. A cella 2-3 milliméteres vastagságán belül kialakuló profil abból adódik, hogy középen a folyadék gyorsabban áramlik, míg a két fal mellett lassabban, sőt a falak melletti nagyon vékony filmben egyhelyben áll. Ha a folyadék nem keveredik, akkor a középső rétege gyorsabban elhagyja a cellát, míg a falak mellett a lassú haladás miatt hosszabb ideig tartózkodik benn. A keresztirányú eltérítés viszont függvénye a tartózkodási időnek. Hosszabb idő alatt messzebbre jut el oldalirányban a molekula, mint középen. Ez okozza a kilépésnél a sávok jellegzetes parabola, vagy patkó alakú deformációját (3. ábra).



5.2.1. 2. ábra A lamináris áramlás által okozott sávtorzulás

Az elektroforetikus elválasztás hatékonyságát a legkisebb oldalirányú szélesség, azaz az egyes komponenseket tartalmazó sávok élessége és a sávok közötti lehetséges legnagyobb távolság határozza meg. Az elválasztást rontó hatások:

1. Az elektromos áram által a közegben keltett melegedés, ami sűrűség gradiensek keletkezéséhez vezethet, és a folyadék keveredését okozza. Ez hűtéssel csökkenthető. A lapos cellát nagy felületén jól lehet hűteni, de ez növeli a Grashof számban szereplő hőfok különbséget, azaz rontja az áramlási képet. A jó elválasztáshoz szükséges térerősség 100-150 V/cm, a kamrára

kötött feszültség tehát ezer voltos nagyságrendű. A melegedés alacsony értéken tartásához az áramerősséget ~10 mV-ra kell csökkenteni. Ehhez a puffer vezetőképességét kell leszorítani, azaz híg, kis ionerősségű puffereket kell alkalmazni.

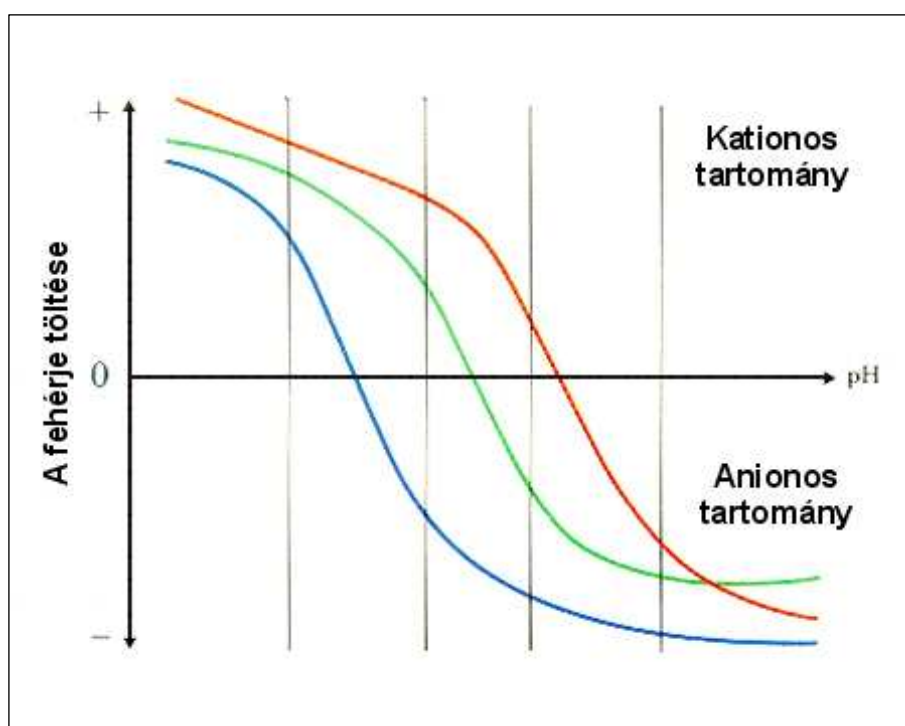
2. Komponensek diffúziója. A diffúziós állandó növekszik a hőmérséklettel, tehát emiatt is hűteni kell a cellát. Csökkenthető a diffúzió a közeg viszkozitásának növelésével, a glicerinnel adagolás ebből a szempontból is előnyös. A diffúziós sávészéledésben szerepe van még a tartózkodási időnek is. Általában 2-5 perces tartózkodási időt állítanak be, ezalatt elfogadható mértékű a diffúzió.
3. Elektroozmózis. A jelenséget részletesebben a kapilláris elektroforézisnél tárgyaljuk, itt csak röviden annyit, hogy a cella két síklapjának felületén a pozitív ionok kettősréteget alkothatnak, és ez az ionréteg nagy térerősség hatására a katód felé "csúszik", és víz molekulákat ragad magával, ezáltal felületi keresztirányú áramlást hoz létre, ami torzítja a sávokat. A jelenség csökkentésére nem-ionos jellegű anyagokat használnak a cellák építésénél, üveg helyett például teflont.
4. Az összetevők adszorpciója a belső falra vagy a készülék más részeire.
5. A vizsgált fehérje kicsapódása, melyet a szeparációs puffer összeférhetlenségi reakciói pl. pH, ionerősség és bizonyos ionok okozhatnak.
6. A hordozó pufferben oldott gázok, mely buborékok keletkezéséhez vezethet a szeparációs kamrában. Ezek megzavarják a homogén áramlási képet. Védekezésül a használt puffereket ugyanúgy gázmentesíteni kell, mint a HPLC oldószereket (ultrahanggal, vagy hélium átbuborékolásával).
7. A hordozó puffer és a minta közötti sűrűség vagy viszkozitás különbségek a komponensek rossz keveredését és ennek következtében a sávok kiszélesedését okozzák. Célszerű a mintát is a hordozó pufferben – azonos glicerinnel tartalommal – feloldani.

Az 1. táblázat a zavaró hatások következményét és azok lehetséges kiküszöbölését tartalmazza.

Zavaró hatás	Okozott hiba	Tennivalók
Szabad áramlás	Sávkiszélesedés	- a Gr szám csökkentése -a hordozó puffer elektromos vezetőségének csökkentése
Diffúzió	Sávkiszélesedés	-hőmérséklet csökkentése -a hordozó folyadék viszkozitásának növelése
Elektroozmózis	Sávkiszélesedés	- a készülék falának bevonása
Adszorpció	Fehérje veszteség	- a készülék falának bevonása - detergens alkalmazása
Kicsapódás	Fehérje veszteség Sávkiszélesedés	- a puffer-rendszer megváltoztatása - detergens alkalmazása - stabilizátor
A hordozó puffer gázosodása	Áramlás instabilitása	-a hordozó pufferbe N ₂ , He bekeverése -a hordozó puffer vákuum kezelése
Sűrűség különbség	Áramlás instabilitása Sávkiszélesedés	- más puffer választása - semleges anyagok adagolása

1. táblázat FFE elválasztás technikai problémái és kiküszöbölésük.

A technikai részletek elemzése után közelítsük meg más oldalról is a műveletet. Milyen pH értéken célszerű végrehajtani az elválasztást? A szétválasztás elsődlegesen a molekulák töltése szerint történik, és csak kis hatása van móltömegnek. Tehát olyan puffert kell választani, amelyben nagy a molekulák közötti töltéskülönbség. Erre nézve információt a fehérjék korábban már elemzett pH – töltés görbéi (titrálási görbék) adnak (4. ábra).



5.2.1. 3. ábra Fehérjék töltése a pH függvényében

Az ábrán bejelölt függőleges vonalak egy-egy pH értéknél segítik a töltések összehasonlítását. Ezeken olvasható le a töltéskülönbség is. A két szélső értéknél a három fehérje titrálási görbéi nagyon közel futnak egymáshoz, így nem számíthatunk jó elválásra. A két középső értéknél viszont a különbség nagy, tehát az egyes komponensek jól elválnak egymástól. Sőt az előjelük is különböző, ami azt jelenti, hogy a cellában ellentétes irányba fognak vándorolni, ami tovább javítja az elválasztást.

Tömören összefoglalva ez eddigieket a következőképpen határozhatjuk meg a FFE helyét a műveletek palettáján:

Nagy előnye a műveletnek, hogy folytonos üzemben működtethető akár napokon keresztül is.

Hátránya ugyanakkor, hogy bonyolult és drága készülék, ami nem léptéknövelhető, egy cella csak 40- 200 mg/óra fehérjét képes szétválasztani. A léptéknövelés egyedüli lehetősége, hogy egy kiszolgáló berendezés (tápegység, szivattyúk) több cellát is tud működtetni egy időben.

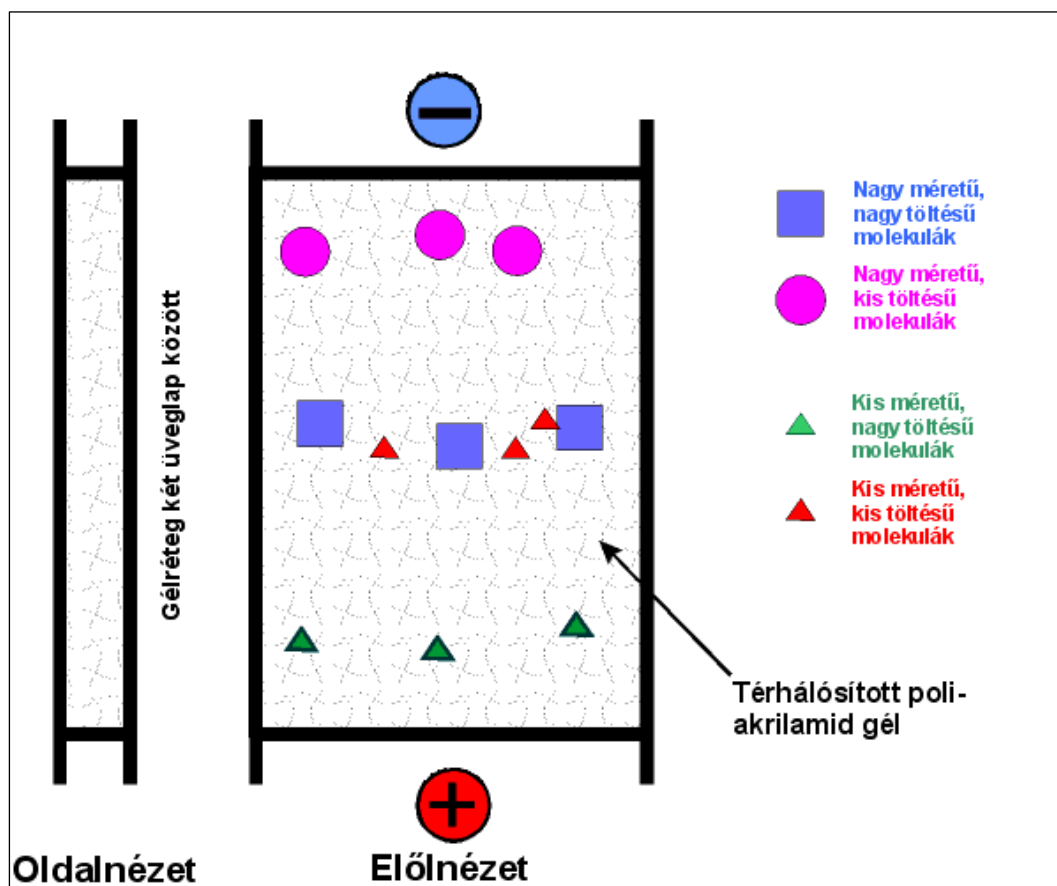
5.2.2. Gélelektroforézis

Az elválasztó puffert ebben a változatban egy hidrogél immobilizálja. A közeg nem áramlik, de nem is léphetnek fel benne zavaró áramlások. A gél anyaga az esetek döntő többségében térhálósított poli-akrilamid, illetve agaróz.

A molekulák (jellemzően fehérje vagy DNS) mozgására ugyanazok a már tárgyalt törvényszerűségek hatnak, mint az előzőekben, de közeg viszkozitása helyett a gél közegellenállását kell figyelembe venni. Az elektroforézis alapesetében a molekulák mindkét irányban, mindkét pólus irányában mozoghatnak. A gélelektroforézisnél a gél hosszának teljes kihasználása érdekében arra törekednek, hogy a molekulák csak egy irányba mozogjanak. A mintát jellemzően nem a gél közepére, hanem az egyik szélére viszik fel, és a gél teljes hosszában futtatják. Ehhez az kell, hogy minden molekula azonos – tipikusan negatív – töltésű legyen. A DNS fragmensek elválasztásánál ez nem probléma, hiszen azok savas karakterűek. A fehérjéknél kicsit bonyolultabb a helyzet, ezeket a

körülmények alakításával lehet anionossá tenni. Az egyik eljárás a pH növelése, amitől minden fehérje, amelyre fennáll a $pH > pI$ anionosan disszociál. Alkalmazzák még az SDS kezelést is, a részleteit ld. később.

