

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.

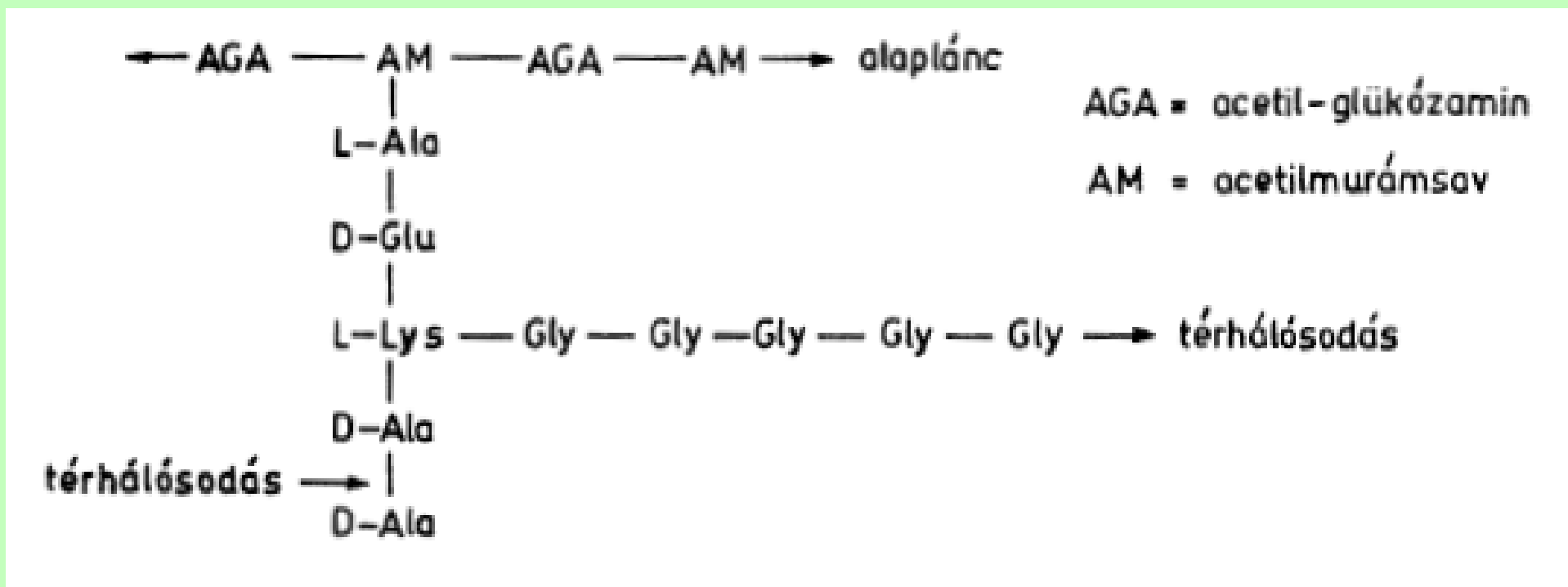
Mekkora ez?

