

# SEJTFELTÁRÁS

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

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

Milyen erős a sejtfa?

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

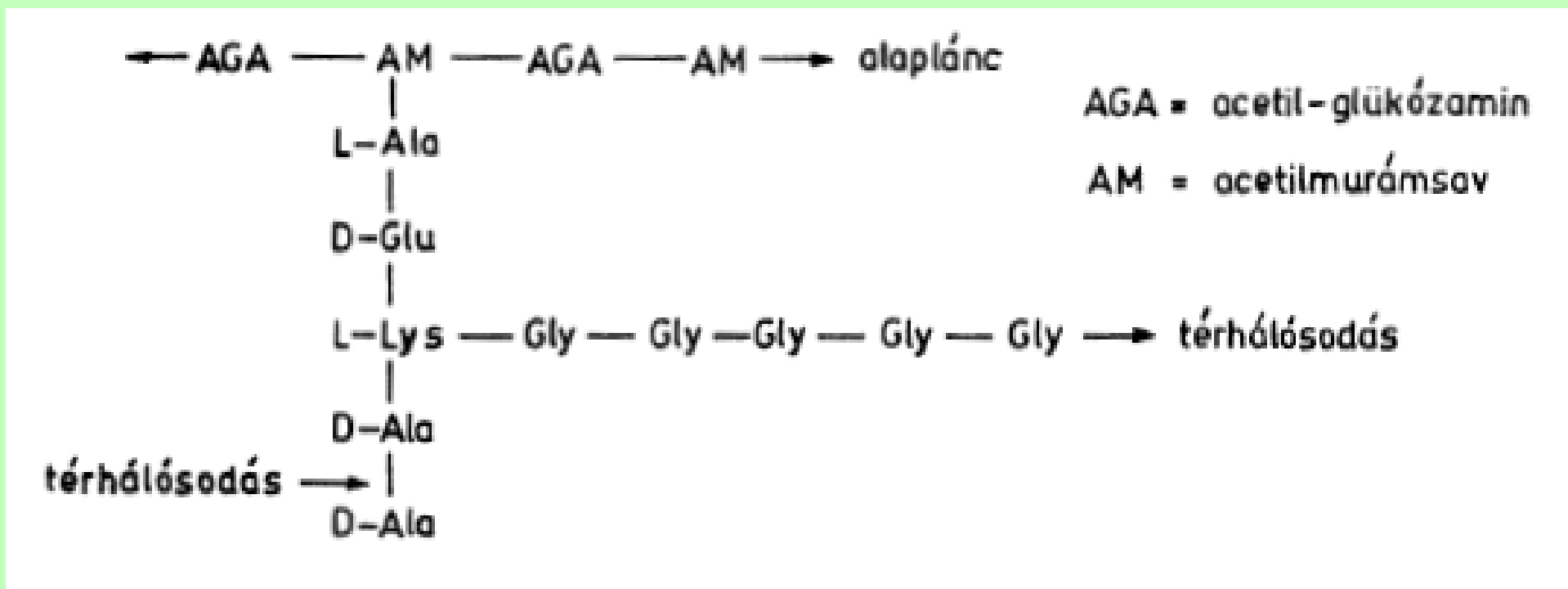
Mekkora ez?

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

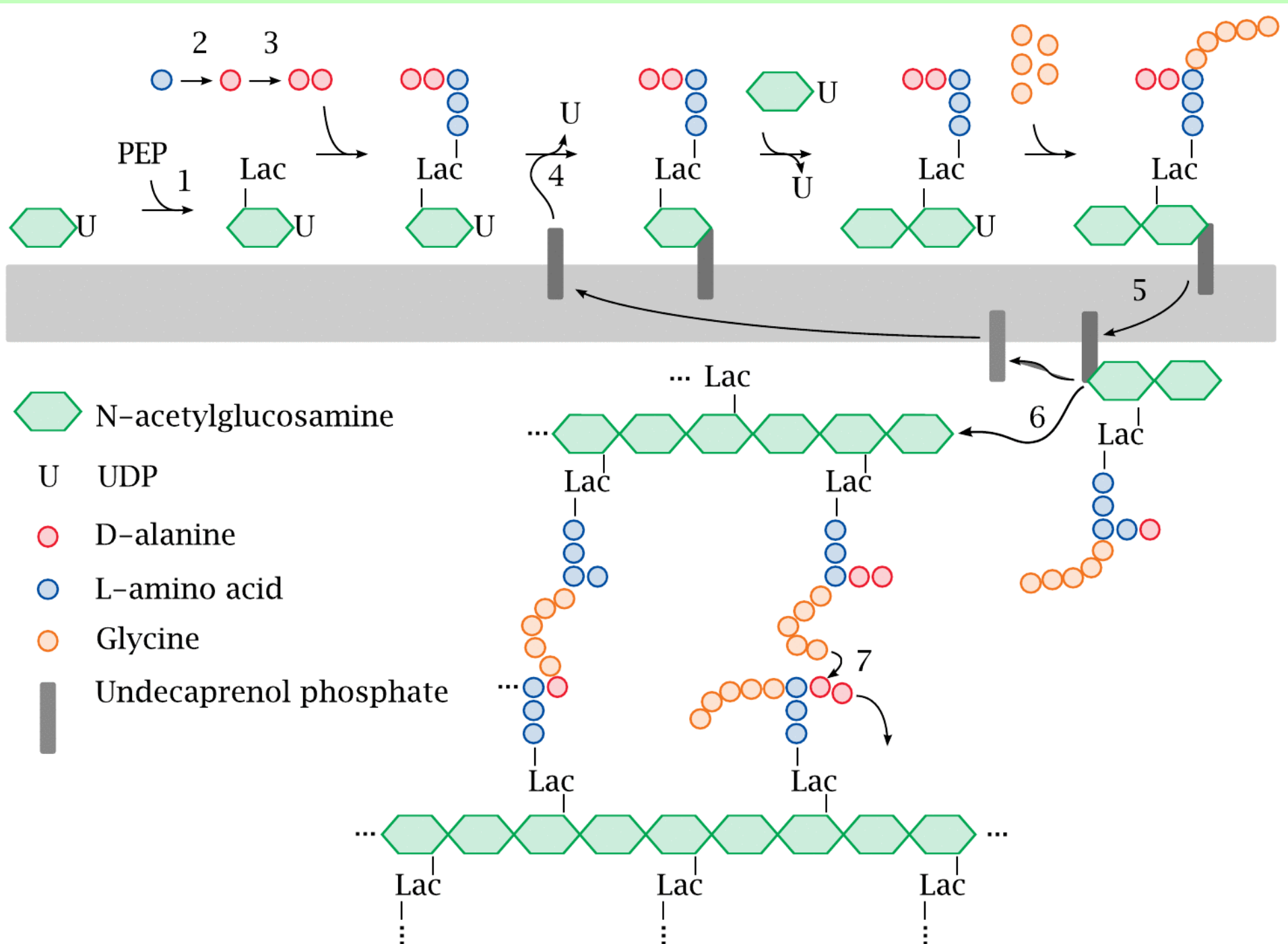


# A SEJTFAL

A Gram pozitív baktériumok sejtfalának szerkezete:  
Szénhidrát alaplánc, peptid oldalláncok