A másik zavaró tényező az, hogy az elektroforézis alapesetben méret és töltés szerint választ szét (5. ábra). Ez a kettősség zavaró tényező, ezért a technikai megoldásoknál arra törekednek, hogy a töltés hatását elnyomják, és csak méret határozza meg a futási távolságot.



5.2.2. 1. ábra Elválasztás gélelektroforézissel

5.2.2.1. Mintaelőkészítés

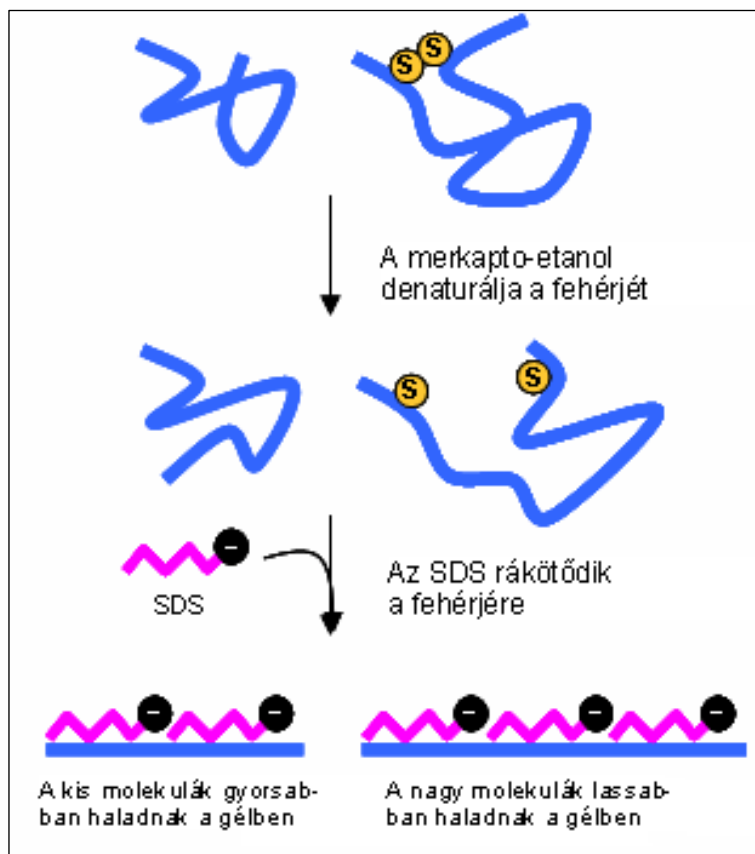
A vizsgálandó fehérjét a géltre való felvitel előtt „maszkírozzák” és „denaturálják”. A minta-előkészítés során beállítják a minta sűrűségét/viszkozitását, glicerint vagy cukoroldatot hozzáadásával.

A gélben vándorló fehérjék szintelenek, még akkor sem láthatók, ha a gél üveglapok fedik. A futtatás előrehaladását csak akkor tudjuk nyomon követni, ha egy színes, jól látható, kis molekulájú markert adunk a mintához. Ez általában bróm-timolkék, de más festék is megfelel. Mivel kis molekula, ez halad a gélben leggyorsabban, a fehérje frakciók előtt.

A denaturálás ebben az esetben azt jelenti, hogy a fehérje molekula szerkezetét rögzítő diszulfid hidakat redukáló tiol-vegyületekkel felbontjuk. Erre a célra merkaptó-etanol, vagy ditio-treitolt használnak.

A maszkírozás SDS (nátrium-dodecilszulfáttal) történik. Az SDS anionos detergens, a fehérje molekulák felületére kötődik. A pozitív ionos csoportokkal ionpárt alakít ki, ezzel leárnyékolja ezeket. A negatív ionos csoportokat szabadon hagyja, a fehérje felszínén lévő apoláris felületekhez pedig az alkiláncával tapad, van der Waals-kötésekkel. A molekula másik végén lévő szulfonsav csoport

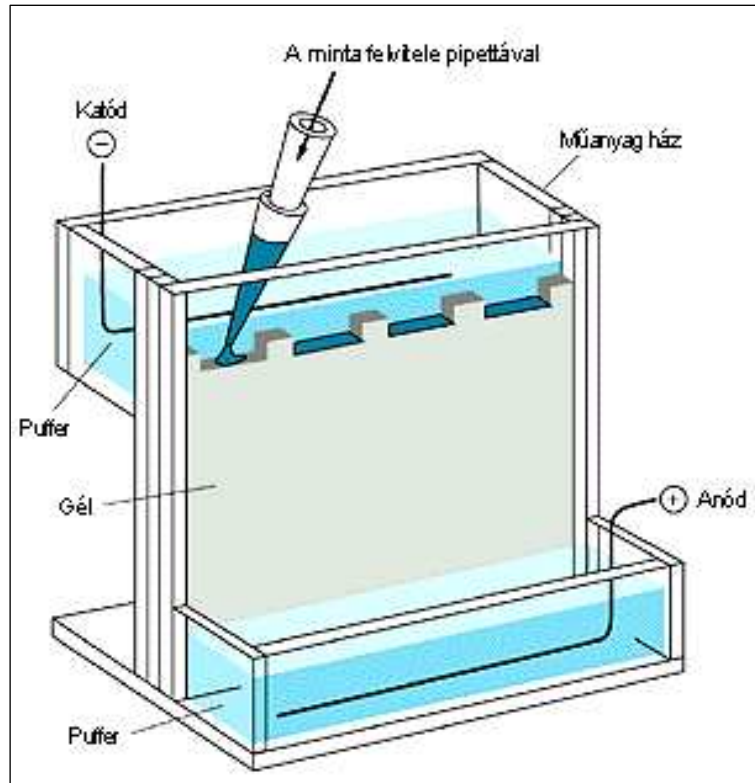
negatív töltéseket kölcsönöz a fehérjének. Az adalékok és reagensek hozzáadása után a mintákat „befőzik”, öt percre forrásban lévő vízfürdőbe állítják, ez alatt végbemennek a reakciók (6. ábra). Mindennek eredményeképpen minden fehérje anionos jellegűvé válik, mindegyik fehérje frakció az anód felé fog vándorolni. Az elválasztásnál a töltés jelentősége megszűnik, csak a molekula mérete szabja meg a futási sebességet. Az SDS a névadója ennek a módszernek: SDS-PAGE = Sodium-Dodecil-Szulfát-Poli-Akrilamid-Gél-Elektroforézis.



5.2.2.1. 1. ábra Az SDS mintaelőkészítés folyamata

5.2.2.2. Készülékek

A géllal közvetlenül érintkező egység két párhuzamos, átlátszó lap (üveg, vagy műanyag), a köztük lévő 1-5 mm-es távolságot a keret állítja be. A gél két szélére a feszültséget nem közvetlenül a fém fegyverzetek vezetik, hanem elektrolit kádakon keresztül jut el a gél teljes szélességében (7. ábra).



5.2.2.2. 1. ábra Géltartó egység

A hajtóerőt szolgáltató térerősséget egyenáramú tápegység biztosítja (50 – 500 V). A feszültséget a programozható szabályozó egység kontrollálja, és a betáplált program szerint változtatja. A futtatás előrehaladását nem időben, hanem (Volt * óra) egységekben adják meg. Ezzel változó feszültségű programok, illetve különböző készülékek is összehasonlíthatók. A készülékhez gyakran tartozik hűtő egység is, mivel az átfolyó áram hőhatása túlmelegítheti a gélt.



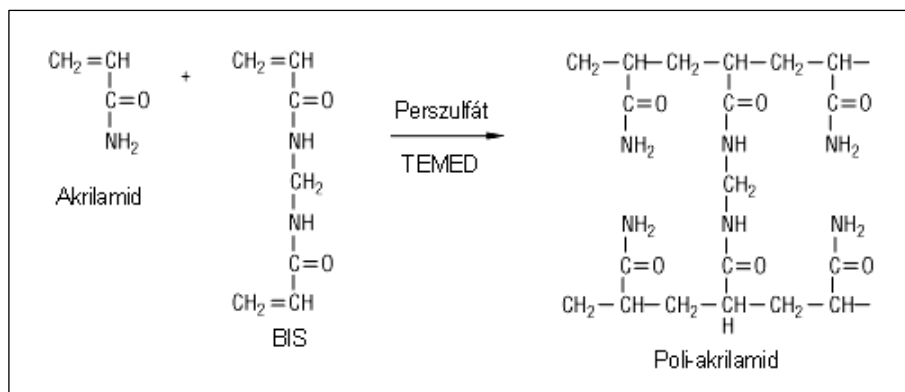
5.2.2.2. 2. ábra Gélelektroforézis berendezés (katalógusfotó)

A hőteljesítmény függ a gélbe zárt puffer összetételétől. A koncentráltabb sóoldat jobban vezeti az áramot, a nagyobb áramerősség pedig melegevé teszi. Magasabb hőmérsékleten pedig:

- erősödik a sávok diffúziója, ami miatt romlik a felbontás
- melegen gázbuborékok jelennek meg a folyadékban (ezért szokták a puffert gázmentesíteni)
- a melegedés sosem egyenletes, rendezetlen diffúziót vagy áramlást okoz

5.2.2.3. A gélek összetétele, fajtái

Az elterjedt poli-akrilamid géleket legtöbbször a laboratóriumban, közvetlenül a felhasználás előtt készítik el. Az akrilamid polimerizációjával lineáris láncokat kapunk, ez vízoldható polimer, nem képez gél. A gélképzéshez bifunkciós monomerrel, bis-akrilamiddal kell kopolimerizálni, ez keresztkötéseket képez a lineáris láncok között. A bis-akrilamid részarányával (pl. 4, 8, 12 %) jellemezhetjük a gél térhálóságát, azaz közegellenállását. A gél előállításra jól bevált recepteket találunk, mindegyikben szerepel a TEMED (= tetrametil-etilén-diamin), a reakció katalizátora. Szükséges még egy iniciátor (rendszerint ammónium-perszulfát). A polimerizáció csak oxigénmentes közegben megy végbe, ezért a reakcióelegyből ki kell űzni a légköri oxigént. Ezt inert gázzal (nitrogén, argon) való átbuborékolással oldhatjuk meg.



5.2.2.3. 1. ábra A poli-akrilamid gél kialakítása

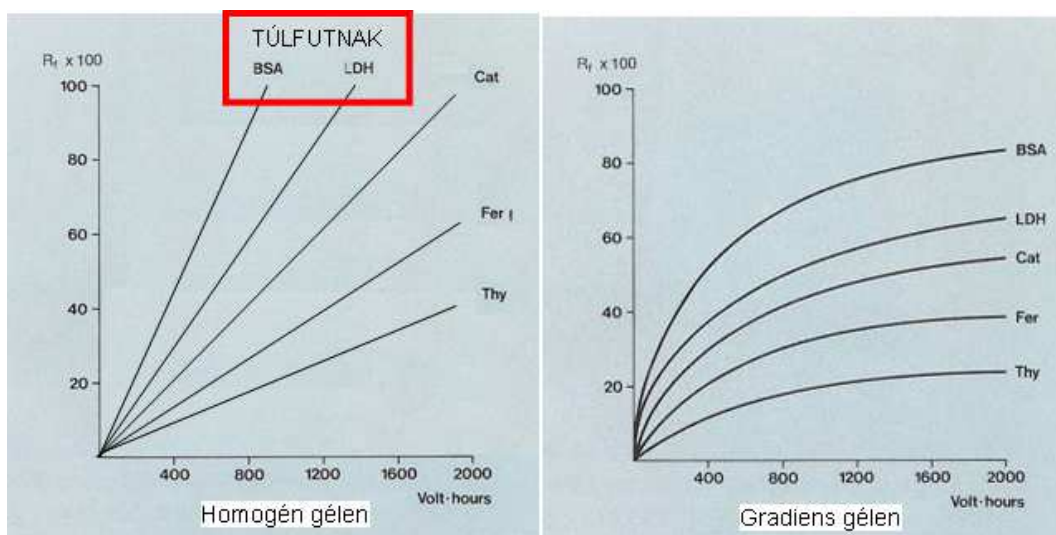
A gél mérete 4*4 cm-től 20*20 cm-ig terjed, szokásos vastagsága 1-5 mm. Használhatnak ún. preparatív géleket is, ezek vastagsága eléri a 10 mm-t is. A gél tetején ún. mintatartó „zseb”-eket alakítanak ki, ide pipettázzák az egyes mintákat. A zsebeket a gél öntésénél beillesztett, megfelelően fogazott profilú keretléc („fésű”) segítségével állítják elő. Egy 20 cm széles gélre akár 10-12 zsebet, azaz mintát is fel lehet vinni. A mintában a fehérje szükséges mennyiségét a kimutatási módszer érzékenysége határozza meg. Általában 5 µg fehérje még kimutatható, tehát komponensenként legalább ennyit kell tartalmaznia a felvitt oldatnak.