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

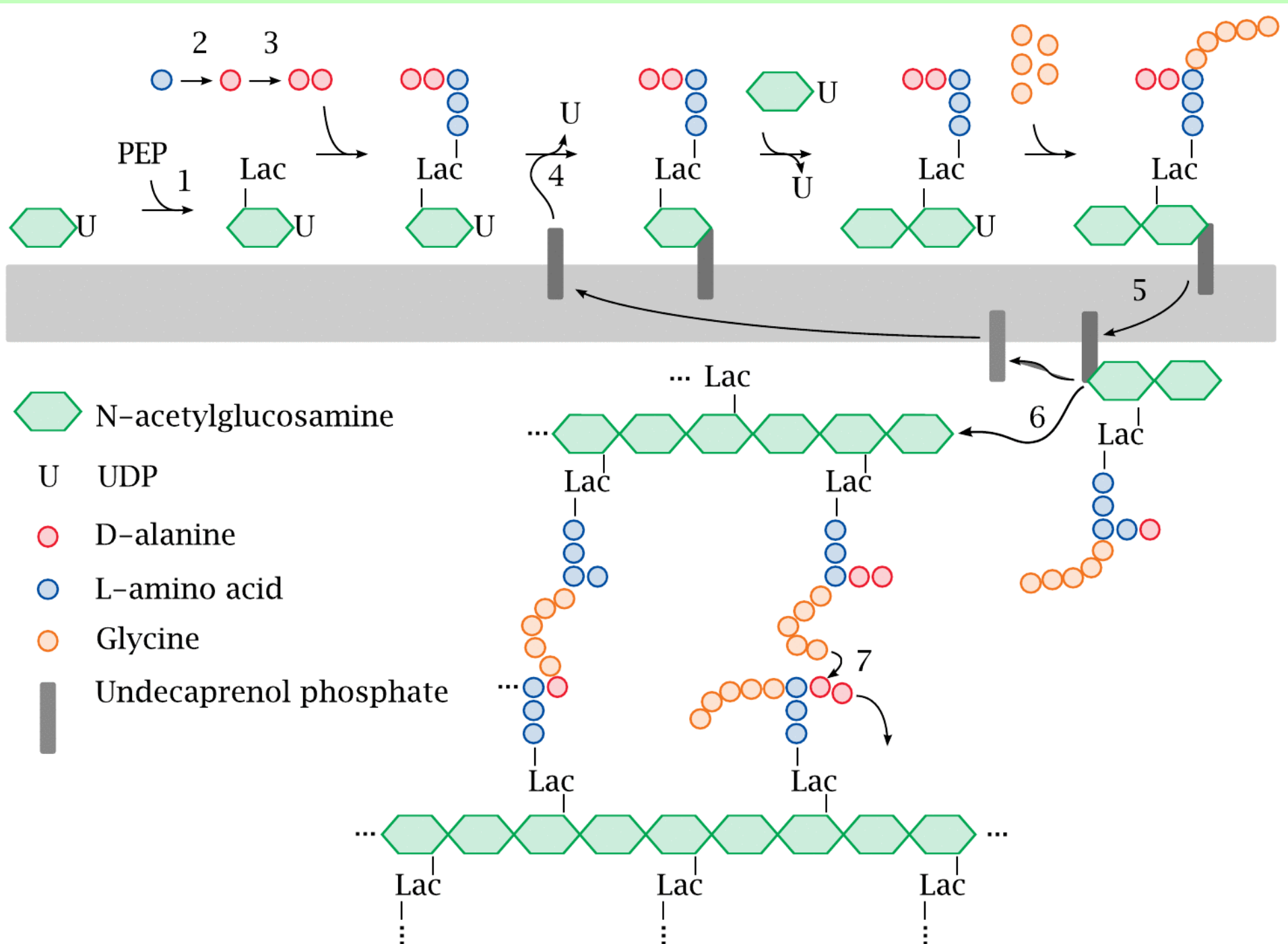


A SEJTFAL

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

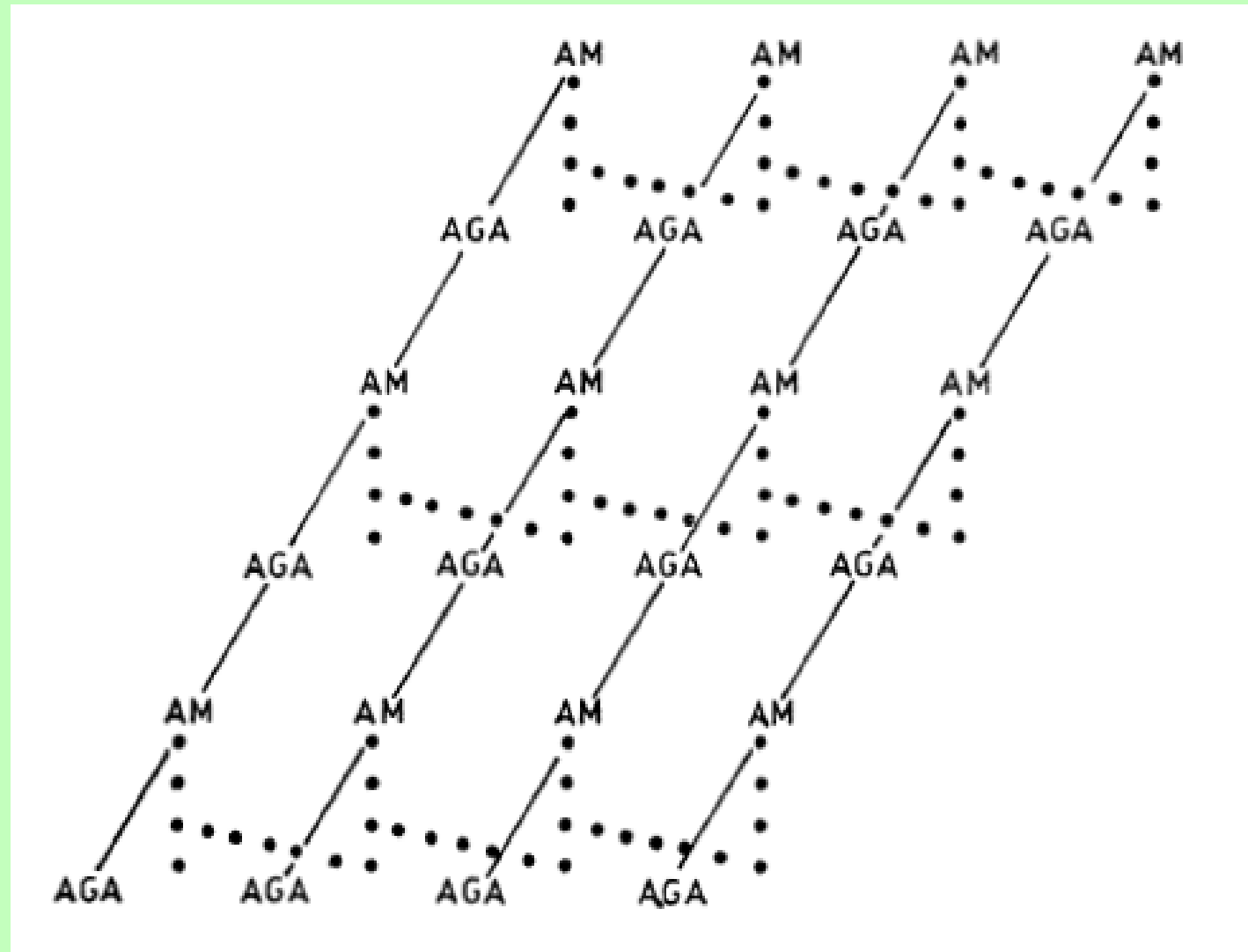


A SEJTFAL BIOSZINTÉZISE



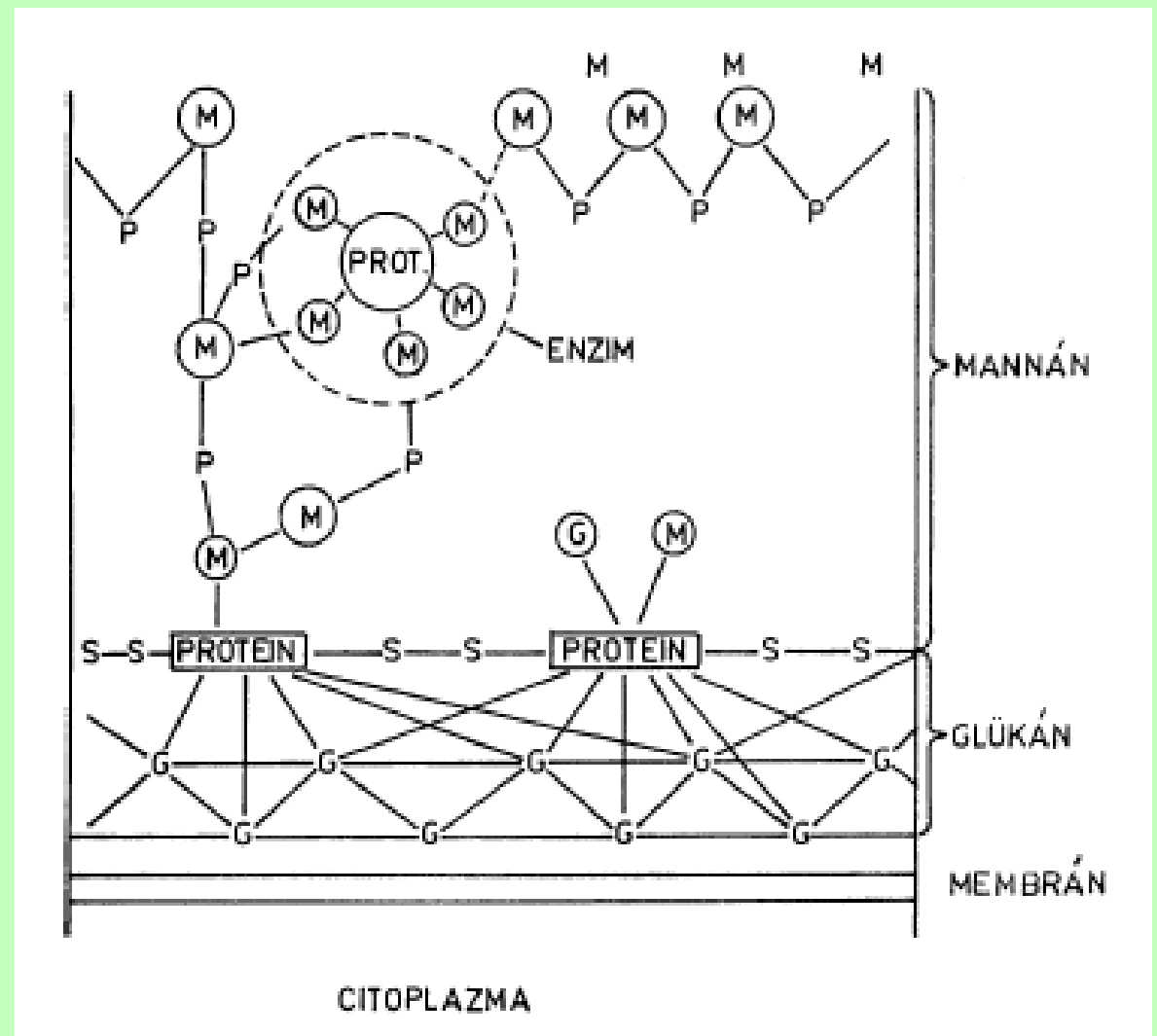
A SEJT FAL

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



AZ ÉLESZTŐK SEJTFALA

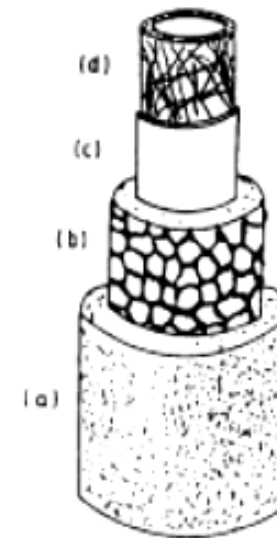
Glükán- és mannán-fehérje komplex rétegek