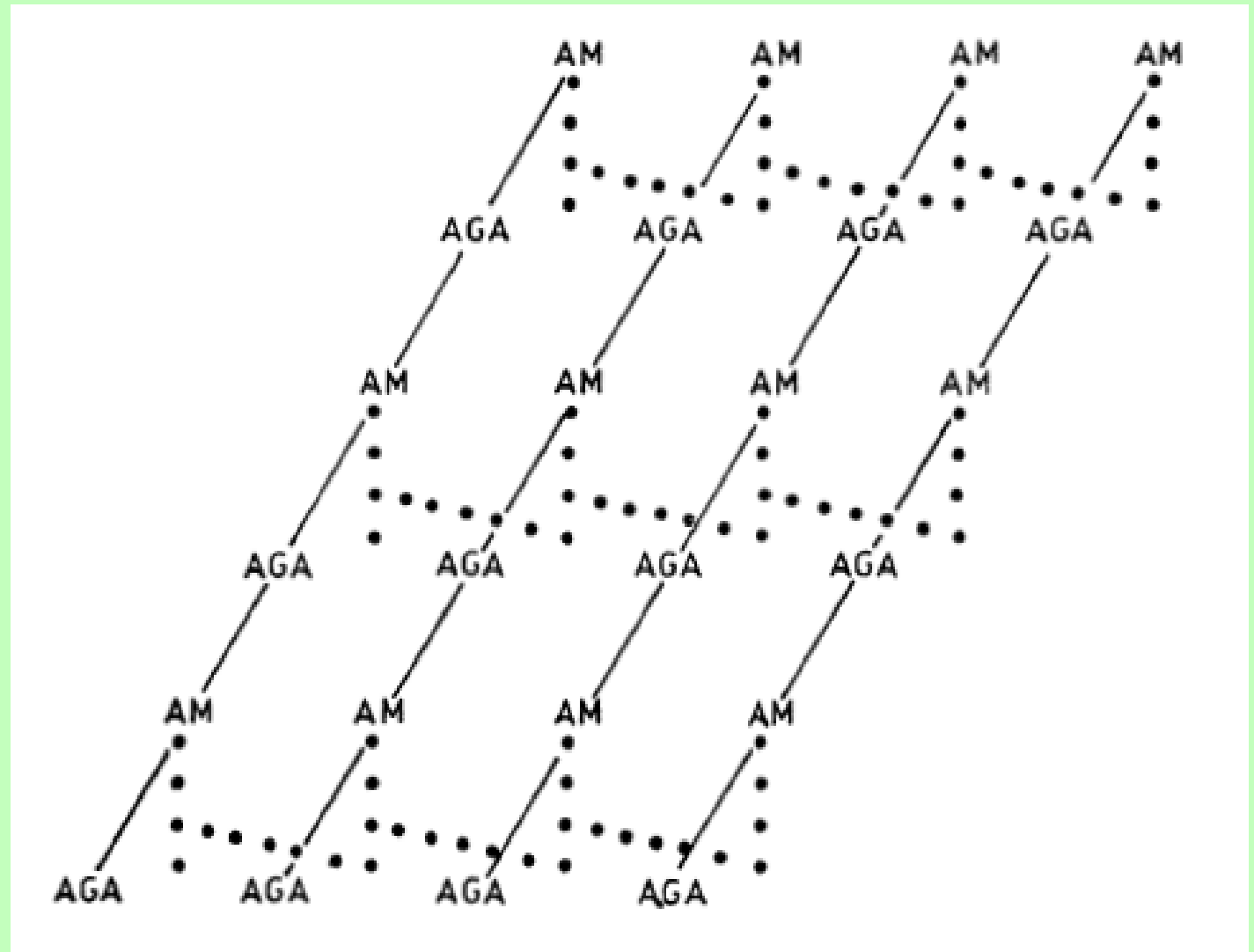


# A SEJTFAL BIOSZINTÉZISE



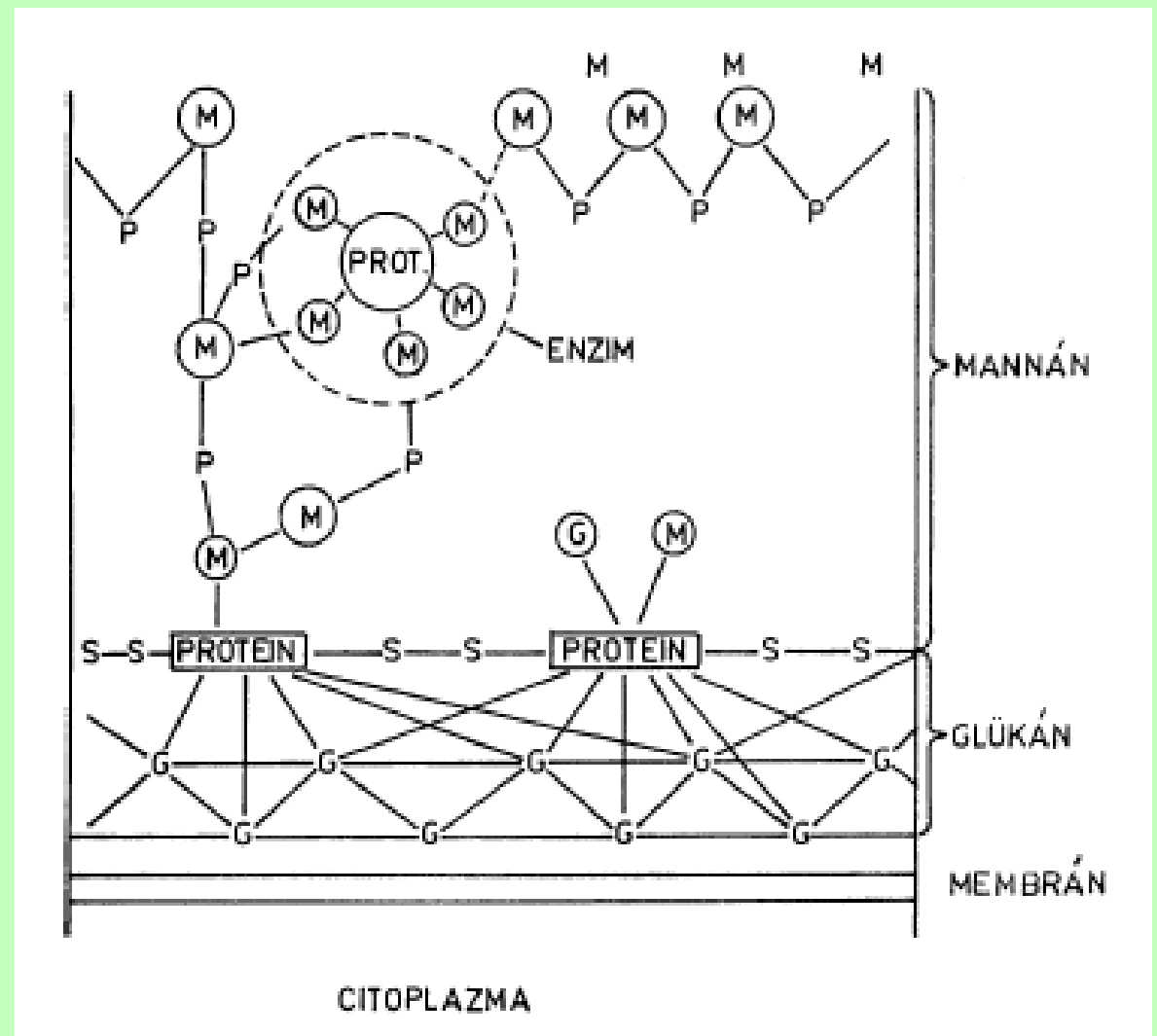
# A SEJTFAJ

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



# AZ ÉLESZTŐK SEJTFALA

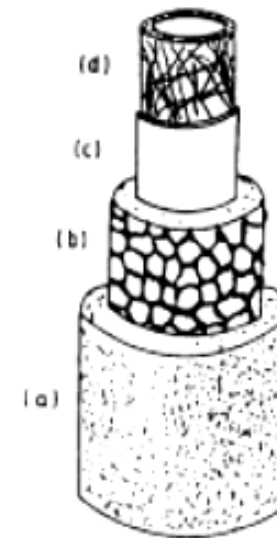
Glükán- és mannán-  
fehérje komplex rétegek



# A PENÉSZEK SEJTFALA

Több réteg, változatos kémiai összetétel:

- $\beta$ -glükán
- kitin
- kitozán
- cellulóz
- peptidoglükán



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

- (a) külső  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükán réteg,
- (b) glükoprotein hálózat, benyúló glükán részekkel
- (c) túlnyomórészt fehérjéből álló réteg
- (d) kitines réteg, fehérjébe ágyazott mikrofibrillumok



# A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

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

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

$P_i$  a sejtben lévő termék koncentrációja

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

Szétválasztással integrálva a  $P_i$  időben exponenciálisan csökken.

Praktikusan inkább a kinyert termékmennyiséget fejezzük ki:

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



# A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

A kinyert termék mennyisége ekkor így alakul:

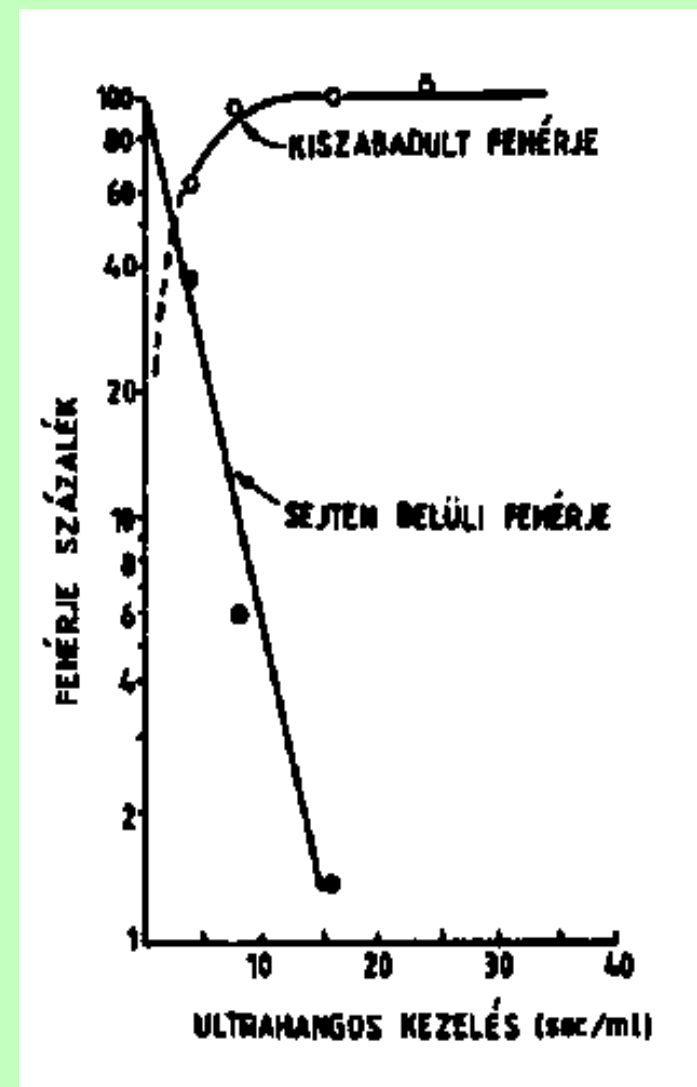
$$R = P_{i0} [1 - e^{-kt}]$$

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

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

ahol:

S – specifikus aktivitás





# A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

Az inaktiválódás is exponenciálisan megy végbe:

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

Az eredő termékihozatal a két tényező kombinációjával fejezhető ki:

$$R_e = RS$$

azaz:

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

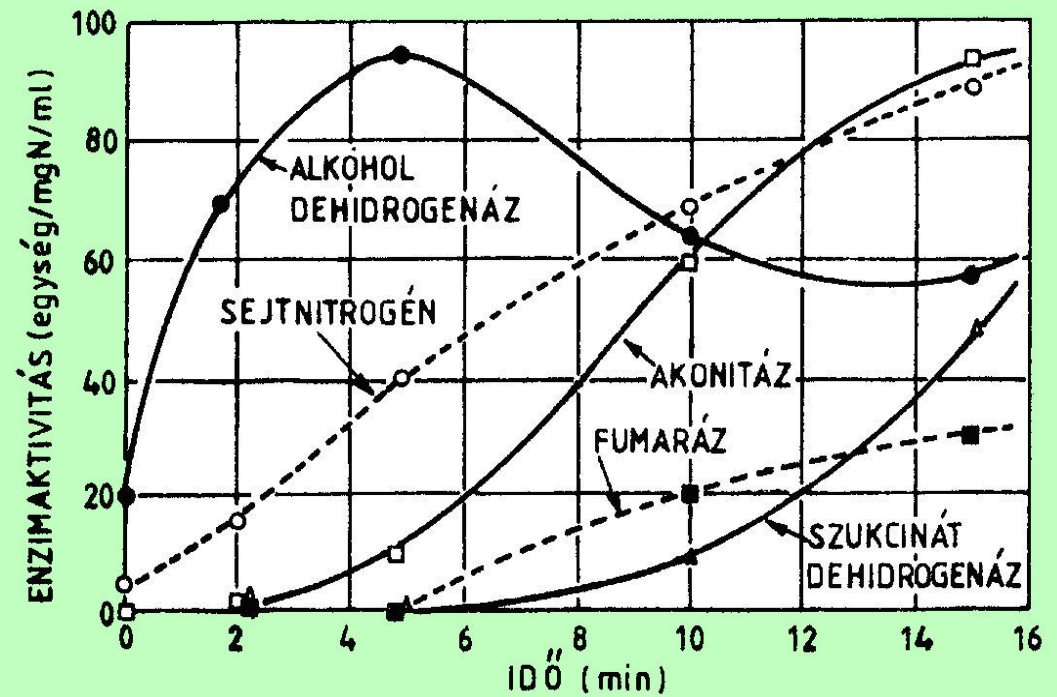
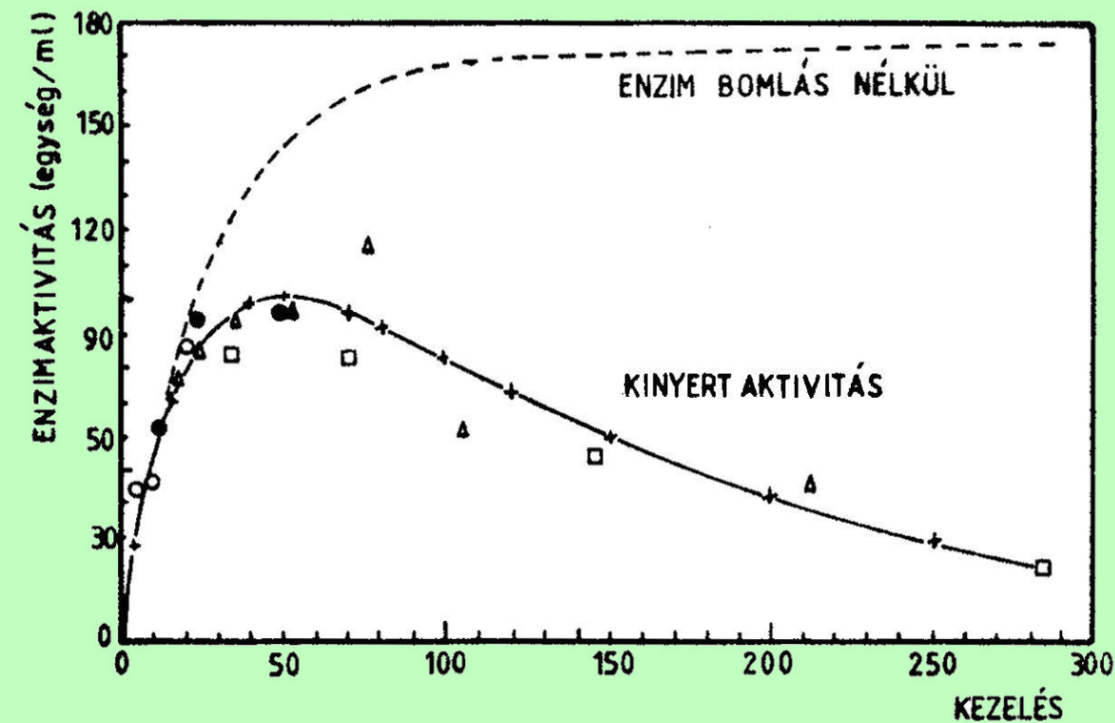
A konstansokat összevonva:

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

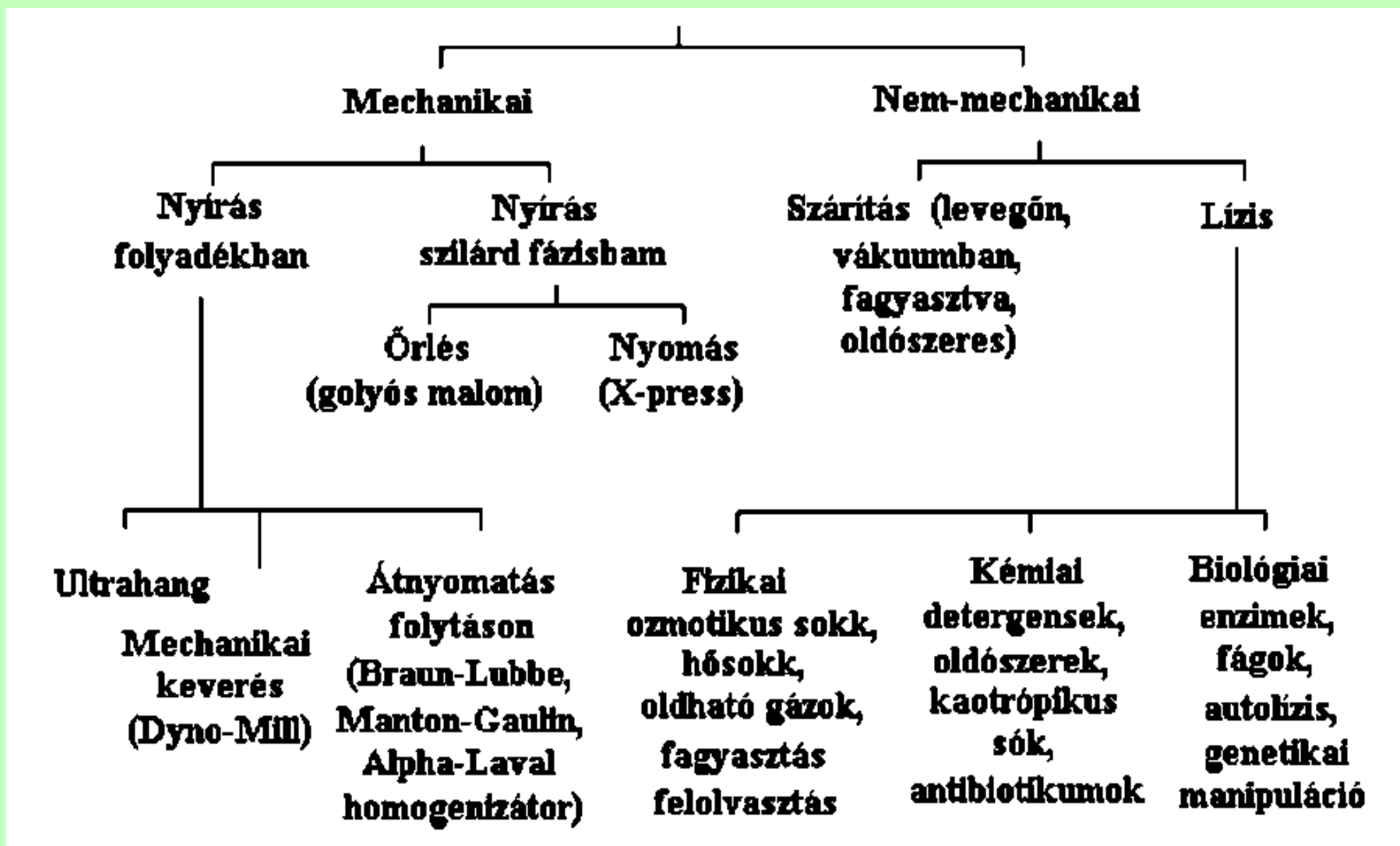


# A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

Kísérleti eredmények: van optimális feltárási idő



# A SEJTFELTÁRÁS MÓDSZEREI



# ULTRAHANGOS FELTÁRÁS

„Szonikálás”

15-25 kHz

Kavitációs mechanizmus

Melegszik → hűtés

szabad gyökök

Csak laborban.