A gélek beállított összetétele nem mindig állandó a teljes terjedelemben. A változás lehet ugrásszerű (lépcsős) vagy fokozatos (gradiens gélek). Eszerint megkülönböztetünk homogén, gradiens és disc (= discontinuous) géleket.

A homogén gél sűrűsége (térahálósítottsága) mindenütt azonos. A gradiens gélekben a sűrűség a futás irányában növekszik. Ezekben a fehérjék mozgási sebessége előre haladva egyre csökken. A homogén gélek jellemzéséhez elegendő egy adat, pl. 10 % térahálósítás, a gradiens géleknél két adatot adnak meg, pl. az 5-15 %-os gélben a térahálósítás mértéke a futási úthossz alatt 5-ről 15 %-ra emelkedik. Mindkét típusnak megvan a maga alkalmazási területe. Hasonlítsuk össze ugyanazon fehérjék futását homogén és gradiens gélben (10. ábra). A homogén gélben az elmozdulás lineárisan változott, de mire a nagyobb molekuláknál jó felbontást lehetne elérni, addigra a kicsik már elérték a gél végét, túlfutottak, egymásra torlódtak. A homogén gélek tehát jó felbontást adnak, de csak szűk mérettartományban. A gradiens gélben a sűrűsödés lefékezte az elől haladó molekulákat,

megakadályozta a túlfutást. Minden komponenst sikerült egy gélen elválasztani, de rosszabb felbontással.

A vizsgálatok logikája szerint először célszerű egy tájékoztató vizsgálatot végezni gradiens gélen, majd céltermék azonosítása után annak a mérettartományát megvizsgálni nagyobb felbontású homogén gélel.

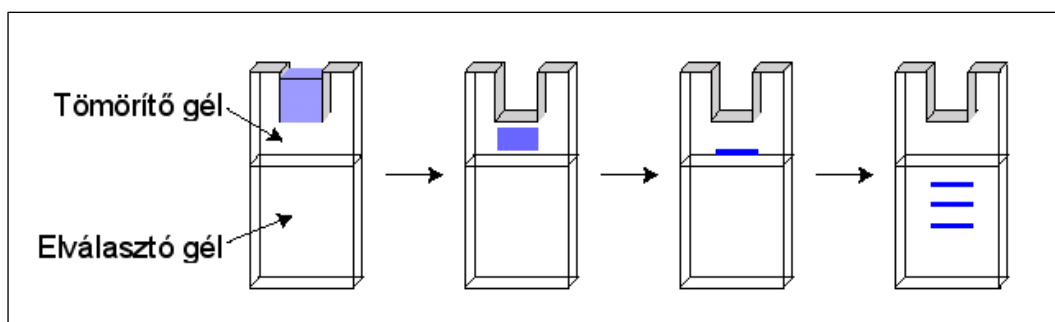


5.2.2.3. 2. ábra Futtatás homogén és gradiens géleken

A különböző molekulatömegű fehérjék mozgását a homogén és gradiens gélekben grafikus animáción is bemutatjuk.

5.2.2.3. 1. animáció [Elektroforézis homogén és gradiens gélekben](#)

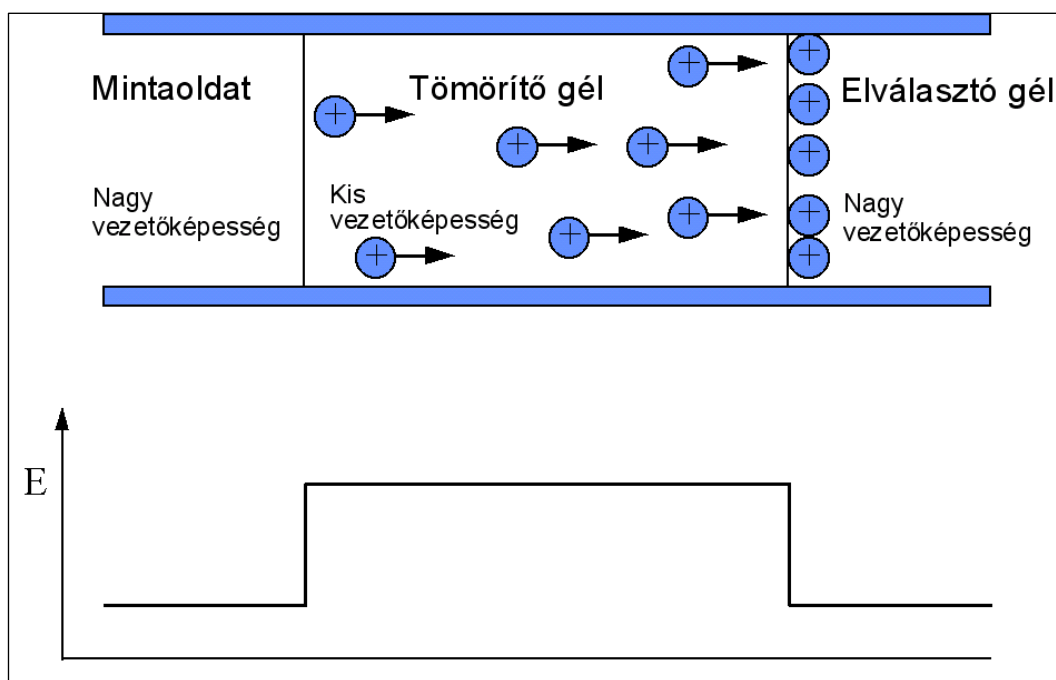
A discontinuous gélekben a sűrűség átmenet nélkül, lépcsősen változik. Ezekben a tényleges futtató gél fölött egy tömörítő gél szakasz van. Célja a viszonylag nagy mintatérfogatban lévő fehérjék összetömörítése egy keskeny csíkba, hogy azután a futtatás végén is jól elváló, jól észlelhető csíkokat kaphassunk (11. ábra).



5.2.2.3. 3. ábra Minta tömörítése discontinuous gélben

A tömörítő gélszakasz annyiban különbözik a futtatótól, hogy a fehérje molekulák itt sokkal gyorsabban haladhatnak. A gyorsabb haladást úgy teszik lehetővé, hogy a tömörítő gél kevésbé sűrű, és a benne lévő puffer ionerőssége sokkal kisebb. A kisebb ionerősség kisebb vezetőképességet jelent, ami nagyobb ellenállással jár. A nagyobb ellenállású szakaszon az Ohm-törvény szerint nagyobb a

feszültségesítés, azaz nagyobb a télerősség (V/cm) is (12. ábra). A gyorsan mozgó fehérjék a gélhatárra érve lelassulnak, „bevárják” egymást és egy szűk zónában vándorolnak tovább.



5.2.2.3. 4. ábra A disc gél elektromos tulajdonságai

5.2.2.4. A gélek kiértékelése

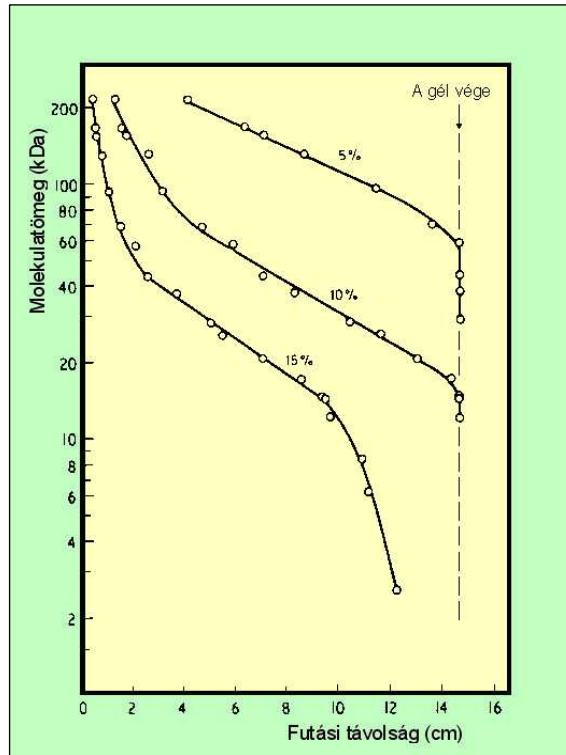
A futtatás során és végén a mozgó fehérje foltok nem szabad szemmel nem láthatók. Ezért is használják a festék markereket, hogy vizuálisan észlelhető legyen a futtatás előrehaladása. Az elkészült gélen a fehérjék láthatóvá tétele kémiai festési eljárásokkal történik. Az első lépésben a fehérjéket savas reagensekkel (perklórsav, szulfoszalicilsav) kicsapják, fixálják. Ezzel megakadályozzák a további vándorlást, illetve a diffúziós szétterülést. Ezt követi a festés, az egész gél meghatározott összetételű festékfürdőbe helyezik, ideje félórától 4-6 óráig terjedhet. Az esetek többségében a festés után halványítási lépés következik, amelyben a felesleges festéket távolítják el a gélből. A gél hátere ettől kitisztul, a megfestett fehérjék sávjai jobban kiemelkednek.

A leggyakrabban használt festékanyag a Coomassie Blue R250. A Bradford-féle oldott fehérje koncentráció mérési módszerhez hasonlóan a festék kékre festi a proteineket. Ezeket a színes sávokat értékelhetjük ki vizuálisan, vagy denzitométer segítségével. A festésre és halványításra sokféle receptúra van forgalomban. Elenyésző számban, de használják még az Amido Black és Fast Green festékeket is. A Coomassie festés érzékenysége a már említett 5 µg/csík, ekkora mennyiség már észlelhető elszíneződést okoz. Nagyobb érzékenységu az úgynevezett ezüst-festés. A módszer kémiai alapja, hogy ezüst-nitrát oldatból a fehérjékre barna fém-ezüst csapódik le. Nagyon érzékeny kimutatási eljárás (+2 nagyságrend), de nagyon tiszta vegyszerekkel, frissen készített oldatokkal, tisztán kell dolgozni, különben minden barna lesz. A fehérjékre is kidolgozták a DNS elektroforézisnél már bevált blotting eljárást. Ennek lényege, hogy a gélről átviszik a szétválasztott fehérjefrakciókat egy rászorított membránra (pl. cellulóz-acetát, nylon), majd ezen immun-analitikai reagensekkel mutatnak ki egy, vagy néhány kiválasztott komponenst.

Az előhívott géleket nehézkes tárolni, mert kiszáradnak, repedeznek, felkunkorodnak, azaz néhány hét alatt tönkremennek. Ezért a kiértékeléssel egyidejűleg célszerű lefotózni/beszkenyelni. A

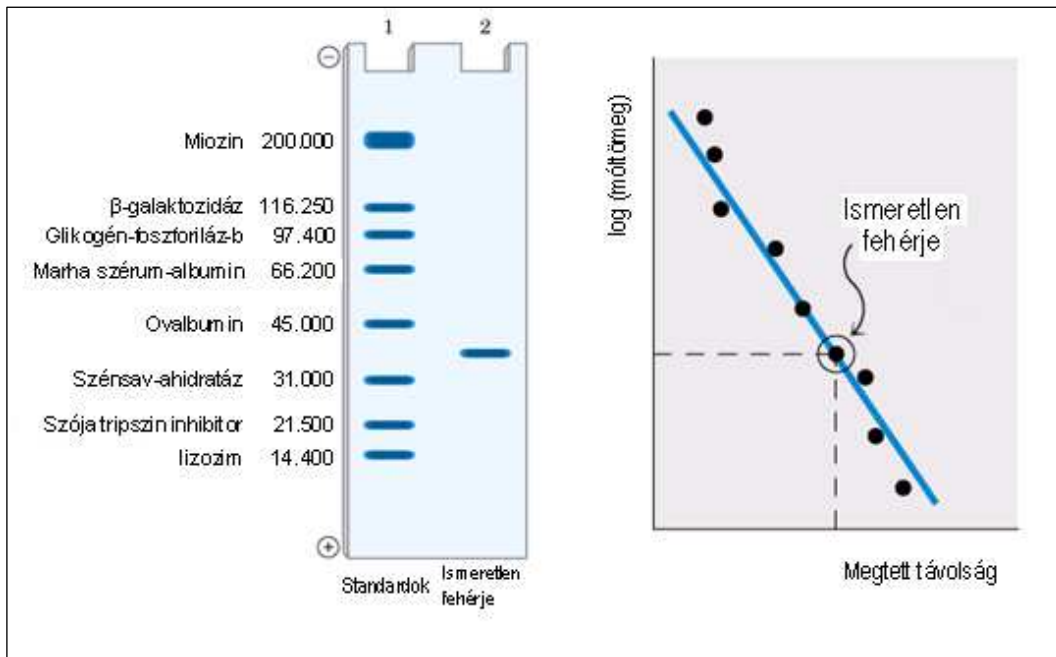
tartósság javítható, ha a gélt glicerinbe áztatjuk (nem fog elpárologni, kiszáradni), és átlátszó fóliával borítva kemény lapra szorítjuk. Az így tartósított gél egy-két évig is eltartható. A svéd Phast System 4x4 cm-es géljeit diakeretbe lehet foglalni, így kivetíthetők és tartósíthatók.