A PENÉSZEK SEJTFALA

Több réteg, változatos kémiai összetétel:

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



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

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



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:

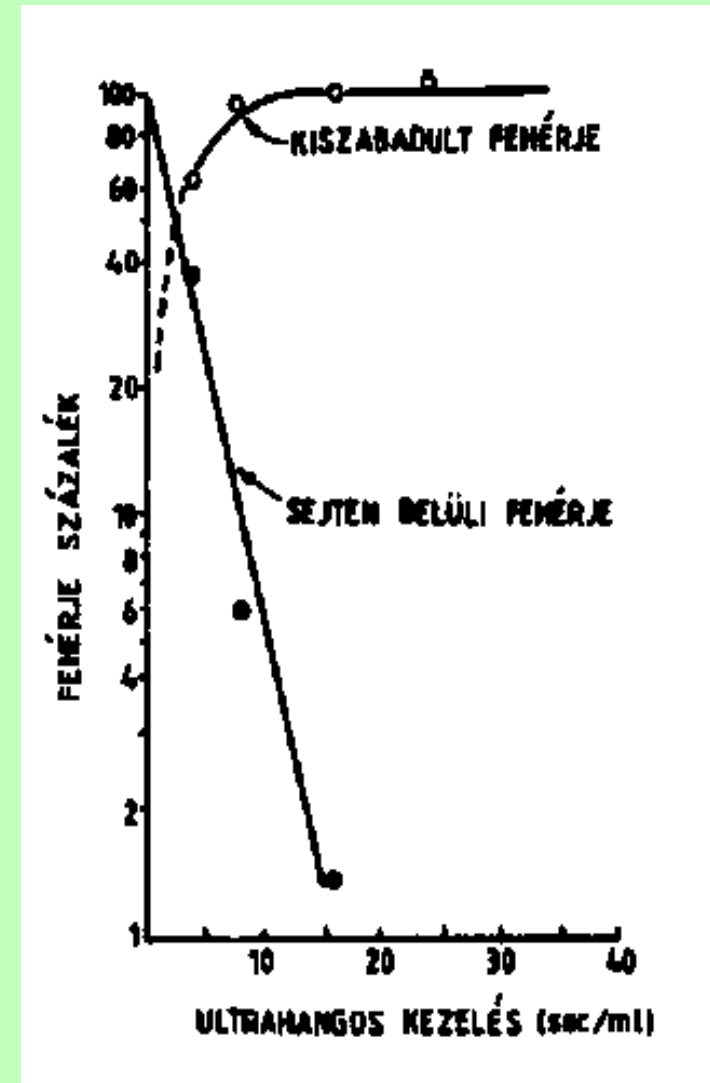
$$R = P_{i0} [1 - e^{-kt}]$$

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:

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

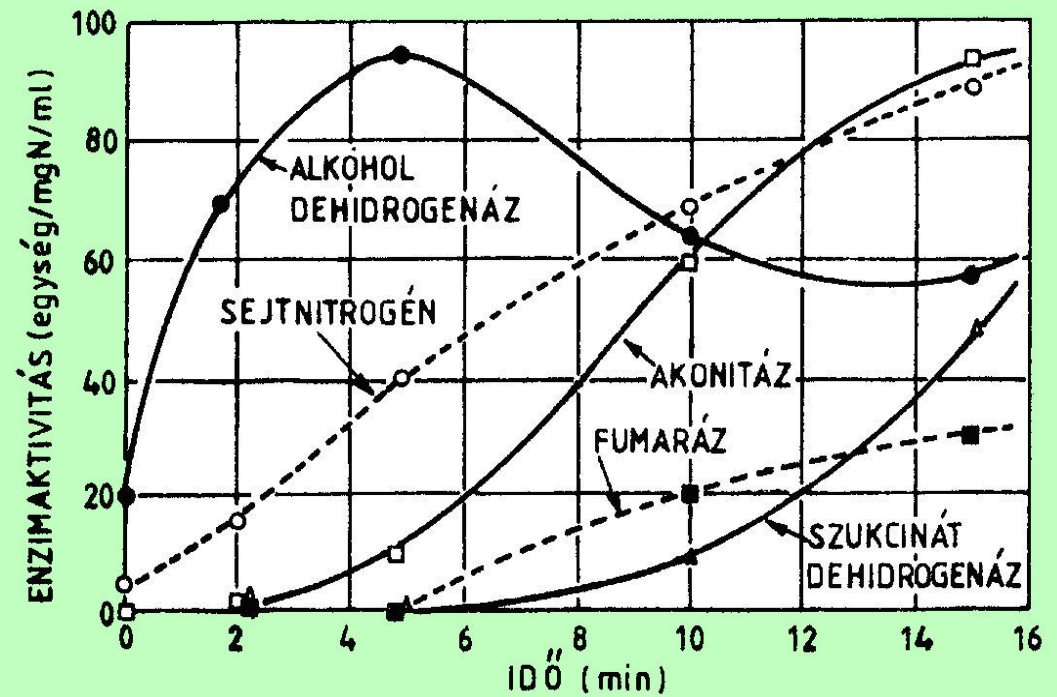
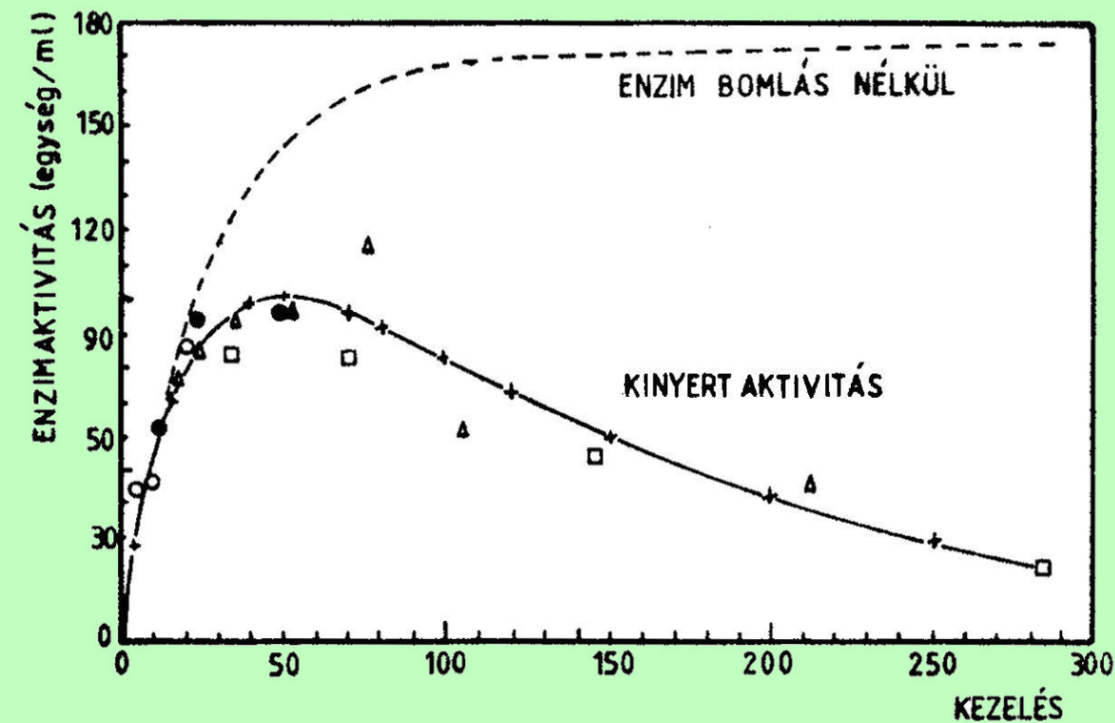
A konstansokat összevonva:

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

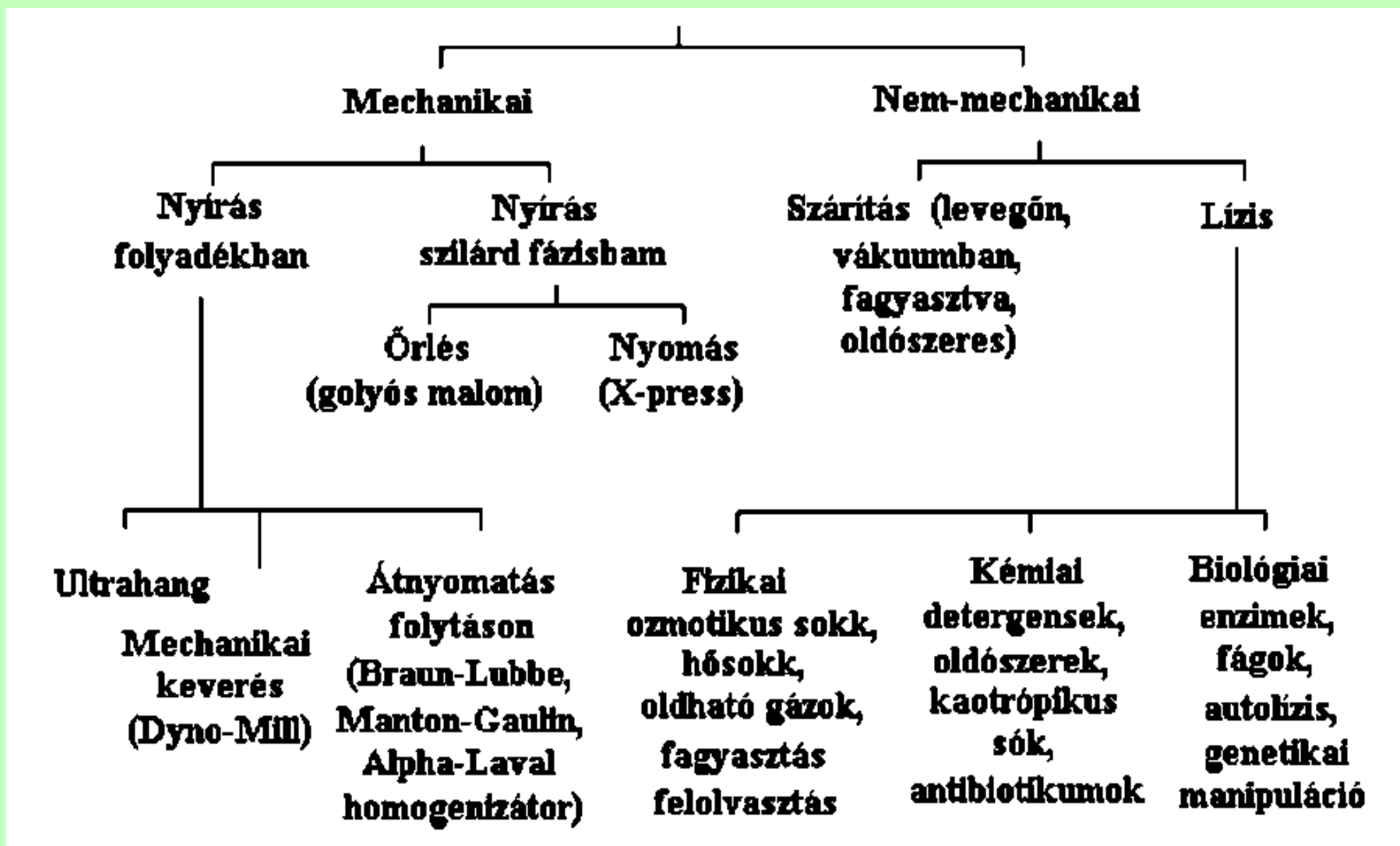


A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

Kísérleti eredmények: van optimális feltárási idő



A SEJTFELTÁRÁS MÓDSZEREI



ULTRAHANGOS FELTÁRÁS

„Szonikálás”

15-25 kHz

Kavitációs mechanizmus

Melegszik → hűtés

szabad gyökök

Csak laborban.