# GYÖNGYMALMOK

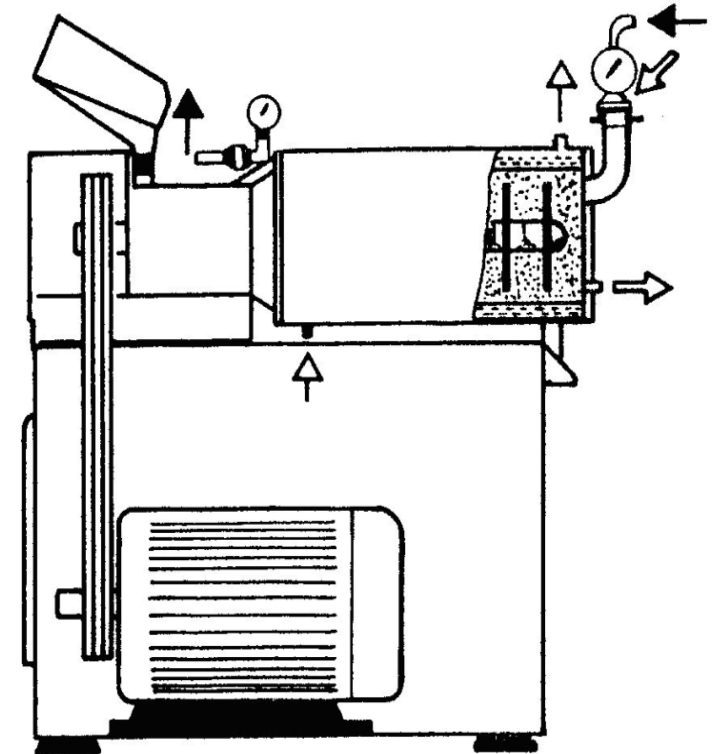
Festékipari pigment-homogenizátorok

0,1-2 mm kopásálló üvegyöngyök

Dörzsölő-koptató hatás

Tárcsás keverők

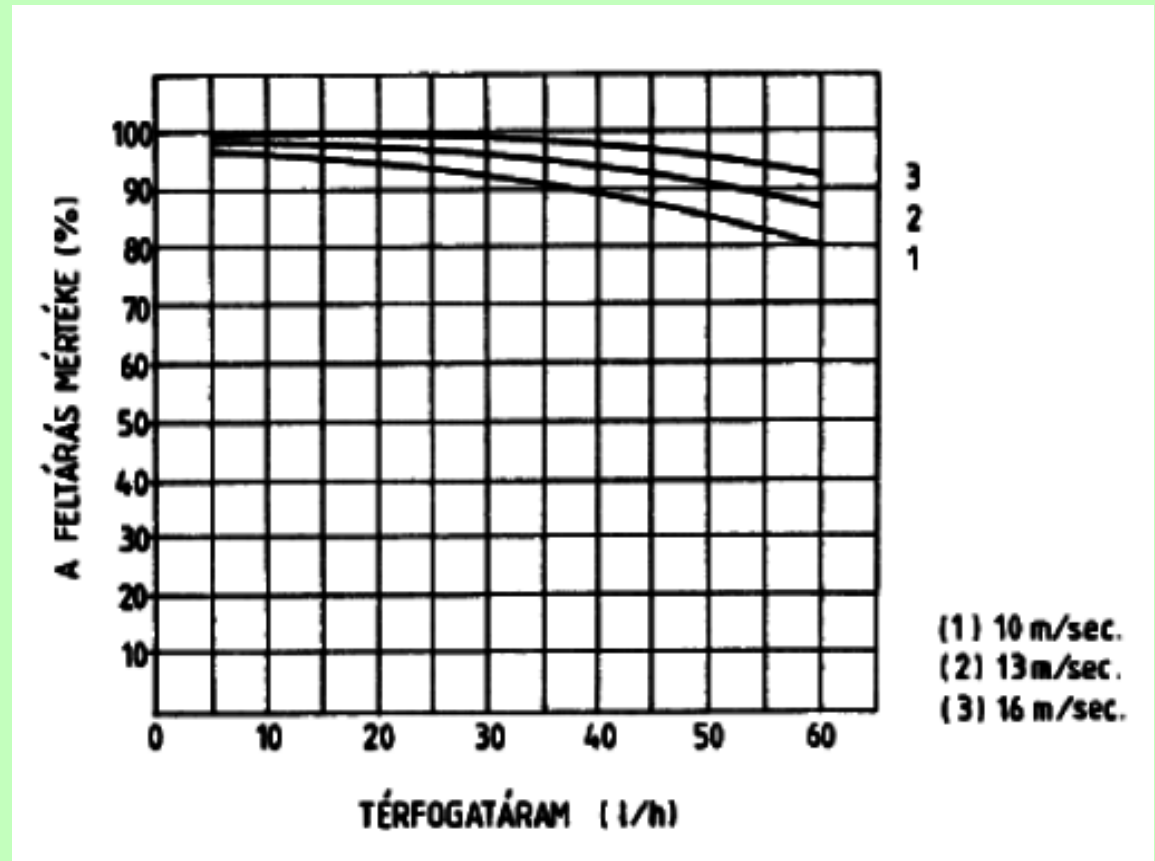
- SZUSZPENZIÓ
- ÜVEGGYÖNGYÖK
- HŐFOKSZABÁLYOZÁS



# GYÖNGYMALMOK



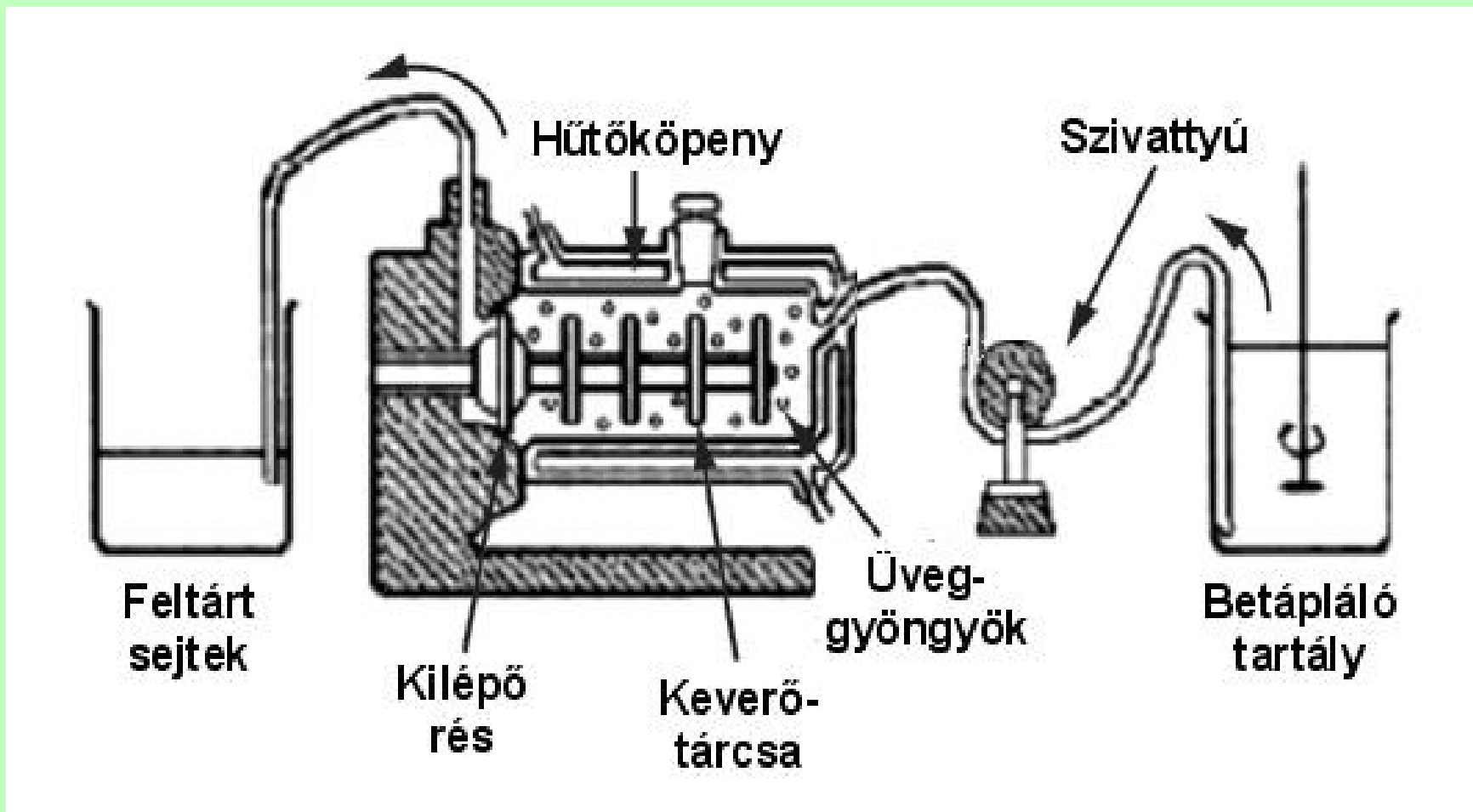
Tárcsás keverők, nagy fordulatszám



# GYÖNGYMALMOK

Folyamatosan üzemeltethetők – az üvegyöngyöket vissza kell tartani.