A gélelektroforézis célja a méret szerinti elválasztás. A kis molekulák távolabbra jutnak el, a nagyobbak rövidebb utat tesznek meg. A kapcsolat a valóságban nem lineáris, legjobban egy logaritmikus függvénnyel közelíthető (13. ábra).



5.2.2.4. 1. ábra A futási távolság és a molekulaméret kapcsolata

Az úthossz abszolút értéke nehezen reprodukálható, ezért minden egyes futtatásnál kalibrálni kell. A „skála” létrehozására ismert molekulatömegű fehérjék elegyét (kalibráló kit) is futtatják a minták mellett. A kapott sávroszat („kalibrációs létra”) segítségével intrapolálva becsülhetjük a ismeretlen fehérje mólsúlyát (14. ábra).



5.2.2.4. 2. ábra Molekulatömeg meghatározása kalibrációs sorozat segítségével

Nagy gélek (8-10-12 minta) esetén a gél mindkét szélő mintatartó zsebébe általában kalibráló oldatot tesznek, ezzel kiküszöbölik a gél, vagy az erőtér esetleges inhomogenitását is.

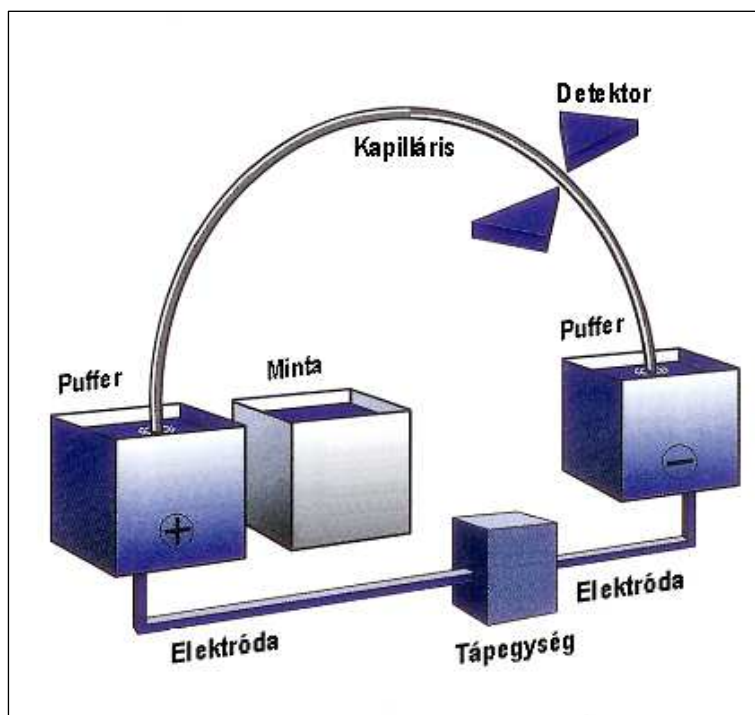
5.2.3. Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézisnél az elválasztási közeg egy kis átmérőjű kapillárisban áramló puffer. Az elektroforézist kapillárisban kivitelezve lehetővé válik nagy elektromos térerősség alkalmazása is, mert

- a kis keresztmetszet miatt az áramerősség kicsi,
- a vékony kapilláris hatékonyan adja le a keletkező hőt.

Az alkalmazott feszültség 10-30 kV, a térerősség 100 - 500 V/cm közötti érték. A térerősség növelésével hatékonyabb elválasztás érhető el, rövidebb idő alatt (1-3 perc). A kapillárisok belső átmérője 25-100 μm, hosszuk 0,5-1 m. Az egydimenziós kialakítás miatt nincsenek keresztirányú mozgások, sem konvekciós, sem diffúziós mechanizmussal.

A kialakuló elektroosmotikus áramlás következtében minden komponens a negatív elektród felé vándorol, ezért a mintát a kapilláris pozitív végénél viszik be, és az elválasztott komponenseket a kapilláris negatív vége közelében detektálják (15. ábra).



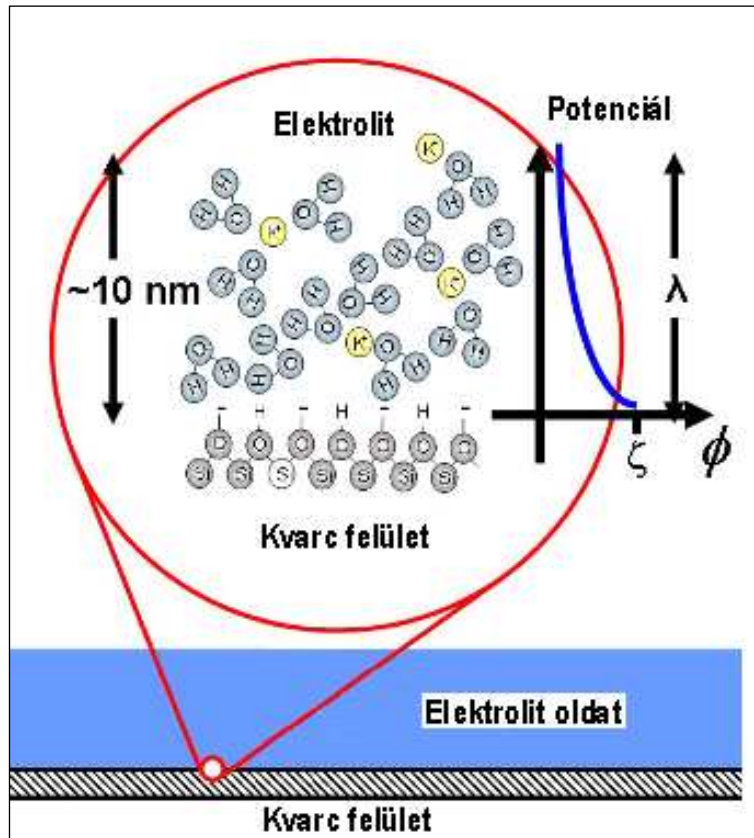
5.2.3. 1. ábra Kapilláris elektroforézis készülék felépítése

A mintaadagolás úgy történik, hogy a Pt elektródot és a kvarc kapilláris pozitív végét egy mechanika egy rövid időre a mintatartóba helyezi. A minta nyomáskülönbség (hidrodinamikus adagolás) vagy nagyfeszültségű impulzus hatására (elektrokinetikus adagolás) kerül a kapillárisba. Az automata mintaadagolóval (reprodukálhatóság) adagolt mintatérfogat 1-40 nl.

A kapilláris anyaga az esetek többségében kvarcüveg, mert az átengedi a fényt, így a UV spektrofotometriás detektorok könnyen a rendszerbe építhetők. A kvarc áttereszti az UV fényt, így 280 nm-es hullámhosszon a fehérjék könnyen detektálhatók. Más elven működő detektorok is alkalmazhatók, mint a HPLC-nél is, beleértve az abszorbancián, fluoreszcencián, elektrokémián és tömegspektrometrián alapuló mérési módszereket is.

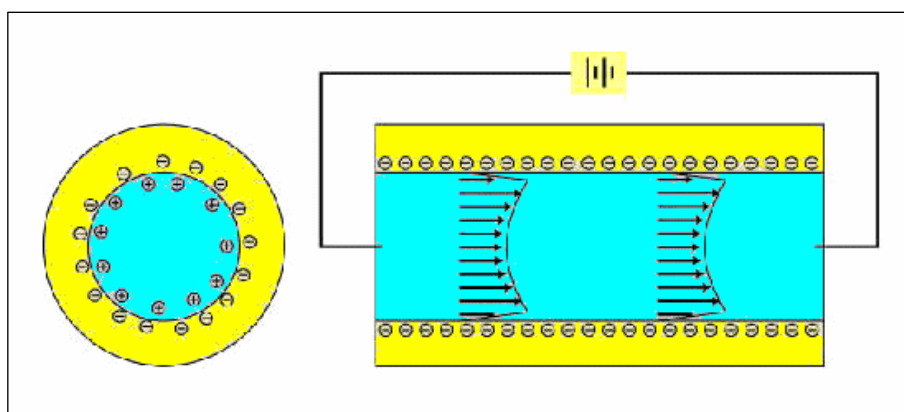
5.2.3.1. Az elektroosmotikus áramlás (EOF)

A kvarc, illetve szilikát üveg kapilláris felülete negatív töltésű ionos csoportokat tartalmaz, melyek vonzzák a pozitív töltésű ellenionokat. A kapilláris fala közelében kettősréteg alakul ki. A kettősréteg egyik pólusa a kapilláris fala (helyhez kötött töltés), másik pólusa az oldatban van. A folyadékban a töltéseloszlás nem egyenletes (diffúz réteg), az ionos részek között oldószer molekulák vannak. A kapillárisra adott feszültségkülönbség hatására a diffúz réteg elmozdul. A pozitív töltésű ionok a negatív elektród felé vándorolnak, és magukkal viszik az oldószer molekulákat is. A töltéssel rendelkező részecskékkel együtt az oldószer molekulák is vándorolnak, s így annak ellenére, hogy az anód és a katód rész között nincs nyomáskülönbség, áramlás jön létre. Ezt az oldószer-mozgást nevezik elektroosmotikus áramlásnak (16. ábra).



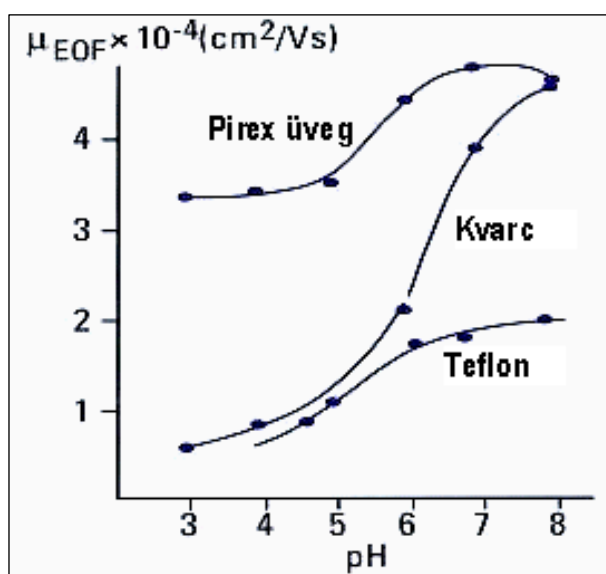
5.2.3.1. 1. ábra A felületi potenciál kialakulása töltött felületen

A nyomás hatására létrejövő kapilláris áramlás sebességprofilja parabola alakú, az sebesség közepén a legnagyobb. Az elektroosmotikus áramlásnál viszont a fal mellett a leggyorsabb az áramlás, így a sebességprofil sokkal közelebb áll a dugattyúszerű áramképhez, mint a parabolikushoz (17. ábra). Emiatt nem jelentkezik a sebességkülönbség által létrehozott sávkiszélesedés sem.



5.2.3.1. 2. ábra Elektroosmotikus áramlás sebességprofilja

A felületi potenciálok nagysága a kapilláris anyagának ionizálódásától függ. Ezt pedig befolyásolja egyrészt az anyagi minőség, másrészt a közeg pH-ja. Általános tapasztalat, hogy savas közegben a felületi töltés csökken (18. ábra).