GYÖNGYMALMOK

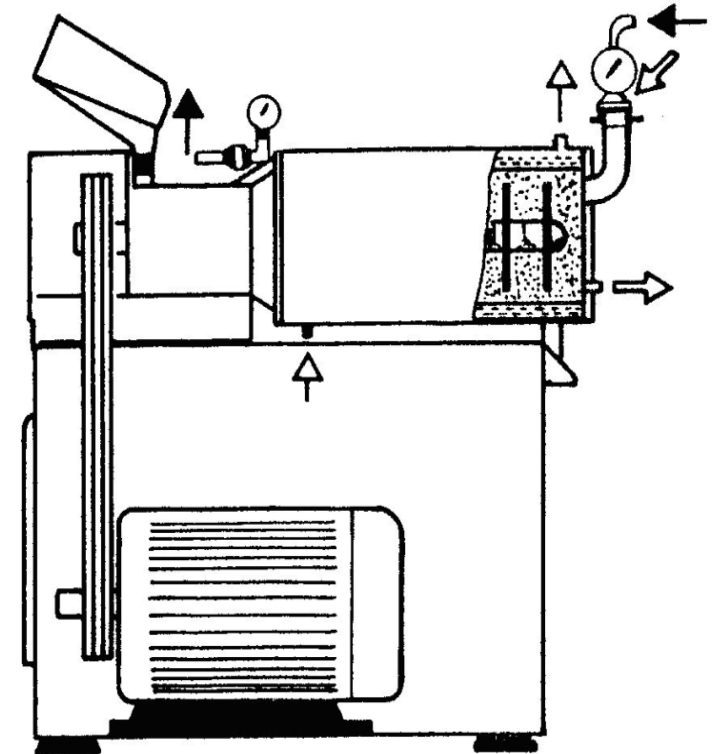
Festékipari pigment-homogenizátorok

0,1-2 mm kopásálló üvegyöngyök

Dörzsölő-koptató hatás

Tárcsás keverők

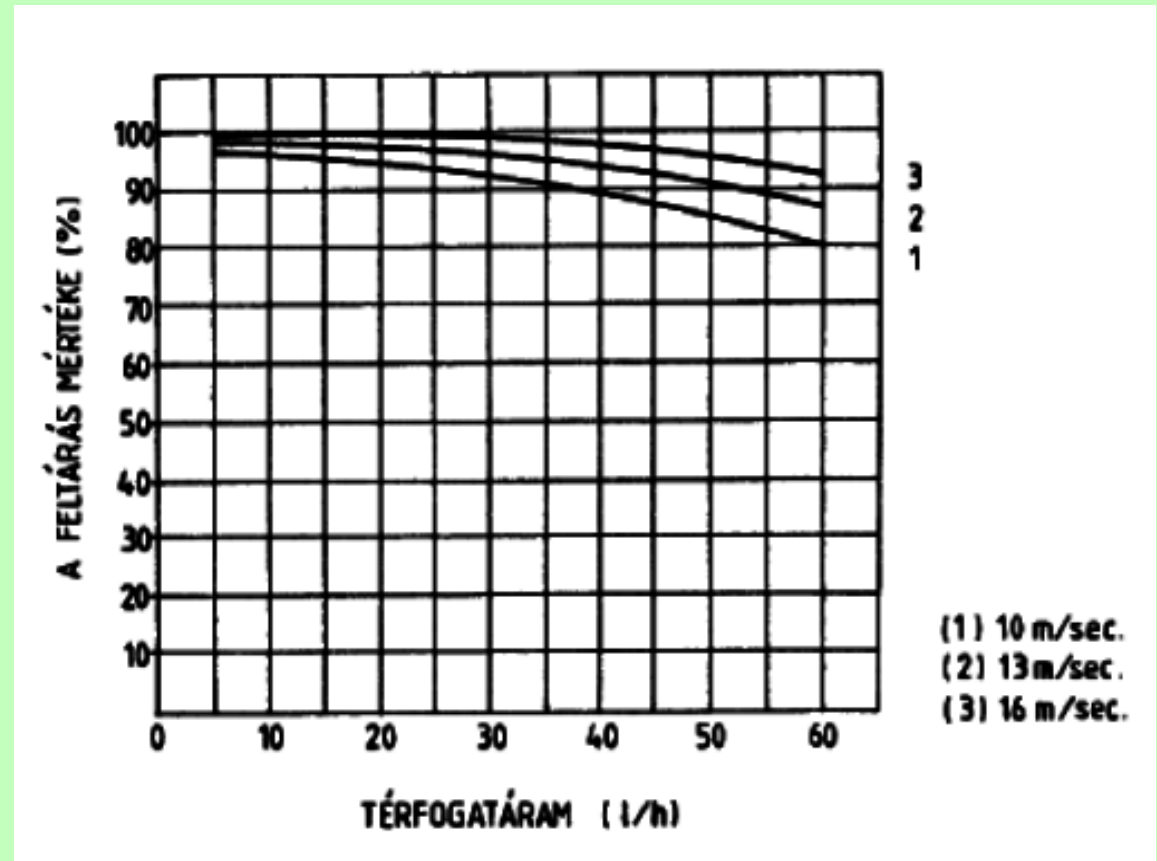
- SZUSZPENZIÓ
- ÜVEGGYÖNGYÖK
- HŐFOKSZABÁLYOZÁS