Hűtés



# IPARI BERENDEZÉSEK

## DYNO-MILL

Technische Daten    Technical Data    Données techniques

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





# GYÖNGYMALMOK

## Előnyök:

- Folytonosítható
- Léptéknövelhető

## Hátrányok:

- Nagy energiafogyasztás (+ hűtés)

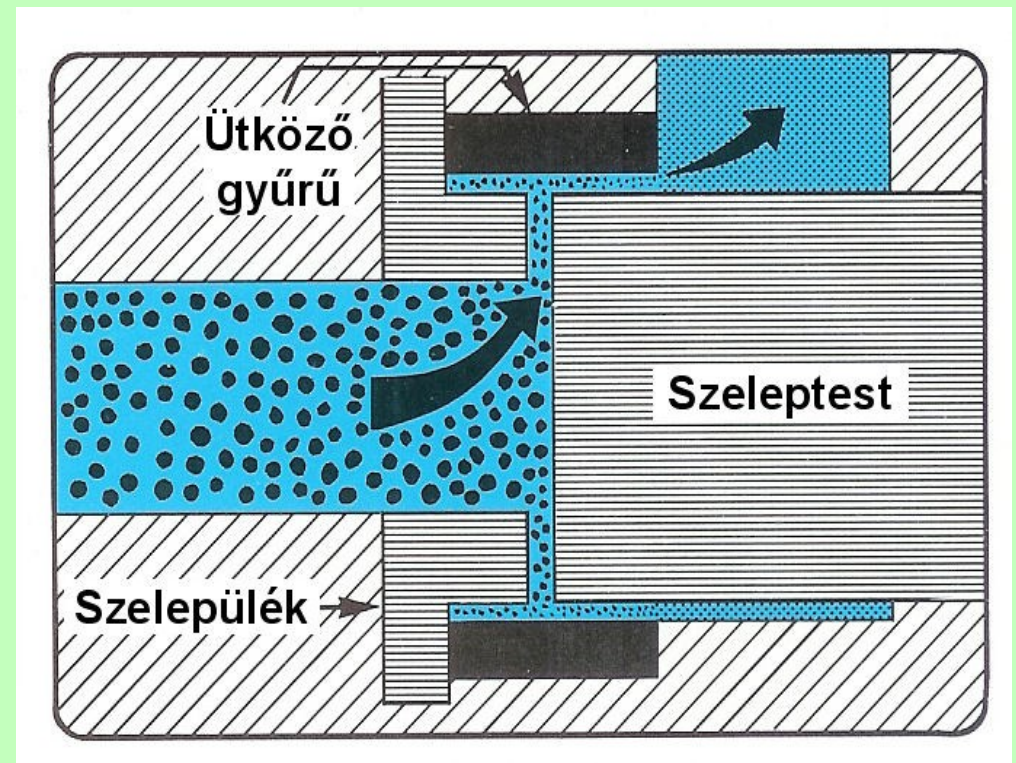
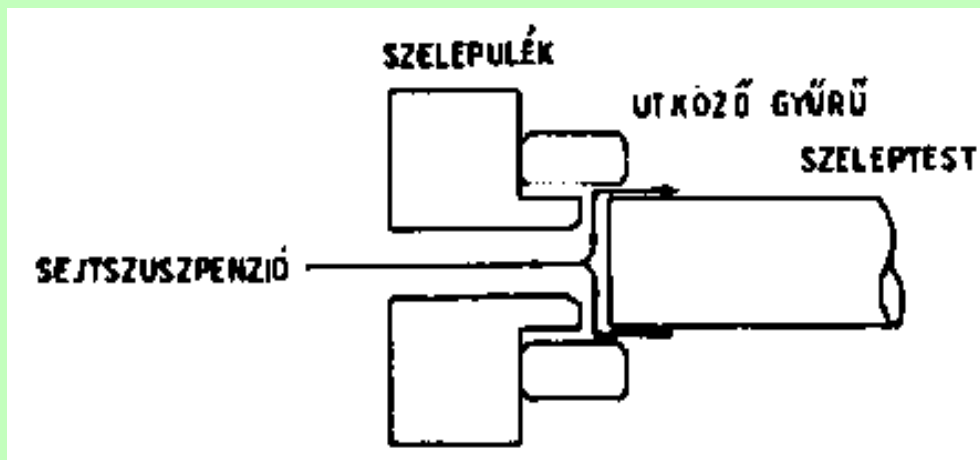


# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

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

Feltárási mechanizmusok:

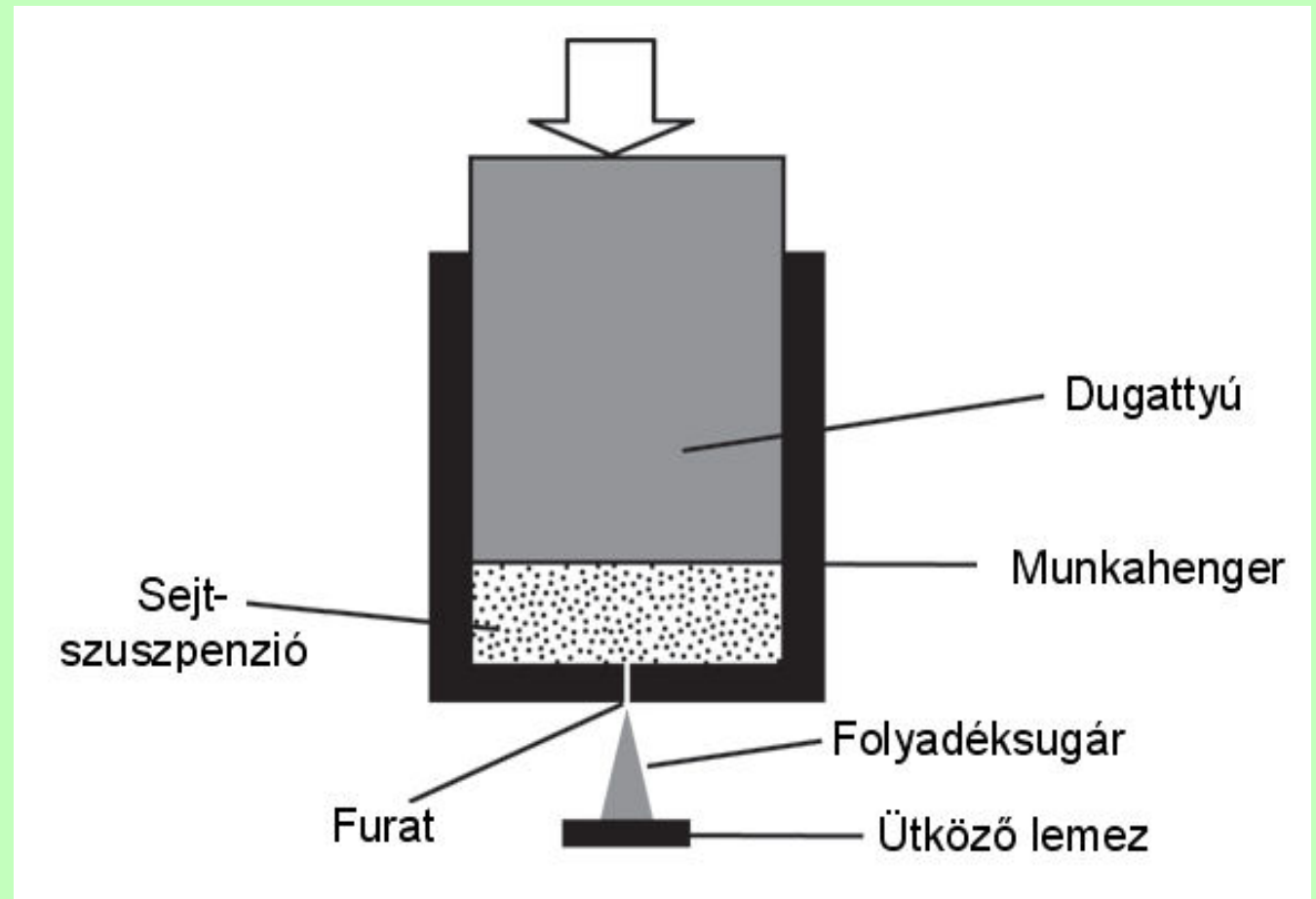
- áramlási
- ütközési



# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

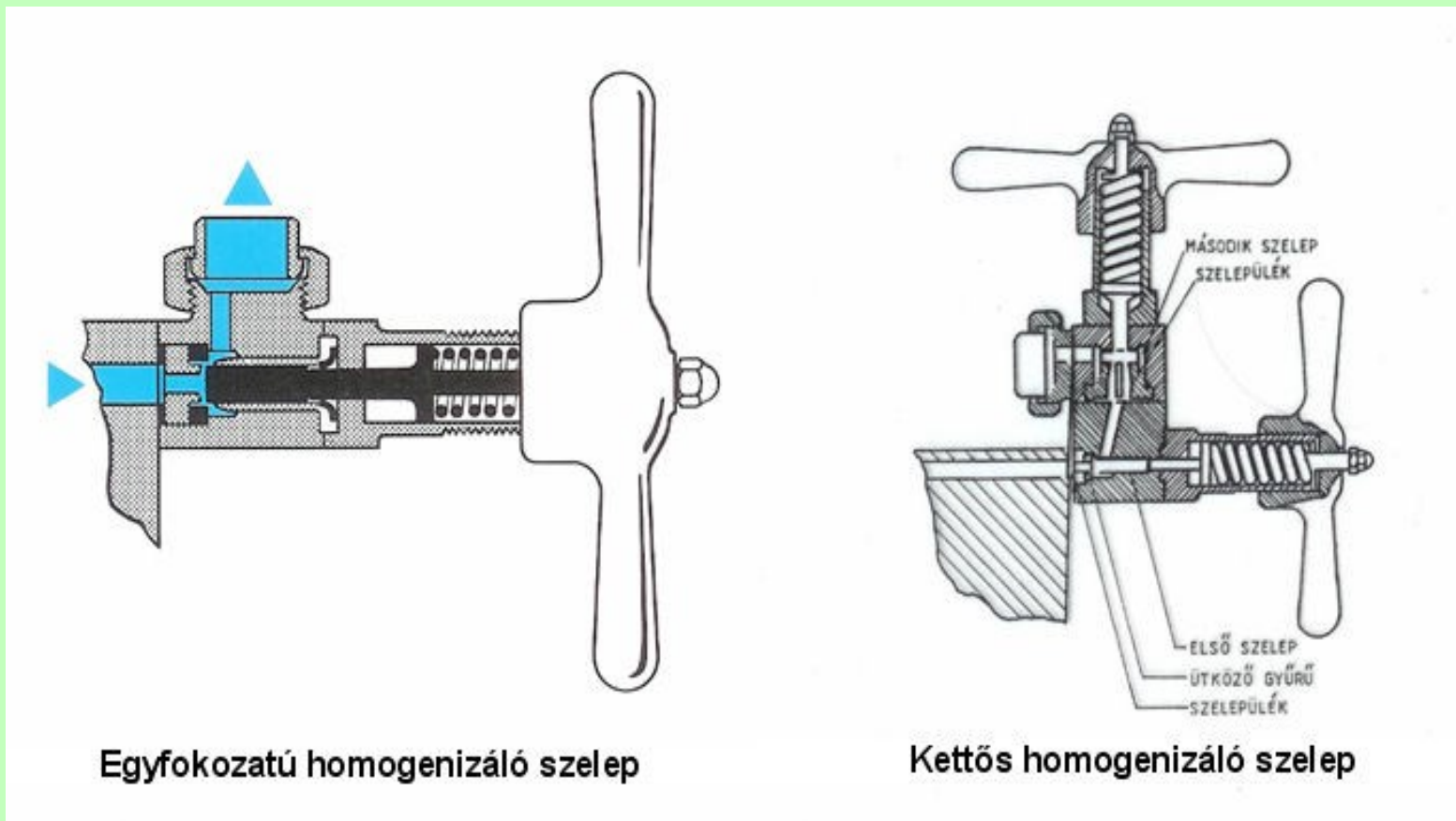
## Szakaszos megoldás (French press)

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



# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

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

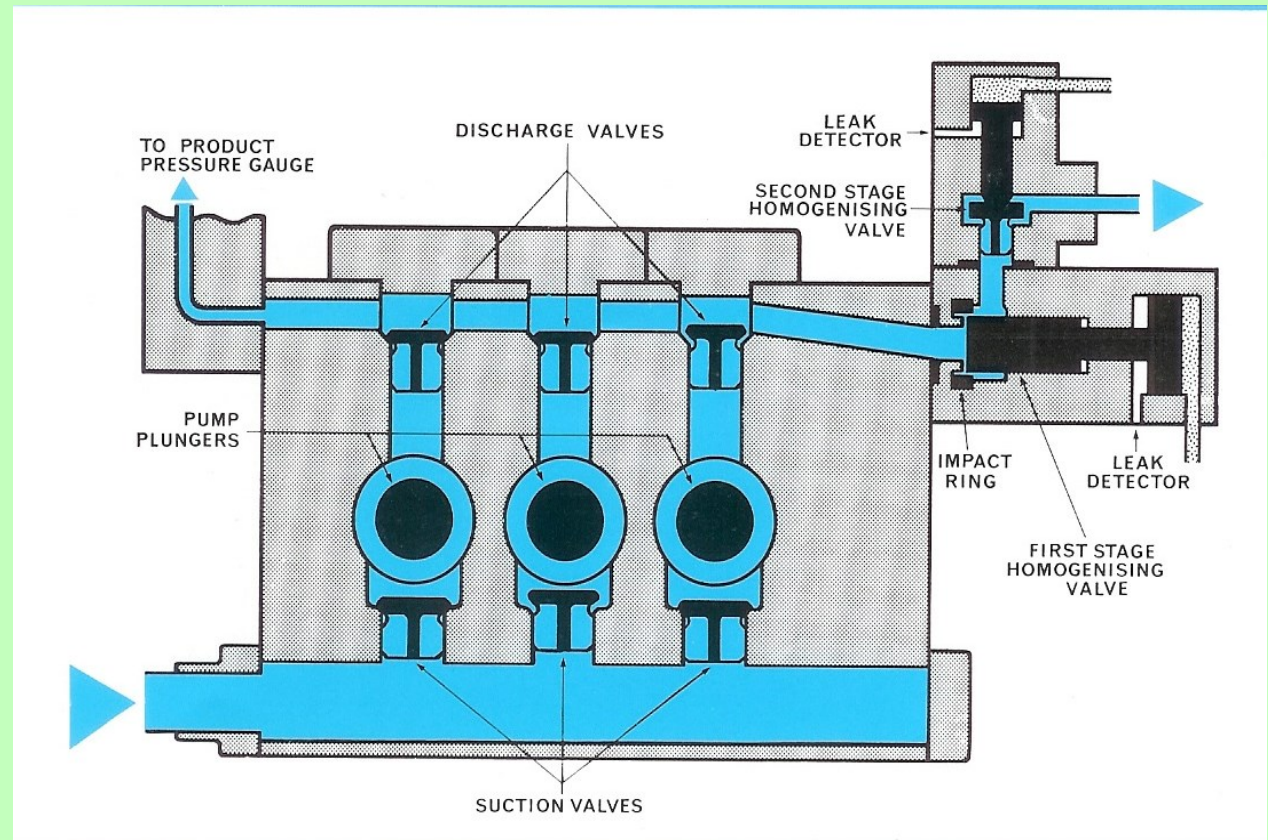
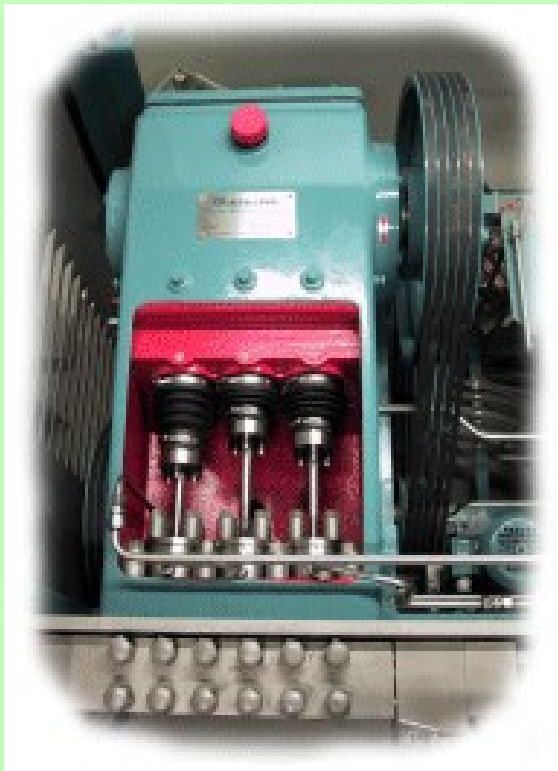


# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Milyen szivattyú képes ilyen nyomást létrehozni?

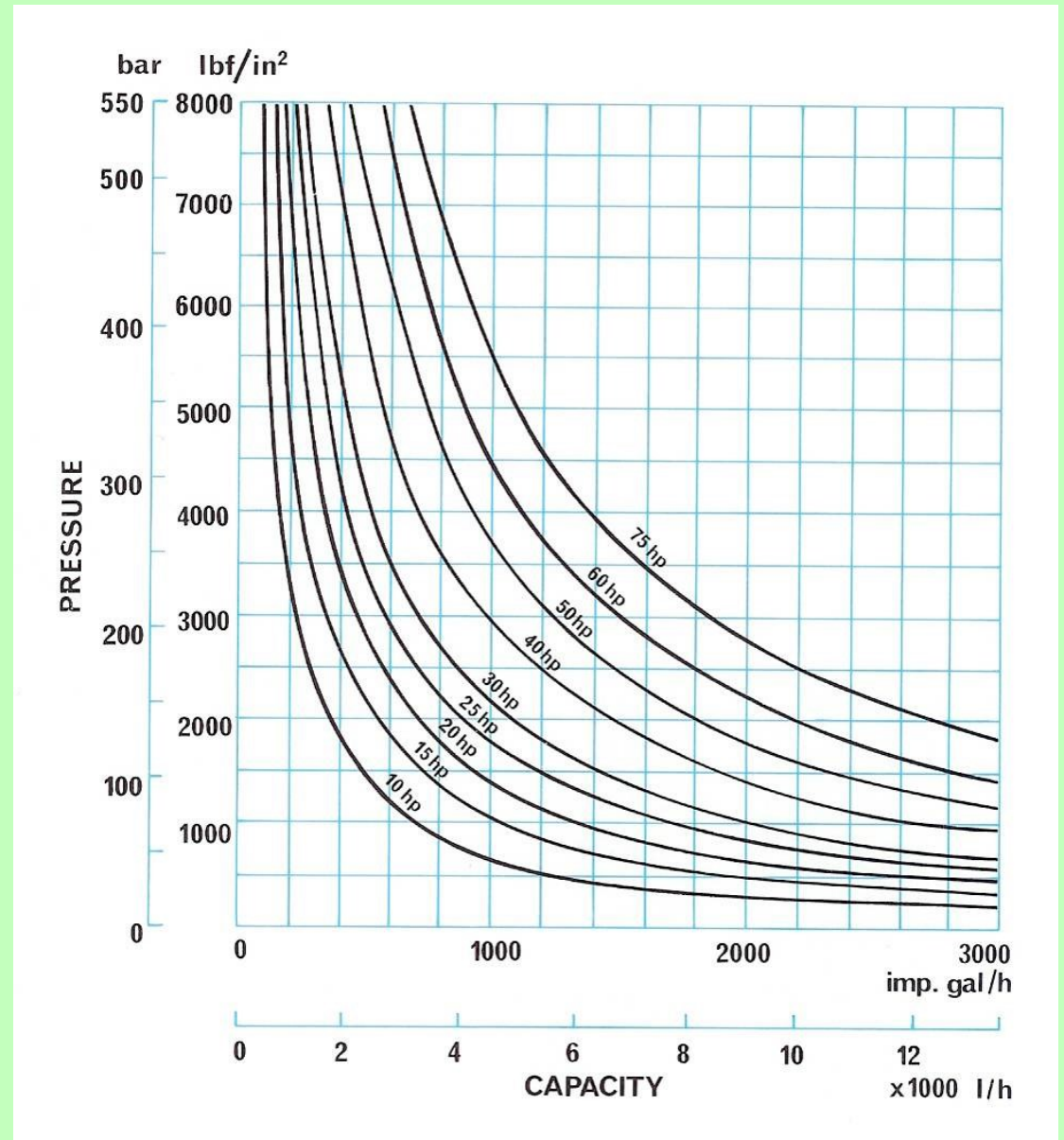
Csak a dugattyús.