5.2.3.1. 3. ábra A pH hatása az elektroosmotikus áramlásra

5.2.3.2. Az elválasztás elve

A molekulák mozgásának leírásánál kétféle sebességet kell megkülönböztetni. Az alap az elektroosmotikus áramlás sebessége, a közeg mozgása. Erre szuperponálódik a töltéssel rendelkező oldott molekulák relatív sebessége, a közeghez viszonyított mozgása. A kettő eredője az adott anyag abszolút vándorlási sebessége a kapillárisban képest.

A folyadék sebessége elsősorban a felületi potenciáltól függ:

$$v_{eredő} = v_{EOF} \pm v_{ion}$$

Ahol: ϵ - dielektromos állandó
 ζ - a zéta potenciál nagysága
 η - viszkozitás

A folyadékra nézve is definiáljuk az elektroforetikus mozgékonyt:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

A kapillárisban a töltéssel nem rendelkező molekulák az elektroosmotikus áramlással együtt mozognak, ezeknél nincs elválasztás. Az ionos anyagok viszont vándorolnak a folyadékban. A mozgás mechanizmusa és matematikai leírása pontos megegyezik a szabad folyású elektroforézisnél leírtakkal, a sebesség:

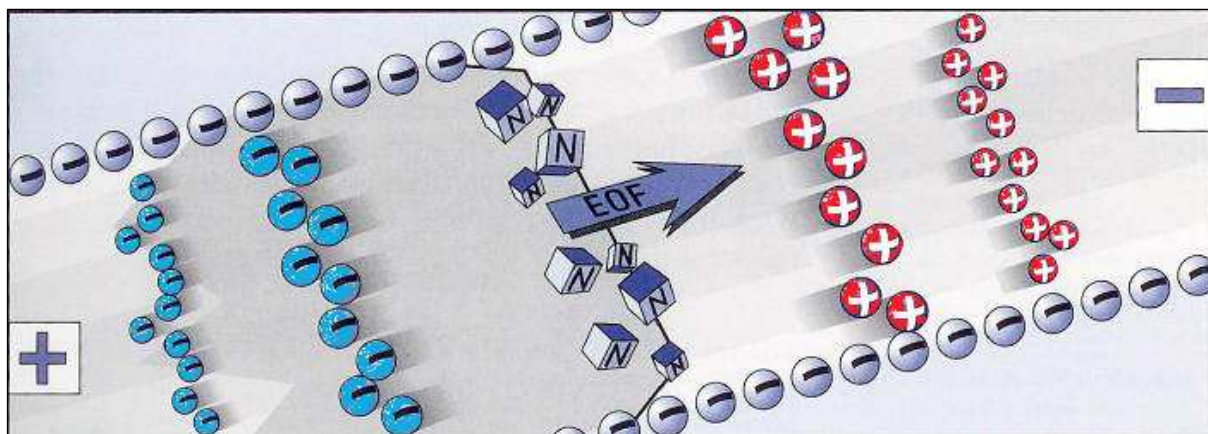
$$v_{ion} = \frac{qE}{3d\pi\eta} = \mu E$$

A rákapcsolt feszültségkülönbség hatására az ionok, töltésüktől függően az anód vagy a katód felé vándorolnak. A feszültségkülönbség okozta elektroforetikus vándorlási sebesség és a kapillárisban létrejövő oldószer áramlás sebessége összeadódik. A pozitív töltésű részecskék esetében

a sebességek összeadódnak, a negatív töltésűeknél, amelyeket a térerő „visszafelé” húz, viszont kivonódik (19. ábra).

$$v_{eredő} = v_{EOF} \pm v_{ion}$$

Általában az elektroosztatikus áramlás sebessége jóval nagyobb, mint az oldott komponensek vándorlási sebessége (mobilitása), így mindegyik anyag a katód felé halad. Egy tipikus analízis során a kationok lépnek ki először, mivel vándorlási irányuk megegyezik az elektroosztatikus áramlás irányával.



5.2.3.2. 1. ábra Szétválasztás a kapilláris elektroforézisben

A kapilláris elektroforézisben a komponensek mozgásának, elválásának jellemzésére használják a migrációs idő kifejezést. Felületesen szemlélve ez hasonló a kromatográfiában alkalmazott retenciós időhöz. A valóságban az elektroforézisnél nincs retenció, mert nincs semmiféle szorpció folyamat, ami megkötné a molekulákat. A kromatográfiánál elképzelhetetlen, hogy valami gyorsabban haladjon, mint az oldószerfront, az elektroforézisnél viszont minden pozitív ion így viselkedik.

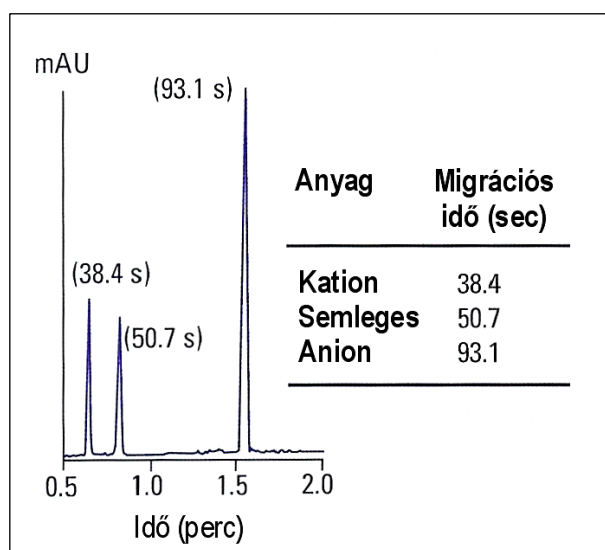
A migrációs idő azt az időtartamot jelöli, mely alatt az oldott anyag eljut a kapilláris elejétől (a minta bevitele) a detektorablakig. Ez a töltött molekula vándorlási idejét mondja meg egy adott semleges molekulához viszonyítva. Az ionos anyag sebességét út/idő formában ($v = l/t$) felírva kifejezhetjük a μ_a látszólagos mozgékonytságot:

$$\mu_a = \mu_{EOF} \pm \mu_{ion} = \frac{l \cdot E}{t} = \frac{l \cdot U}{t \cdot L}$$

és ebből a migrációs időt:

$$t = \frac{l \cdot L}{\mu_a \cdot U}$$

ahol: l - úthossz a detektorig
 L - a kapilláris teljes hossza, melyen a feszültség esik
 U - feszültség



5.2.3.2. 2. ábra Kapilláris elektroforézis felvétel

5.2.3.3. Műszaki paraméterek hatása

Térerősség: Az elektroozmotikus és az elektroforetikus áramlás sebessége egyaránt arányos a térerősséggel, így nagyobb feszültséget alkalmazva az elválasztás ideje lecsökken. A rövidebb szeparációs idő jobb elválasztást eredményez, mivel a tengelyirányú diffúzió sávszélesítő hatása rövidebb ideig érvényesül. A feszültség növelését a Joule-hő limitálja. Ha a hő nem tud a kapilláris falán keresztül eltávozni, akkor a kapillárisban sugárirányú hőmérséklet gradiens alakul ki. Ennek hatására az elválasztott komponensek visszakeverednek. Az optimális feszültség kísérletileg megállapítható: a feszültség növelésével a felbontóképesség egy határon túl romlani kezd.

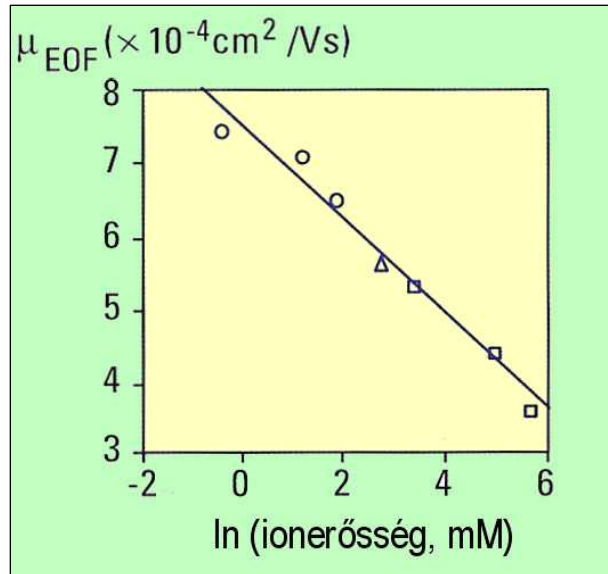
Hőmérséklet: Az elválasztásokat általában 25 °C-on (közel szobahőmérsékleten) végzik. A kapilláris folyadék-hűtése általában elegendő a Joule-hő elvetésére még nagyobb koncentrációjú puffer és nagy átmérőjű kapilláris esetén is. Túlmelegedés esetén célszerű vékonyabb kapillárist használni (a hő nagyobb fajlagos felületen adódik le). Alternatíva lehet a puffer koncentrációjának csökkentése is.

Viszkozitás: Mind az elektroforetikus mobilitás, mind az elektroozmotikus áramlás fordítottan arányos a viszkozitással. A viszkozitás a hőmérséklet függvénye, a hőmérséklet növekedésével a viszkozitás csökken, tehát az elektroforetikus mobilitás nő. Elvileg tehát célszerű lenne a hőmérséklete növelni, de az előzők szerint ez nem előnyös.

pH: egy részről csökkentése lassítja az áramlást, mert az ionos felületek töltése csökken. Más részről változása megváltoztatja az egyes fehérjék töltését, annak mértékét, sőt előjelét is.

Ionerősség: növelése rontja az elválasztást, mert:

- csökkenti a zéta potenciált (21. ábra)
- növeli az áramerősséget, és ezzel a melegedést
- torzítja a csúcs alakját



5.2.3.3. 1. ábra Az ionerősség hatása az áramlási sebességre

Kationos detergens: ionpár képzéssel lefedik a kvarc felület negatív töltéseit, ezzel megakadályozzák az elektroosmotikus áramlás kialakulását.

Összefoglalva a kapilláris elektroforézis igen hatékony elválasztási technika, sokféle típusú elválasztási feladat megoldására alkalmas. Mintaigénye kicsi, felbontóképessége eléri vagy meghaladja a HPLC, illetve gázkromatográfia hasonló értékeit. Kitűnő analitikai eszköz, de az elválasztás után a szétválasztott frakciókat parányi térfogatuk miatt nem lehet/érdemes felfogni, még anyagminta előállítására sem alkalmas.

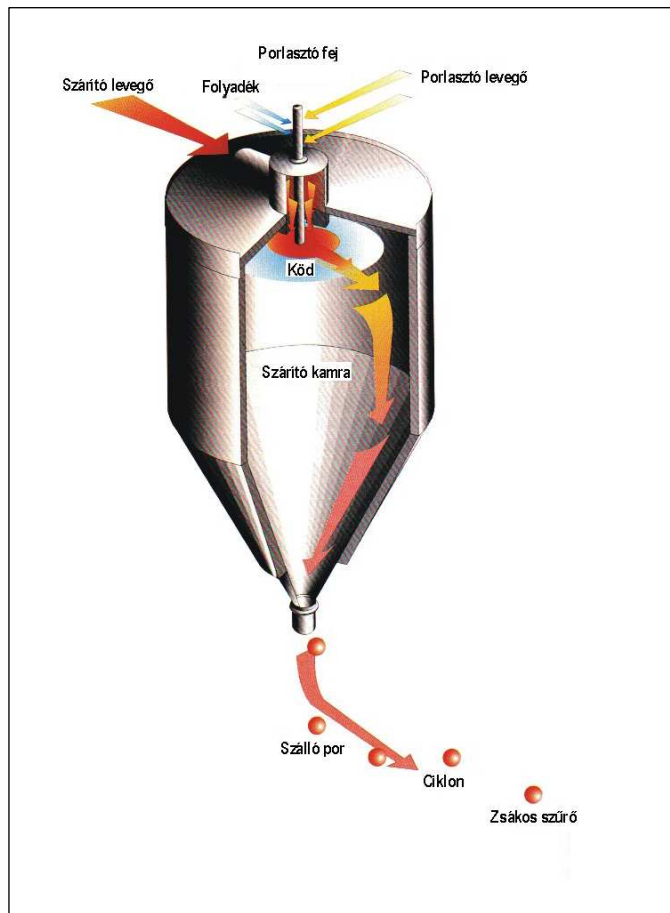
5.3 Porlasztva szárítás

A feldolgozási művelet sor legvégén, amikor már a piaci igényeknek, előírásoknak megfelelő állapotba hozzuk a terméket, kerül sor a szárításra. Szinte minden anyag specifikációja tartalmaz a víztartalomra vonatkozó megköötést. A nedvességtartalmat, vagy a szárítási veszteséget a vevő érdekében korlátozzák, nehogy vizet vásároljon az értékes anyag árában.