GYÖNGYMALMOK



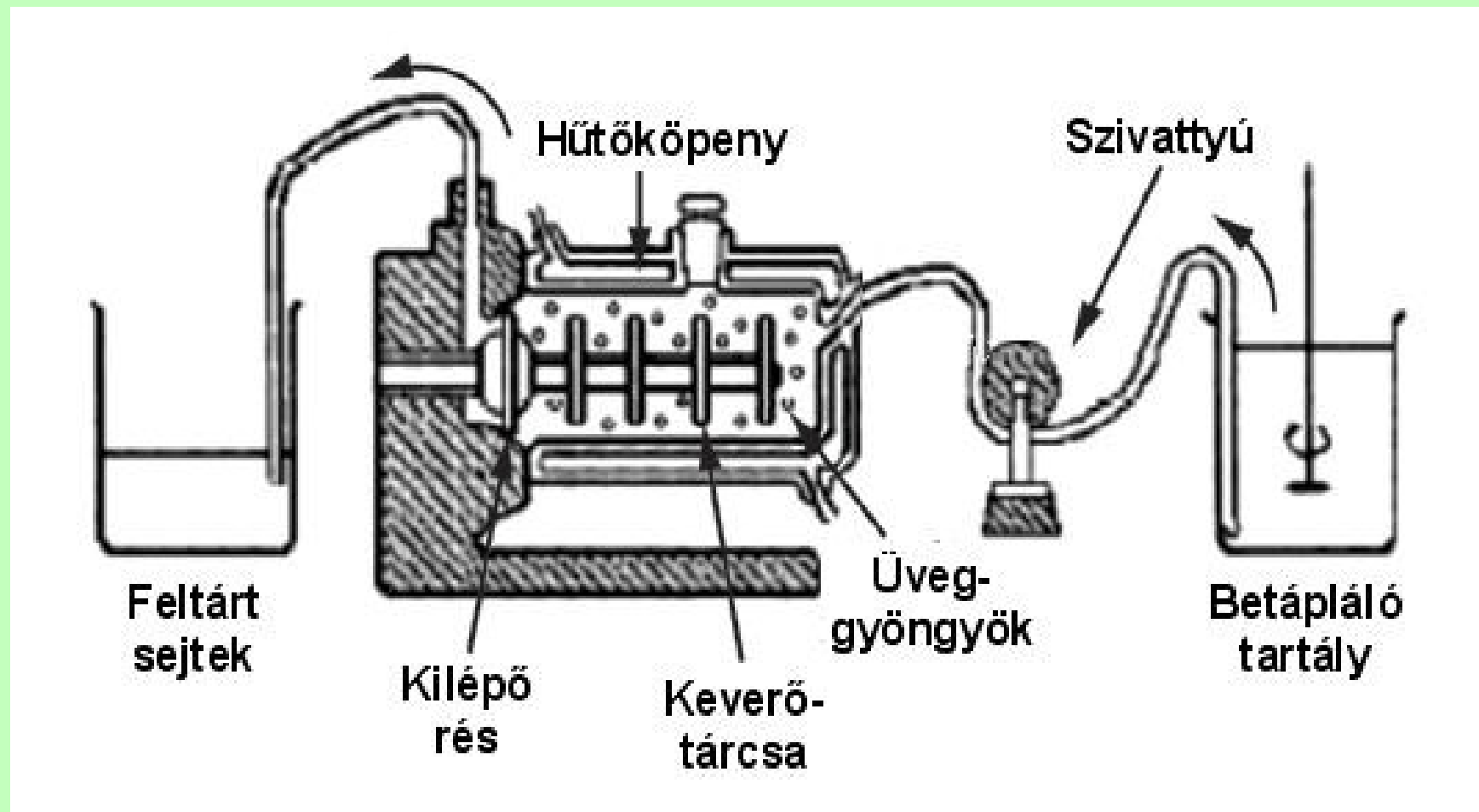
Tárcsás keverők, nagy fordulatszám



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)

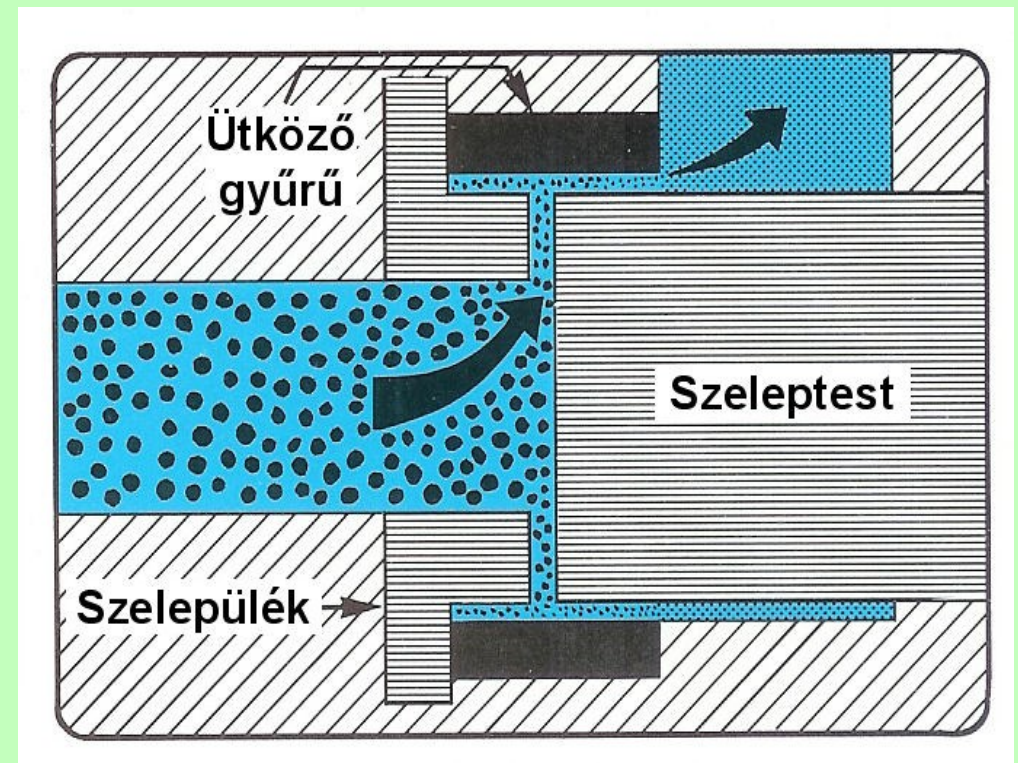
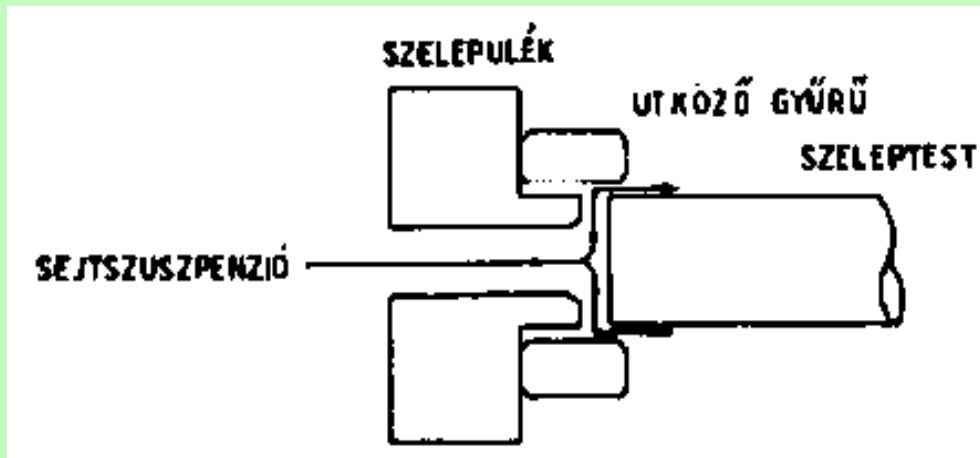


NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

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

Feltárási mechanizmusok:

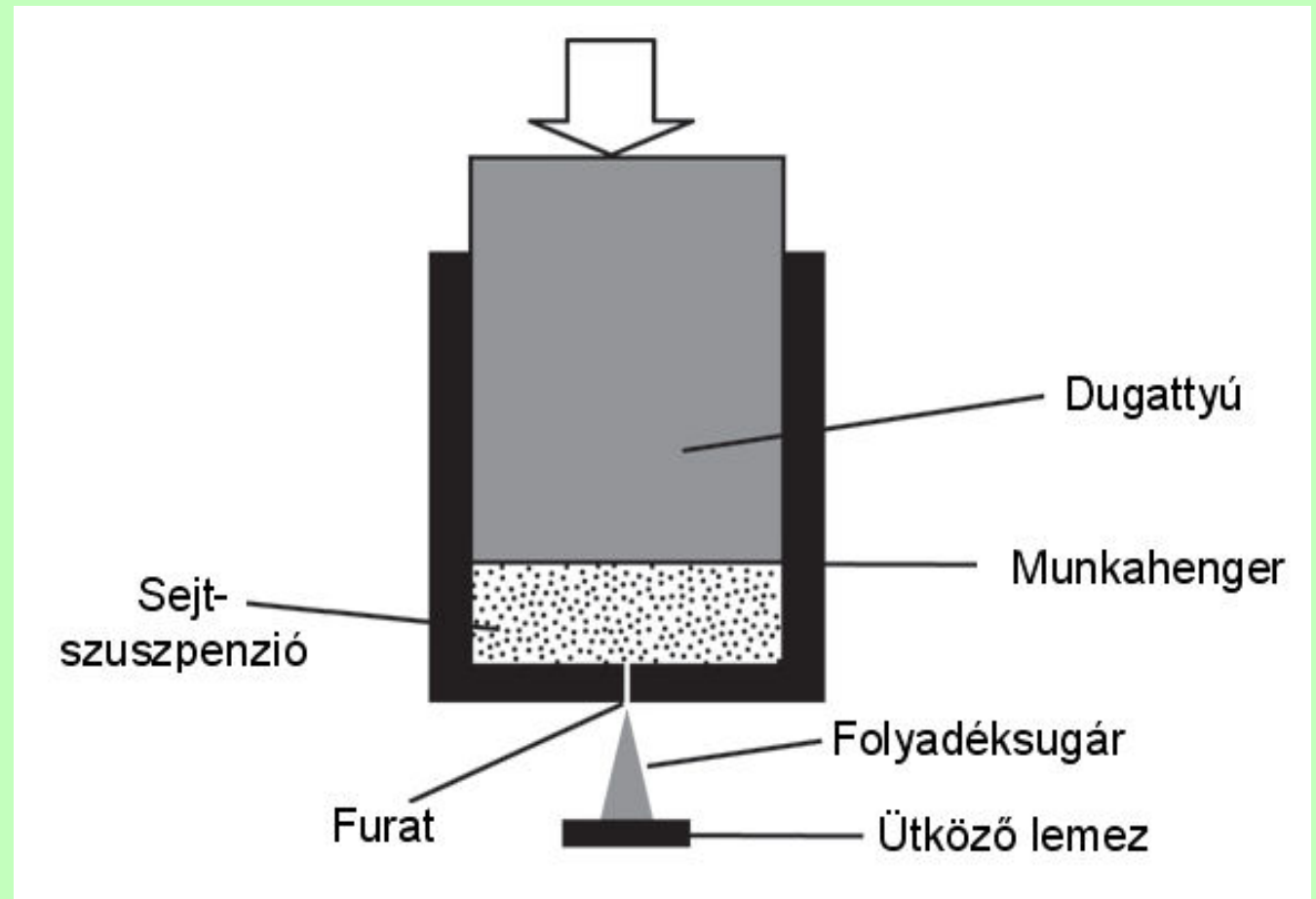
- áramlási
- ütközési



NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

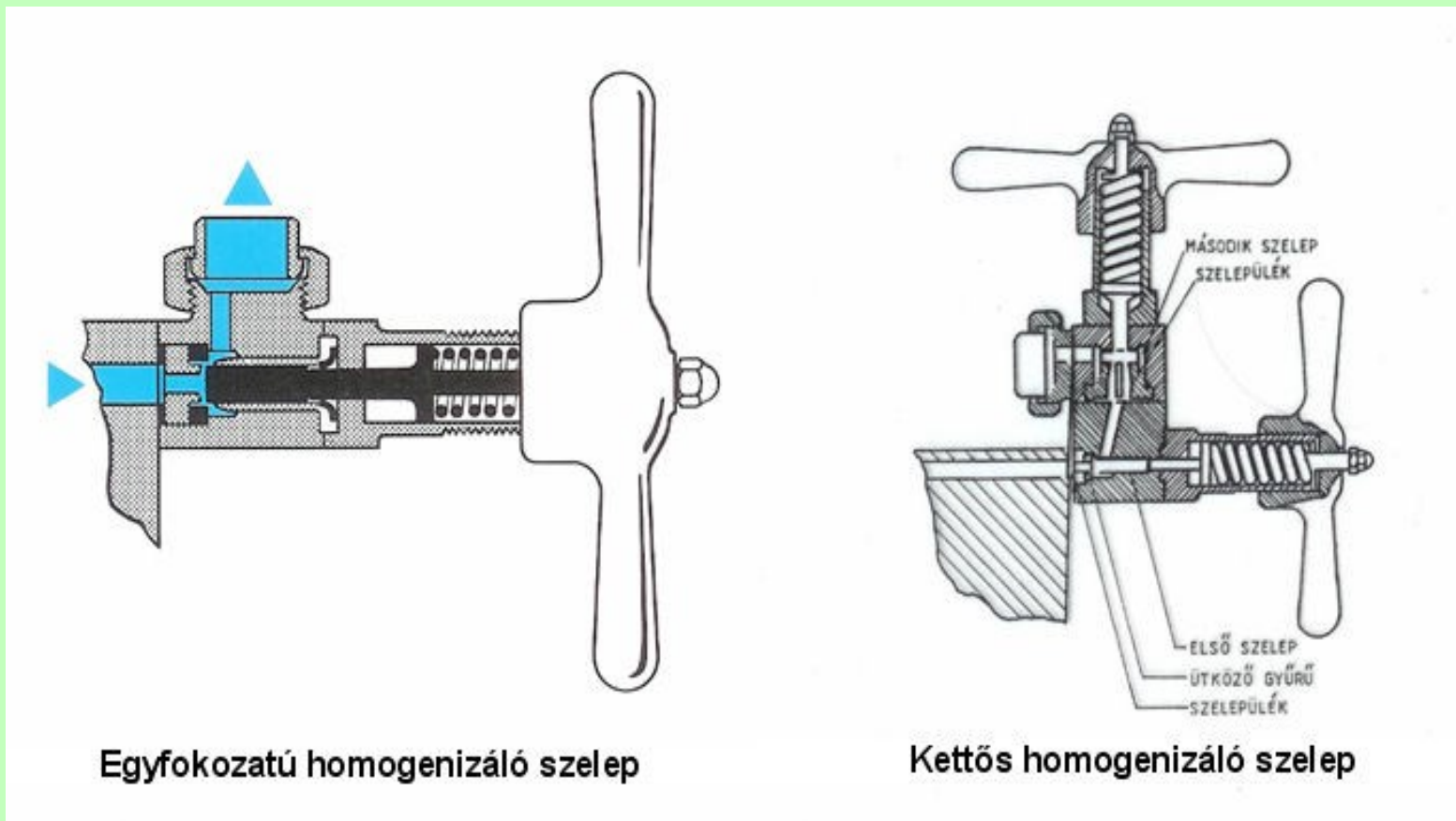
Szakaszos megoldás (French press)