Az egyenletesebb működés érdekében 3 dugattyú dolgozik, fáziseltolással



# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

A homogenizátor működési jelleggörbéje lényegében azonos a szivattyúéval.

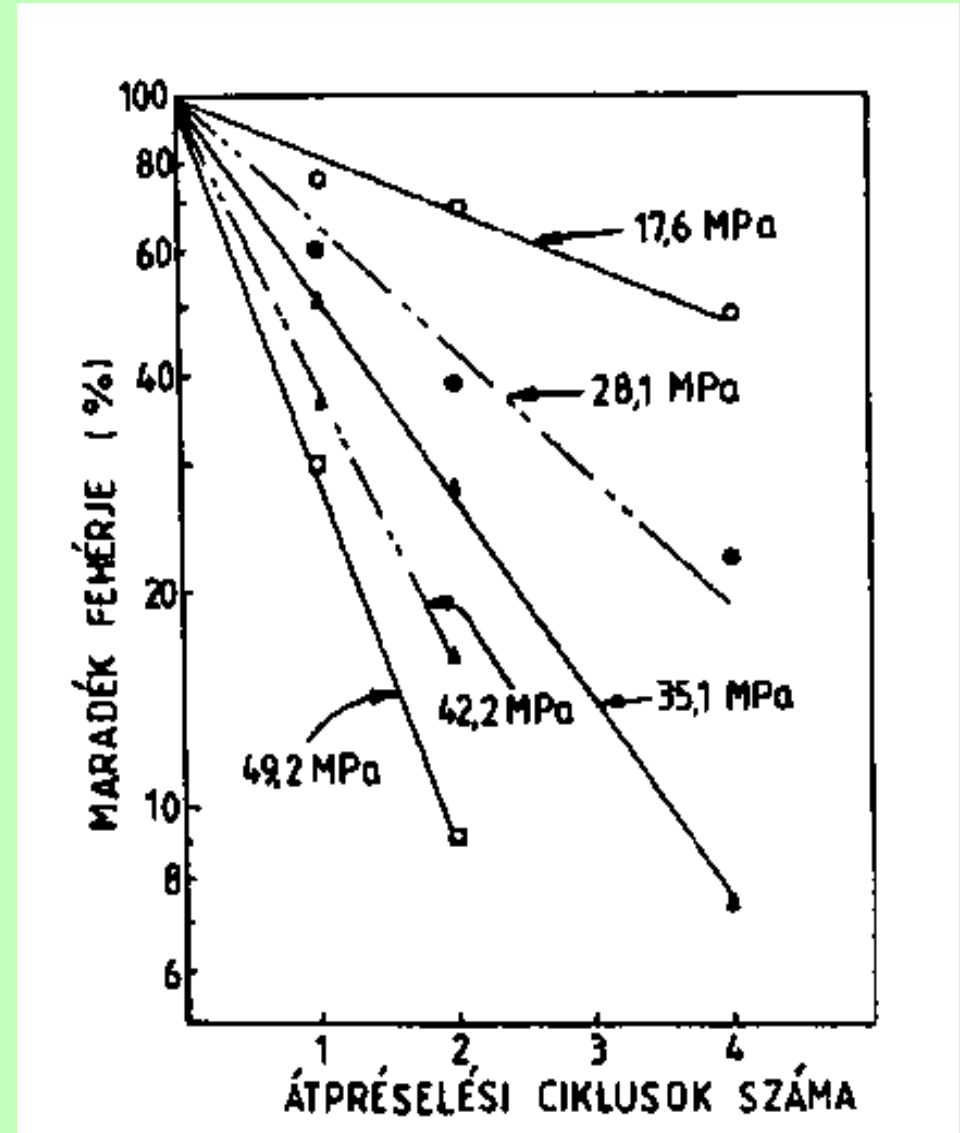


# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Rendszerint többszöri átnyomatásra, cirkuláltatásra van szükség (Hűtés!)

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

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



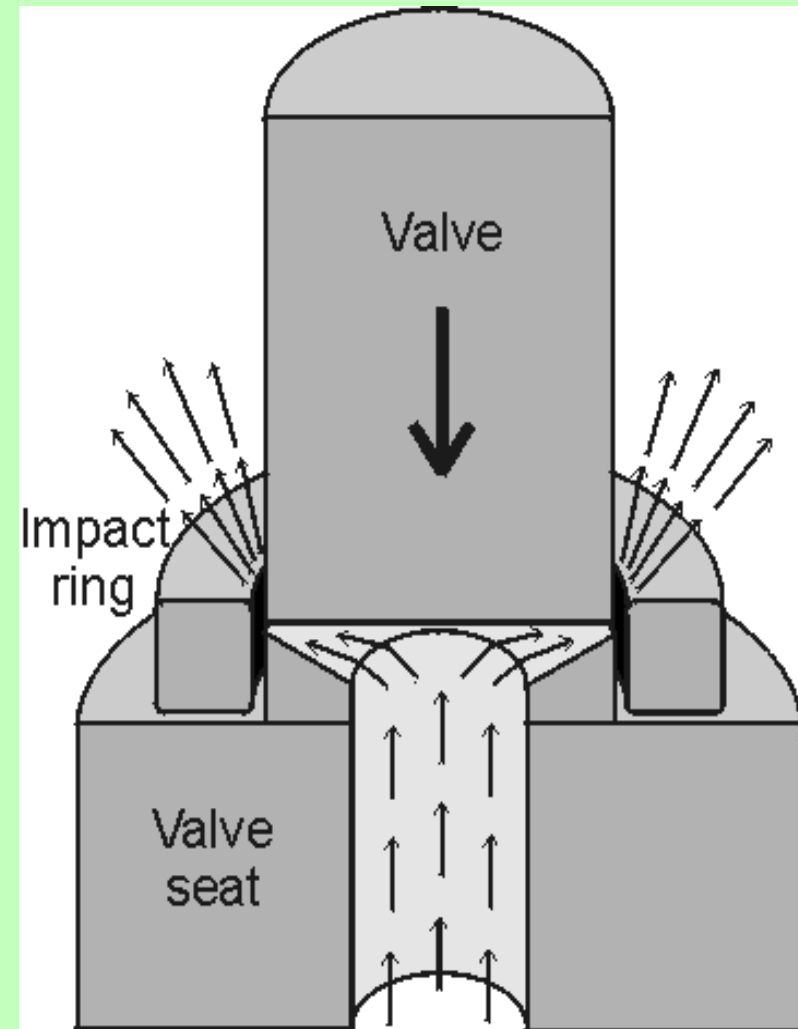
# NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