A kis mennyiségű, nem kötött víz eltávolításának jellemző művelete a szárítás, amelynek során a termékben lévő vizet a vele érintkező levegőbe párologtatjuk és visszük el.

A szárítás műveletével a Vegyipari műveletek tárgy foglalkozik, ebben a tananyagban csak egy nagyon speciális területet, a porlasztva szárítást tárgyaljuk, mivel ez egy kellően kéméletes, a biológiai anyagok aktivitását nem csökkentő szárítási mód.

A szárítás során általában valamilyen szemcsés/kristályos szilárd anyagból párologtatják el a vizet/oldószert, ami az anyag felületét részben vagy teljesen nedvesíti. A porlasztva szárítás speciális eset, ennél folyadékcseppek felületén megy végbe a párolgás. Az anyag a szárítás első fázisában sokáig folyadék halmazállapotú (oldat, szuszpenzió) marad, és csak a végén - amikor bepárlódik - alakul át szilárd porrá. A porlasztás kifejezés itt azt jelenti, hogy a betáplált folyadékot a szárító levegőbe diszpergálják, apró cseppekre osztatják. A porlasztó fejen keresztül jut az anyag a légkamrába/szárító térbe. A felmelegített szárító levegővel érintkezve lefekeződik és leülepszik. A cseppek felületén megy végbe a párolgás. A teljes elpárologtatás után egy másik diszperziót, szálló port kapunk, amit a készülékből való kilépés után le kell választani. Ennek tipikus eszközei a légciklonok (15-20 cm átmérővel), illetve ezek mögött még zsákos légszűrők fogják meg a maradék lebegő port (1. ábra).



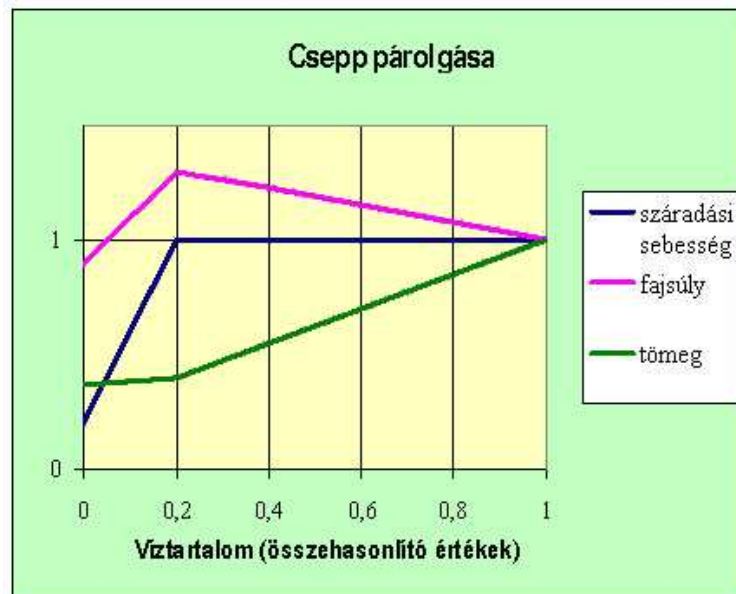
5.3. 1. ábra A porlasztva szárító felépítése

A szárítás különböző módszerei között a porlasztás előnye, hogy:

- az apró cseppekre osztott anyagnak nagy a fajlagos felülete
- emiatt gyorsan elpárolog a folyadék
- emiatt rövid a kontaktidő, az anyag hőterhelése kicsi
- ezáltal kéméletesen szárítja a hőérzékeny anyagokat.

A szárítóban a cseppek egyszerre párolognak és ülepednek. Mindkét folyamatban meghatározó szerepe van a fizikai jellemzőknek, a méretnek, a tömegnek és a sűrűségnek. A meleg levegőben mozgó/lebegő csepp párolgása két szakaszra osztható:

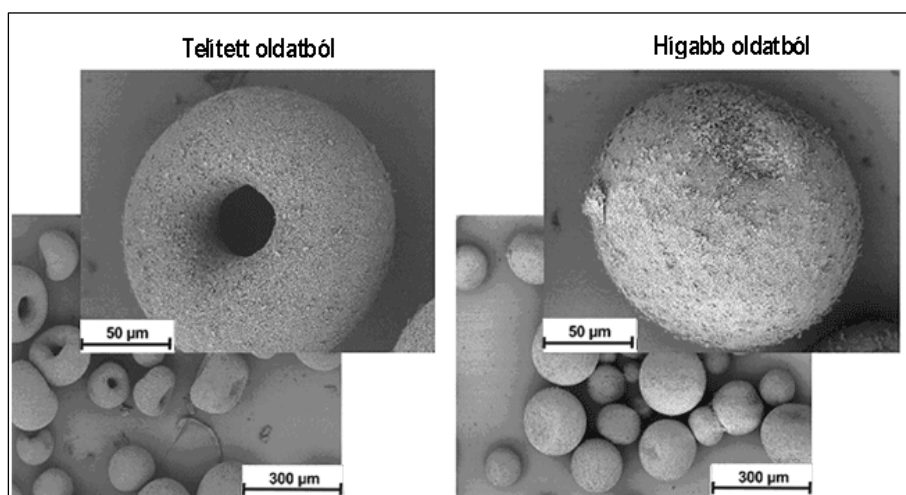
Amíg folyadékfilm borítja a felületet, addig közel állandó a párolgási sebesség, a tömeg a vízvesztés miatt csökken, a fajsúly növekszik, ha az oldott anyagok sűrűsége nagyobb, mint a vízé (2. ábra, összehasonlító értékek).



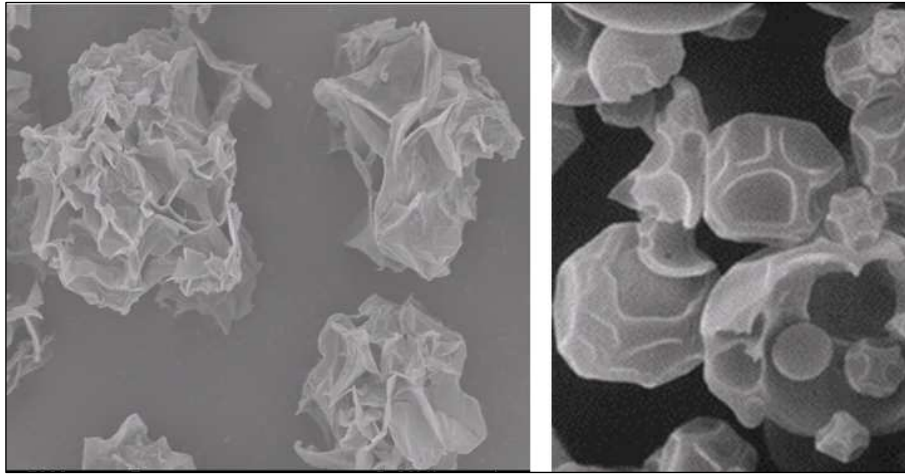
5.3. 2. ábra Fizikai paraméterek változása a párolgás során

Amikor a felület „megszárad”, már csak a kapilláris víz távozik – lassabban párolog, a tömeg alig csökken, a térfogat viszont állandó marad, ettől a fajsúly csökken.

A keletkező porszemcsék ritkán szabályos gömb alakúak. Ilyen forma általában csak nagyon híg oldatokból keletkezik. Töményebb oldat betáplálásánál szabálytalan, gyűrött alakok, illetve belül üres héjak keletkeznek (3., 4. ábra).

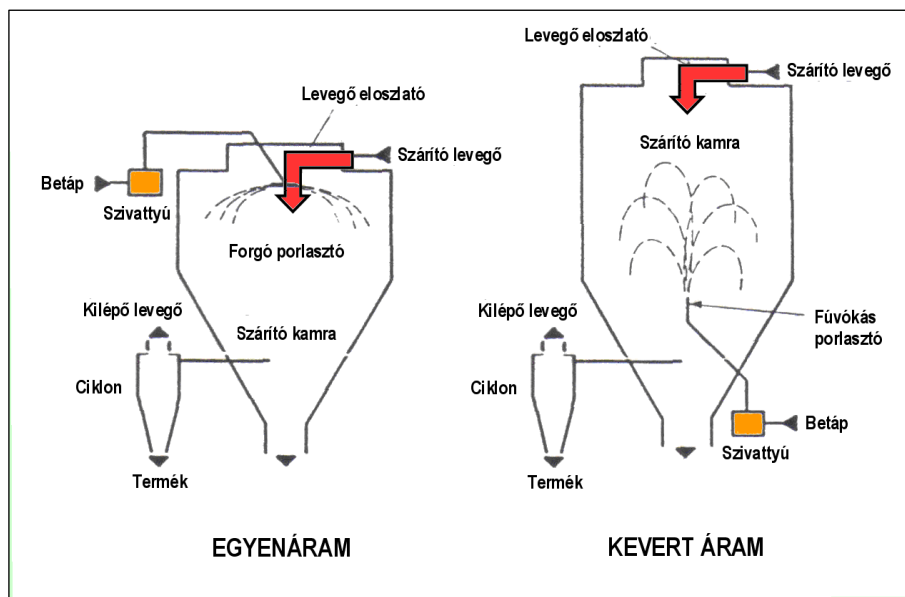


5.3. 3. ábra Bepárolt cseppekből képződő szemcsék



5.3. 4. ábra Szabálytalan alakú szemcsék

Hő- és anyagátadási műveleteknél alapvető kérdés, hogy a mozgó fázisok hogyan érintkeznek egymással. A porlasztva szárító berendezéseknél a folyadék és a levegő áramlása szerint egyenáramú és kevert áramú rendszereket alkalmaznak. Az ellenáram azért nem lehetséges, mert levegő és a szárított por együtt lépnek ki a készülékből (5. ábra).



5.3. 5. ábra Egyenáramú és kevert áramú porlasztva szárító berendezések

A porlasztás során különböző méretű cseppek keletkeznek. A méretezésnél ezek közül a legnagyobbakat kell figyelembe vennünk, mert

- méretük miatt ezek párolognak el utoljára,

- ezek ülepednek a leggyorsabban, → ezek töltik a legrövidebb időt a készülékben, → és ez alatt a rövid idő alatt kell teljesen elpárologtatni.

Így a cseppek létrehozásánál, kialakításánál mindenhol a d_{\max} -ot keressük, és erre méretezzük a szárítót.

5.3.1. A porlasztó fejek kialakítása

A szárítás első, és kritikus lépése a diszperzió létrehozása. A folyadékot többféle, különböző elven működő elosztóval vihetjük be a szárítótérbe. A porlasztófejeket kialakításuk és működésük szerint csoportosíthatjuk:

- fúvókás
 - mechanikus
 - pneumatikus
- forgótárcsás
 - tárcsás,
 - fúvókás,
 - lapátos

Fúvókás, mechanikus porlasztófej: egyfázisú (csak folyadék, segédlevegő nélkül) betáplálás. A szivattyúval benyomott folyadékot a fúvókában cirkulációs áramlásra kényszerítik. Ez megvalósítható tangenciális betáplálással, illetve megfelelő kivitelű áramlás terelő betétek alkalmazásával.



5.3.1. 1. ábra Mechanikus porlasztófej

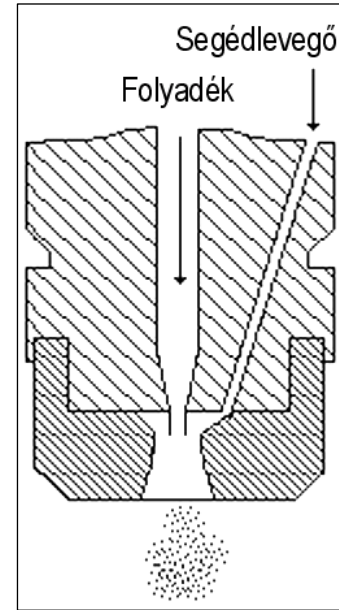
A porlasztó nyílás tengelye körül légmag képződik, a forgásban lévő folyadék a nyílásból kilépve kúppalást alakú összefüggő folyadékhártyát alkot. Állandó sebesség és térfogatáram mellett a kúpos szétterüléssel a folyadékfilm vastagsága egyre vékonyodik, és végül cseppekre szakad. A legnagyobb cseppek mérete az anyagi és geometriai jellemzőkön túl a kilépési sebesség négyzetével fordítottan arányos (Bär-egyenlet):

$$d_{\max} = \frac{8K\sigma_f}{\rho_f v_0^2}$$

- ahol:
- d – a csepp átmérője
 - K – anyagi állandó
 - σ – felületi feszültség
 - ρ – a folyadék sűrűsége
 - v_0 – kilépési sebesség

A pneumatikus porlasztók

Két fázissal működik, a betáplált folyadékot a fúvókában segédlevegő áram segítségével porlasztják. Kisebb folyadéknymást igényelnek, és finomabb permetet adnak, mint a mechanikus fúvókák. Az anyag tulajdonságainak változására is sokkal kevésbé érzékenyek. Tapadós, viszkózus, szálas szuszpenziók szárítására is alkalmasak.