## Előnyök:

- Folytonosítható
- Léptéknövelhető

## Hátrányok:

- Nagy energiafogyasztás
- masszív szerkezet
- eltömődésveszély



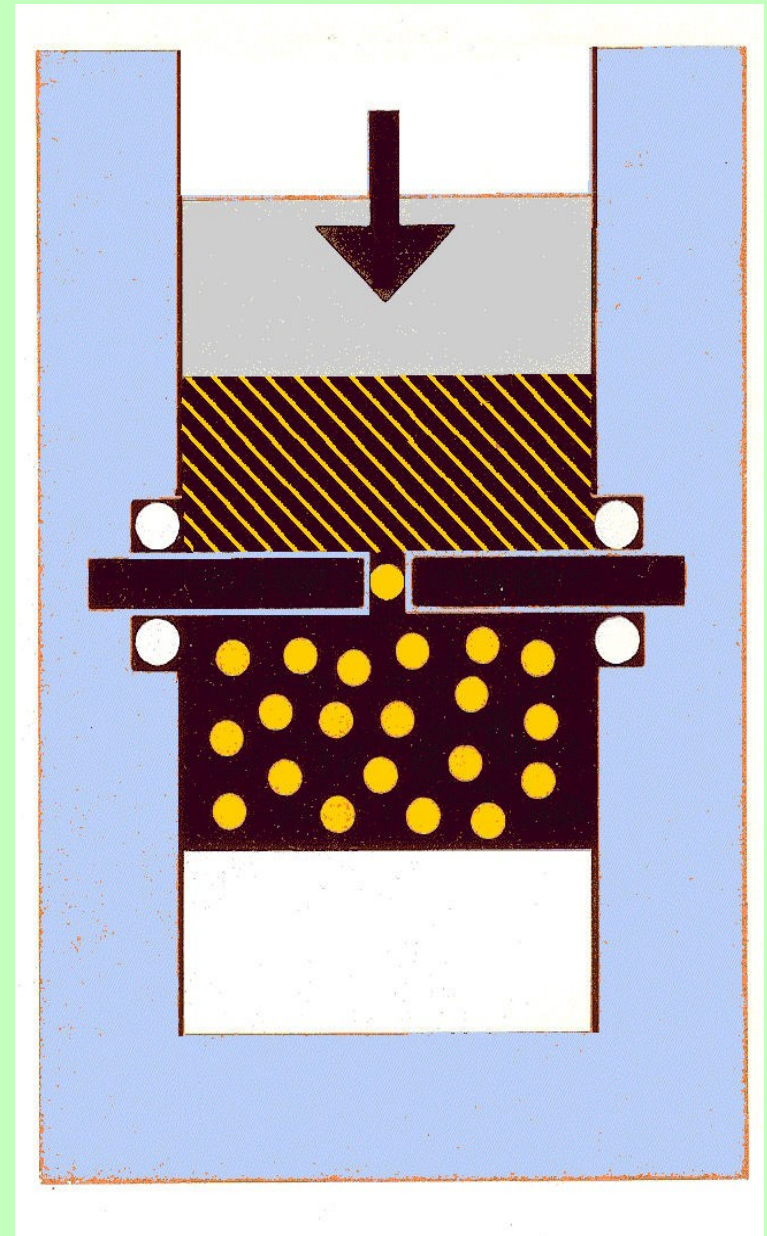


# X-PRESS

A sejtszuszpenziót fagyott állapotban préselik át egy furaton.

Hogyan lehetséges ez?

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



# A JÉG FÁZISDIAGRAMJA

Az első hármaspont:  
-22 °C, 211,5 MPa

A kristályok sűrűsége:

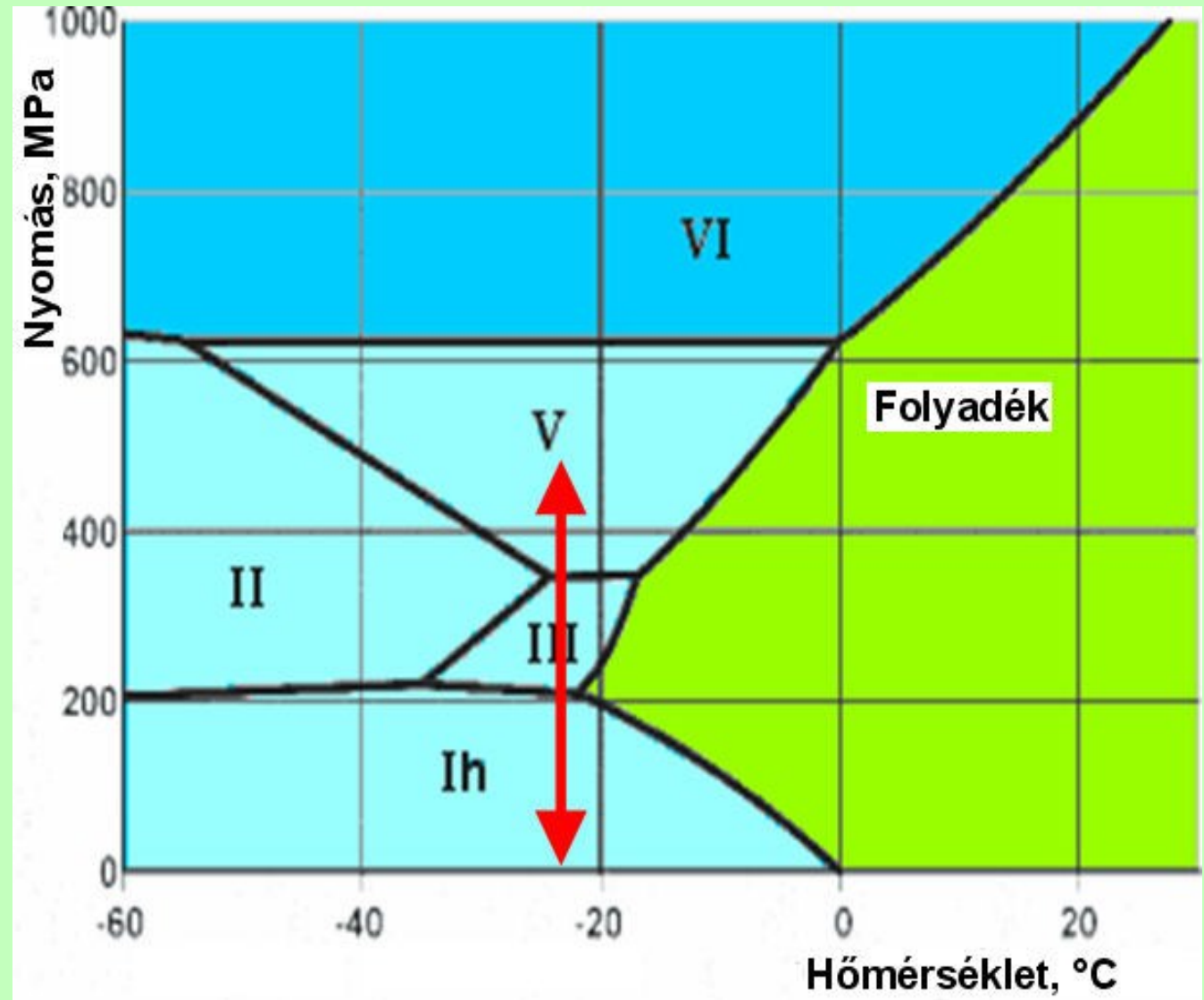
Jég-1 → 0,92

tf csökkenés: -19%

Jég-3 → 1,14

tf csökkenés: -7%

Jég-5 → 1,23



# X-PRESS

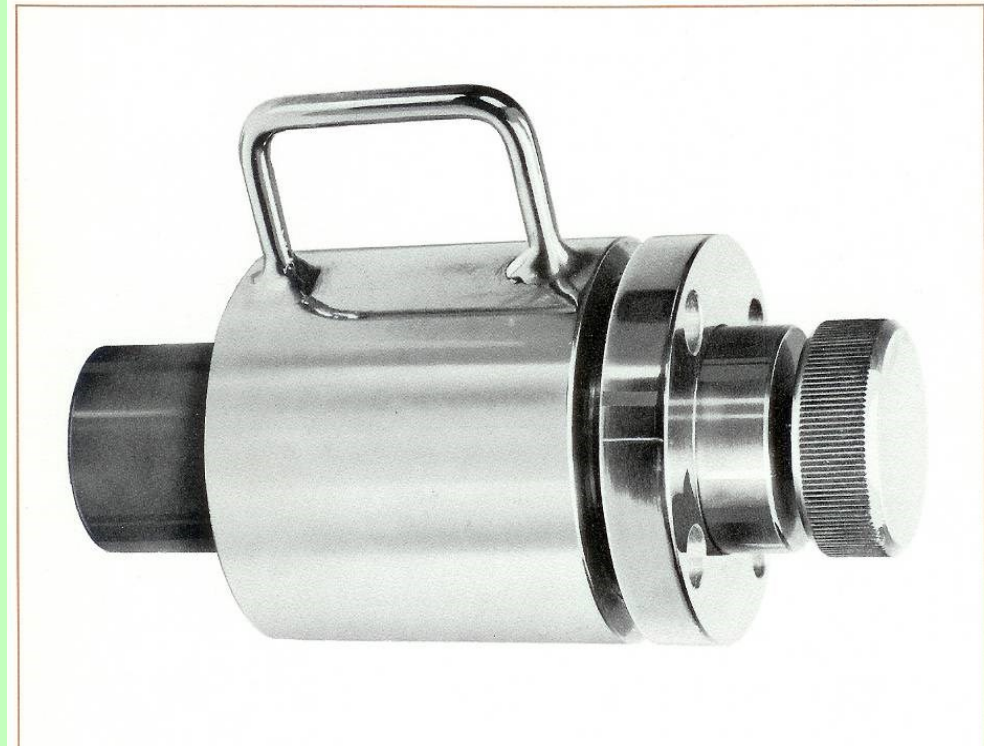
## Előnyök:

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

## Hátrányok:

- Szakaszos
- Robosztus szerkezet
- Nem léptéknövelhető

***X-PRESS Zellendesintegrator***



# FIZIKAI MÓDSZEREK

## Szárítás:

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

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

Oldószeres szárítás (acetonpor) készítés  
(kombinálható éterrel)

Fagyasztás – felolvasztás

Hősokk - vízben



# FIZIKAI MÓDSZEREK

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

Oldószerekkel:

- Szárítás acetonnal, majd éteres kezelés
- Élesztő autolízis toluollal

Detergensekkel:

Beépülnek a sejtmembránba és rongálják annak szerkezetét.

- Kationos és anionos egyaránt
- Epesavak



# FIZIKAI MÓDSZEREK

## Dekompresszió

Henry törvény:

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

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

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



# ENZIMES MÓDSZEREK

## Sejtfalat bontó specifikus enzimek

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

## Több komponensű készítmények

- csigaenzim - emésztőnedv
- *Trichoderma* indukált enzimek



# GENETIKAI MÓDSZEREK

Lizogén fágokkal → a lizogénia indukálható

Indukált autolízis, apoptózis