5.3.1. 2. ábra Pneumatikus porlasztófej

A maximális cseppméret és a fúvóka átmérő aránya:

$$\frac{d_{\max}}{D} = k \left(\frac{\eta_f^2 \rho_f}{\sigma_f D} \right)^a \left(\frac{\rho_{\text{lev}} v^2 D}{\sigma_f} \right)^{-0,45}$$

ahol	k és a	– konstansok
	d_{\max}	– a legnagyobb csepp átmérője
	D	– a fúvóka kilépési átmérője
	σ_f	– felületi feszültség
	ρ_f	– a folyadék sűrűsége
	ρ_{lev}	– a levegő sűrűsége
	η_f	– a folyadék kinetikai viszkozitása
	v	– kilépési sebesség

Mint látható, a cseppátmérő ez esetben is fordítottan arányos a kilépési sebességgel, de nem négyzetesen, hanem közel lineárisan.

Forgótárcsás porlasztók. A porlasztófejek másik csoportja a centrifugális erőt használja ki a folyadék szétesztésére. A típus alapja egy vízszintes síkban, nagy sebességgel pörgő tárcsa, amelynek felső felületére adják a folyadékot. Az a felületen filmet képez, és kifut a tárcsa szélére, és onnan cseppeke képezve szakad le. Az egyszerű sík tárcsát gyakran kiegészítik a peremen lapátokkal, vagy résekkel (fúvókákkal)

A folyadék adagolása a lehetőleg a tárcsa közepére történik, ahonnan a centrifugális erő hatására lefut, vékony filmet képezve. Ha a tárcsán szabálytalan film képződik és a cseppek mérete is egyenlőtlené válik. Ez a porlasztótípus eltömődésre nem érzékeny. Iszapok, szuszpenziók, paszták, sőt félszilárd anyagok porlasztására is jól használható. Adott tárcsatípus meghatározott folyadékmennyiség feldolgozására alkalmas, állandó fordulatszám esetén



5.3.1. 3. ábra Forgótárcsás porlasztófej

A folyadékmennyiség (terhelés) növelése esetén a tárcsaátmérőt is növelni kell, ellenkező esetben a képződött cseppek mérete változni fog. A maximális cseppátmérő itt is kifejezhető az eddig használt paraméterekkel:

$$d_{\max} = k \frac{D^{0,46} \sigma_f^{0,46} \mu^{0,08}}{v \rho_f^{0,54}}$$

ahol D – az áramlási keresztmetszet jellemző mérete (rés szélessége, film vastagsága)

Dimenzió analízissel levezetve a különböző típusú porlasztófejek működési egyenletei típusától függetlenül egyformává válnak:

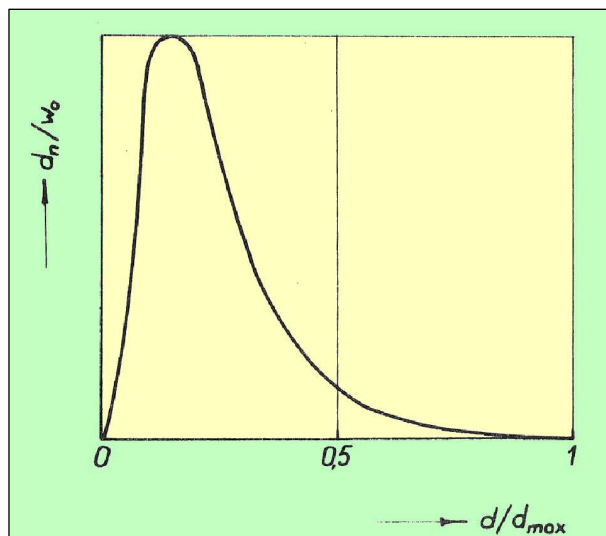
$$\frac{d_{\max}}{D} = k \operatorname{Re}^{-0,08} \operatorname{We}_{\text{kap}}^{-0,46}$$

ahol D és μ_f – jellemző méret (fúvóka átmérő, filmvastagság, rés nyílása)

$$\operatorname{Re} = \frac{v D \rho_f}{\mu_f} \quad \operatorname{We}_{\text{kapilláris}} = \frac{\rho_{\text{lev}} v^2 D}{\sigma_f}$$

A legnagyobb méretű csepp átmérőjének meghatározása mellett lényeges kérdés a keletkező cseppek méreteloszlása, illetve átlagos átmérője is.

Statisztikai módszerekkel vizsgálva a szemcsék méreteloszlását megállapították, hogy az nem szabályos Gauss-görbével leírható normális eloszlású, hanem egy maximumos, de aszimmetrikus eloszlást mutat (9. ábra).



5.3.1. 4. ábra A porlasztott cseppek méreteloszlása

5.3.2. A cseppelpárolgás mechanizmusa

A cseppből való elpárolgás problémája tulajdonképpen szimultán hő- és anyagátadási probléma. Ezek vizsgálatához a csepp útját ismét két szakaszra kell bontani, most más szempontok alapján, mint azt a fejezet elején tettük. A két szakaszban eltérő a mozgás jellege, más mechanizmussal működnek a transzportok is.

Az első szakasz „fékút”, amíg a fejből kilépő, leszakadó csepp lelassul, és felveszi az állandó ülepedési sebességet. A második az *ülepedési szakasz*, ahol a csepp állandó (relatív) sebességgel ülepedik.

A második, ülepedési szakasz leírása az egyszerűbb, kezdjük ezzel. Általában a Ranz és Marshall egyenleteit használják:

$$Nu = 2 + 0,6 Re^{0,5} Pr^{1/3}$$

$$Sh = 2 + 0,6 Re^{0,5} Pr^{1/3}$$

Ebből a $Nu = Sh = 2$ a tiszta diffúzió, az additív tag pedig a konvekciós transzport.

Kis cseppekre ($d < 80 \mu m$, $Re < 0,9$) az ülepedési sebesség elhanyagolható, az additív tag eltűnik. Ez a feltétel vizes oldatoknál mindig teljesül – vagy már a porlasztásnál, vagy a párolgás miatti méretcsökkenés következtében. Magasabb hőmérsékleteken, intenzívebb transzportok esetén korrekciós tényezőkkel egészítik ki a Nusselt-szám kifejezését:

$$Nu = 3,32 Re^{0,5} Pr^{1/3} Fr^{-0,077} \left(\frac{\Delta H}{c_p \Delta T} \right)$$

ahol: ΔH - a párolgáshő
 c_p - fajhő állandó nyomáson

A „fékút” leírása bonyolultabb, mert mindkét fázis turbulensen viselkedik, és ezek a viszonyok a porlasztófejtől távolodva gyorsan változnak. A fő hatásokat összefoglalva:

- a csepp körül az áramlás nem lamináris
- a csepp még nem gömb alakú, lüktet, hullámzik
- a csepp belsejében is van áramlás és hőtranszport

- a párolgással kilépő gőz megvastagítja a felületi határréteget

A határfelület hullámzó mozgása mindenfajta transzport jelenség fokozását eredményezi. Így van ez a cseppek esetében is, amikor a belső cirkuláció, a felület hullámzó-oszcilláló mozgása és a felületi feszültség helyi változása útján kiváltott mozgás az átadás intenzifikálásához vezet. A már kialakult csepp esetében azonban van egy minimális méret, amelyen alul a csepp merev gömbként viselkedik, azaz mindenféle felületmozgás megáll. Ennek a kritikus cseppméretnek a határértékét a Bond-Newton formula adja meg:

$$\frac{d_{\text{krit}}^2 \Delta \rho}{\sigma} = 2$$

ahol: $\Delta \rho$ - a sűrűség-különbség a csepp és a környező közeg között,
 σ - a felületi feszültség.

Ha tehát a párolgás során a cseppek mérete ez alá a határérték alá csökken, akkor csak a csepp körül áramló levegő viselkedése szabja meg a transzportok sebességét.

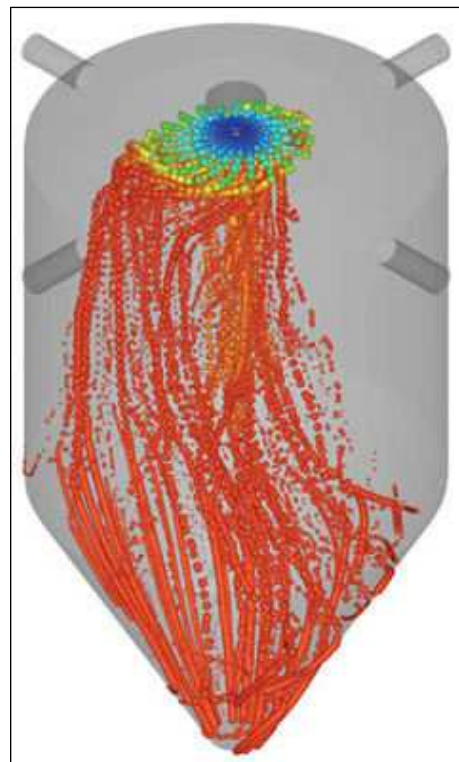
A fékeződő cseppek hőátadására kezelhető, egyszerű modell a Graffon-egyenlet, amely a határréteg vastagságát veszi figyelembe korrekciós tényező gyanánt:

$$Nu = Sc^{1/3} \frac{2d}{\delta}$$

ahol d - a csepp átmérője
 δ - a határréteg vastagsága.

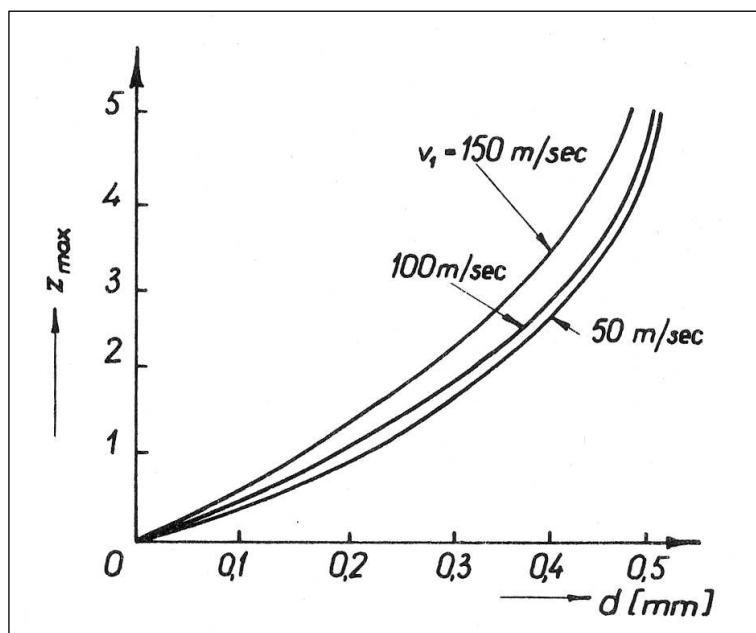
A turbulens áramlások következtében ebben a szakaszban a párolgás sokkal intenzívebb, mint az ülepedésnél. Az egész folyamatra vonatkoztatva sokszor a víz ~90 %-a ebben a szakaszban lép ki. Ennek megfelelően a készülék kialakítását, a művelet kivitelezését erre részfolyamatra célszerű optimálni. A hő és a pára átlépése a csepp felületén csak egy lépése a teljes transzportnak. Ha a csepp nem érintkezik kellő mennyiségű szárító közeggel és így nincs jelen elegendő hőhordozó, az egyensúlyi állapot gyorsan bekövetkezik, a transzport leáll. Ezért célszerű a befűvott meleg levegőt közvetlenül a porlasztófej közelébe juttatni, ezért kedvezőbb ennél a szárítási műveletnél az egyenáram.

A porlasztó szárító torony méretezésének módszerei különbözők. A térfogati hőátadási tényezőn alapuló számítás csak a toronytérfogatot adja meg, és tetszőleges L/D arány felvételét lehetővé teszi. A fékezési szakasz nagy hatékonyságának ismerete viszont támpontot ad a geometria kialakításához. A készülék sugarát úgy kell megválasztani, hogy a fékezési szakasz „beleférjen”. A cseppek akár vízszintesen, akár ferdén, akár ívelten mozognak, ne ütközzenek a falba lelassulásuk előtt. A cseppek mozgását és hőmérséklet változását egy tárcsás porlasztóval ellátott szárítóban szemlélteti a 10. ábra.



5.3.2. 1. ábra A cseppek mozgása tárcsás porlasztóban

Így alakult ki az a gyakorlat, hogy a tárcsás porlasztóval működő szárítók L/D viszonya közel egy, míg a fúvókás porlasztóhoz karcsúbb, magasabb tornyok tartoznak. A lassulási szakasz hossza elsődlegesen a cseppek méretétől függ. A nagyobb tömeg, illetve impulzus növeli a fékutat, a keresztmetszet, illetve a terület pedig a közegellenállást, fékező hatást erősíti. A két hatás eredőjeként a fékezési szakasz hossza közel négyzetesen függ a csepp átmérőjétől (11. ábra).



5.3.2. 2. ábra A cseppátmérő hatása a fékezési szakasz hosszára

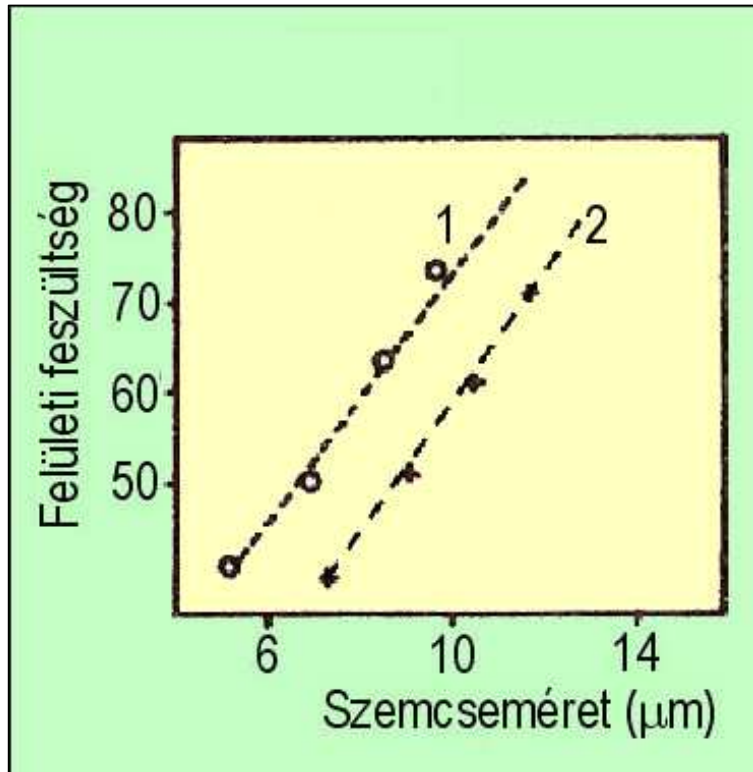
Tehát ennél a megközelítésnél is a legnagyobb átmérőjű csepre kell méretezni, ennek röppályájához kell igazítani a készülék sugarát.

5.3.3. Szemcseméret

Joggal feltételezhető, hogy a porlasztva szárításnál a kialakuló porszemcsék mérete arányos a bevitt cseppek méretével. Ebből következik, hogy a szárított szemcsék méreteloszlása is megegyezik a cseppek aszimmetrikus gyakoriság-függvényével. A legnagyobb, illetve átlagos méretű részecskék mérete viszont összefüggésbe hozható az anyagi, illetve technológiai paraméterekkel. Az egyes változók hatását első közelítésben a már vizsgált Bär-egyenlettel értelmezhetjük.

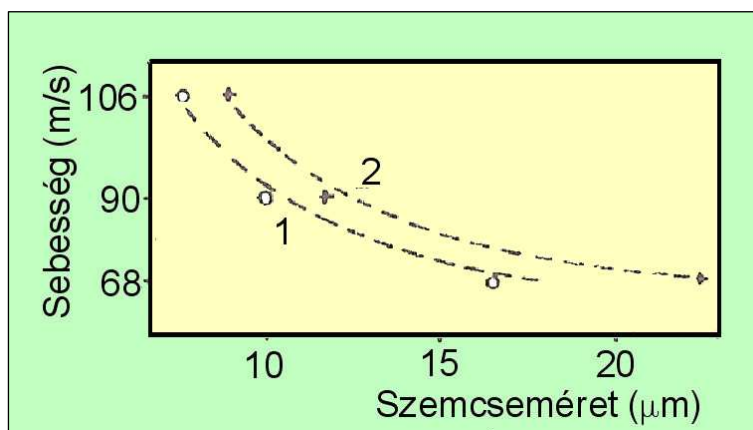
$$d_{max} = \frac{8K\sigma_f}{\rho_f v_0^2}$$

A cseppek/szemcsék mérete az egyenlet szerint egyenesen arányos az oldat *felületi feszültségével*. Ez összhangban van a kísérleti eredményekkel, különböző szárítandó oldatok felületi feszültségét felületaktív anyagokkal módosítva az elméletnek megfelelő változásokat észleltek (12. ábra). Ha tehát sikerül a felületi feszültséget csökkenteni, csökken a cseppek mérete is. A kisebb cseppek gyorsabban száradnak, és a képződött apróbb szemcsék szárazabb állapotban érik el a szárító falát. Ez a finomabb por kevésbé tapad ki a készülék falára, viszont nehezebb feladat a kilépés utáni leválasztása. Nagyobb hányada szökik át a ciklonon, ezt azután zsákos szűrőkkel kell felfogni.



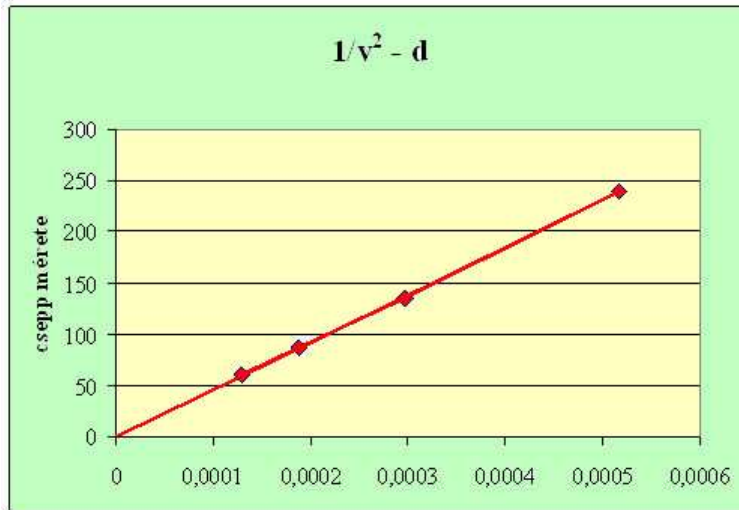
5.3.3. 1. ábra A szemcseméret és a felületi feszültség kapcsolata

A Bär-egyenletben szereplő másik technikai jellemző a *sebesség*. Ez alatt cseppeknek a szárító levegő sebességére vonatkoztatott relatív sebességét értjük, ami jól mérhető változást okoz a szárított anyag szemcseméretében. A folyadékcseppek kilépési sebességét jó közelítéssel megadja a porlasztótárcsa kerületi sebessége. Az egyenlet fordított másodfokú arányosságot jelez, ami összhangban van a Tanszékünkön mért adatokkal (13, 14. ábra).



5.3.3. 2. ábra A kerületi sebesség hatása a szárított por szemcseméretére

A folyadék beadagolási sebességének növekedésekor egy meghatározott érték felett a porlasztótárcsa a folyadéksúrlódás miatt fékeződni kezd, ezért forgási sebessége csökken, ez is befolyásolja a csepp- ill. szemcseméret alakulását.

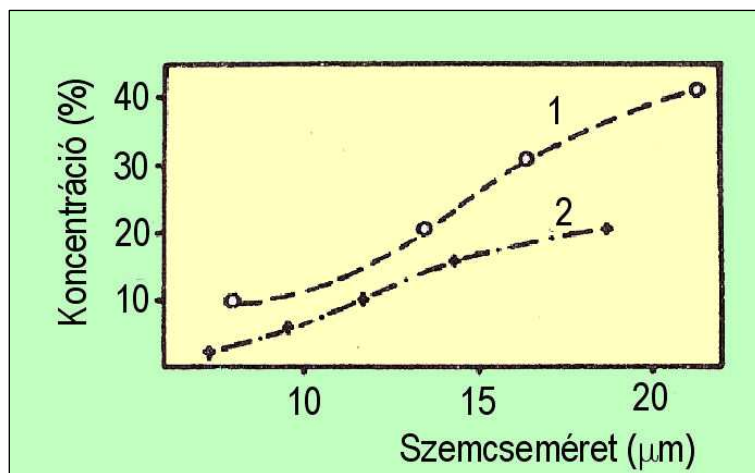


5.3.3. 3. ábra Linearizált kapcsolat a sebesség és a cseppméret között

A folyadék beadagolási sebességének növekedésekor egy meghatározott érték felett a porlasztótárcsa a folyadéksúrlódás miatt fékeződni kezd, ezért forgási sebessége csökken, ez is befolyásolja a csepp- ill. szemcseméret alakulását.

Felmerülhet még a csepp- ill. szemcseméretet befolyásoló anyagi jellemzők között a viszkozitás esetleges befolyása is. Ez a paraméter a Bär-egyenletben nem szerepel, és a kísérletek szerint nincs érdemleges hatása.

Befolyásolja a szemcseméretet a szárítandó oldat koncentrációja is. Ha az elporlasztott cseppek mérete a koncentráció növekedésével változatlan marad, a leszárított szemcsék mérete a nagyobb szárazanyag tartalom miatt jelentősen növekedik. A koncentráció közvetett hatásai viszont már a cseppek kialakulásánál érvényesülnek, hiszen az oldat koncentrációjának növekedésével változik (általában növekszik) annak sűrűsége is. Másrészt az oldott anyag koncentrációja befolyásolhatja a felületi feszültséget is. Mindkét paraméter szerepel a Bär egyenletben, hatásuk ellentétes. Emiatt a koncentráció hatása a szárított por szemcseméretére nem egyértelmű, a mérési adatok változó hajlású, de monoton emelkedő görbéket adnak (15. ábra).



5.3.3. 4. ábra A koncentráció hatása a szemcseméretre

Hőtani méretezés szempontjából alapvető paraméter a szárító levegő hőmérséklete. A cseppek, illetve a porszemcsék méretére ennek nincs kimutatható hatása. A biológiai anyagok szárításánál viszont figyelembe kell venni a termék hőérzékenységet. Szerencsére a szárítási folyamat túlnyomó részében az anyag a cseppben oldva van jelen, így a hőmérséklet nem haladhatja meg a forráspontot, 100 °C-ot, illetve a „nedves hőmérő hőmérsékletét”.

A szárító terhelhetőségét a kg elpárologtatott víz/óra mértékegységben adják meg.

$$W (H_{\text{levegő be}} - H_{\text{levegő ki}}) = w_{\text{víz}} H_{\text{párolgási}}$$

A bevitt hő mennyisége a levegő térfogatáramától (ez általában rögzített, beépített érték) és a belépő hőmérséklettől (ez szabályozható) függ. A kilépő levegő hőmérséklete terheléstől függ – minél nagyobb mennyiségű vizet kell elpárologtatni, annál alacsonyabb lesz. Technológiailag tehát az alacsony kilépési hőmérséklet lenne célszerű, de ezt megint csak az anyag tulajdonságai szabják meg. Olyan kilépő hőfokot kell választani, hogy az anyag „elegendő mértékben” megszáradjon – ne maradjon benne a kívánnál több víz, ne maradjon ragacsos, ne tapadjon a készülék és a ciklon falához. Ezt a hőfokot minden anyagra tapasztati úton, kísérletekkel kell meghatározni.

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a porlasztva szárítás a biológiai anyagokra jól alkalmazható művelet, amelynek sok paramétere jól leírható az egyszerű Bär-egyenlettel, de ugyanakkor egyes tényezők csak kísérletes úton határozhatók meg.