Hidraulikusan mozgató 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

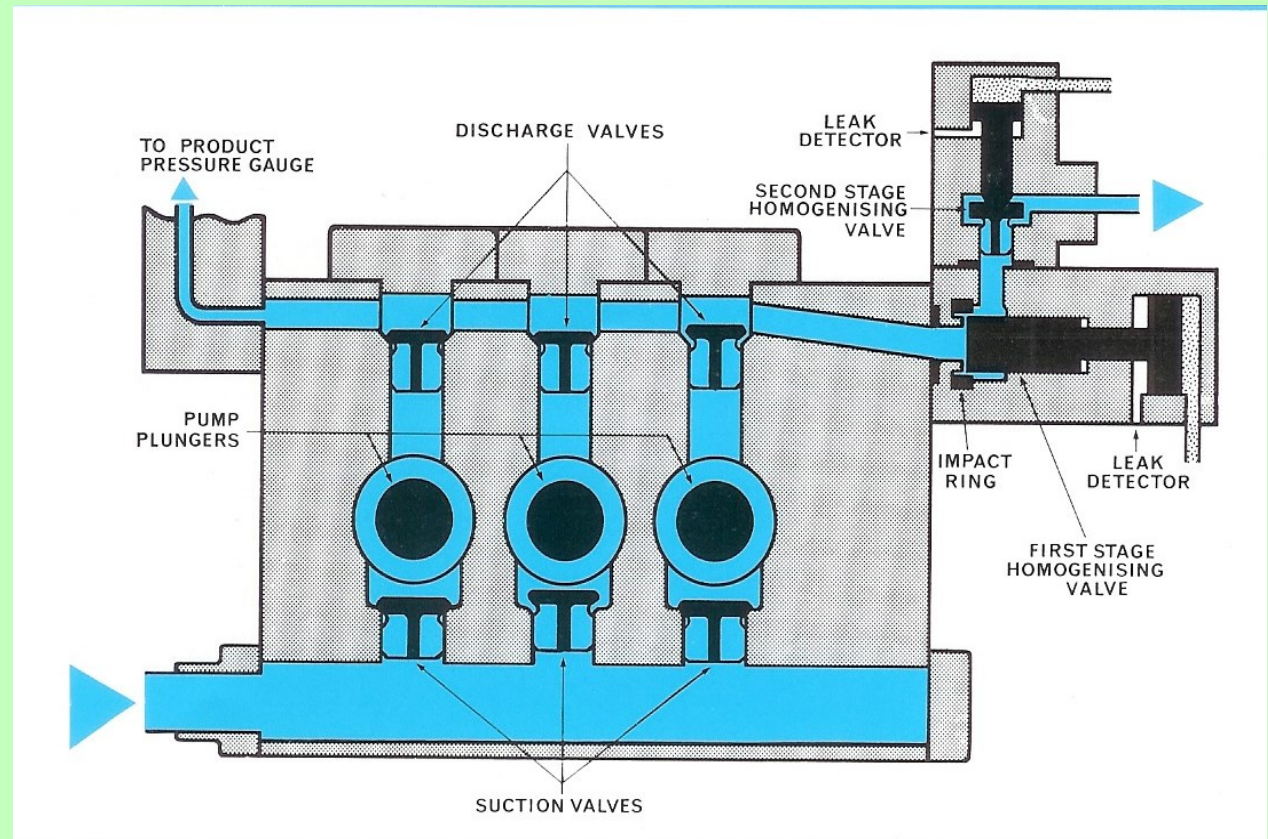
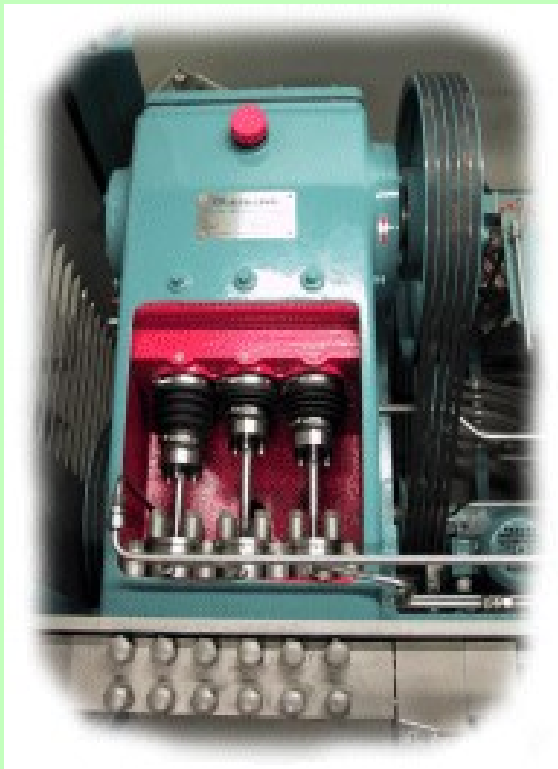


NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Milyen szivattyú képes ilyen nyomást létrehozni?

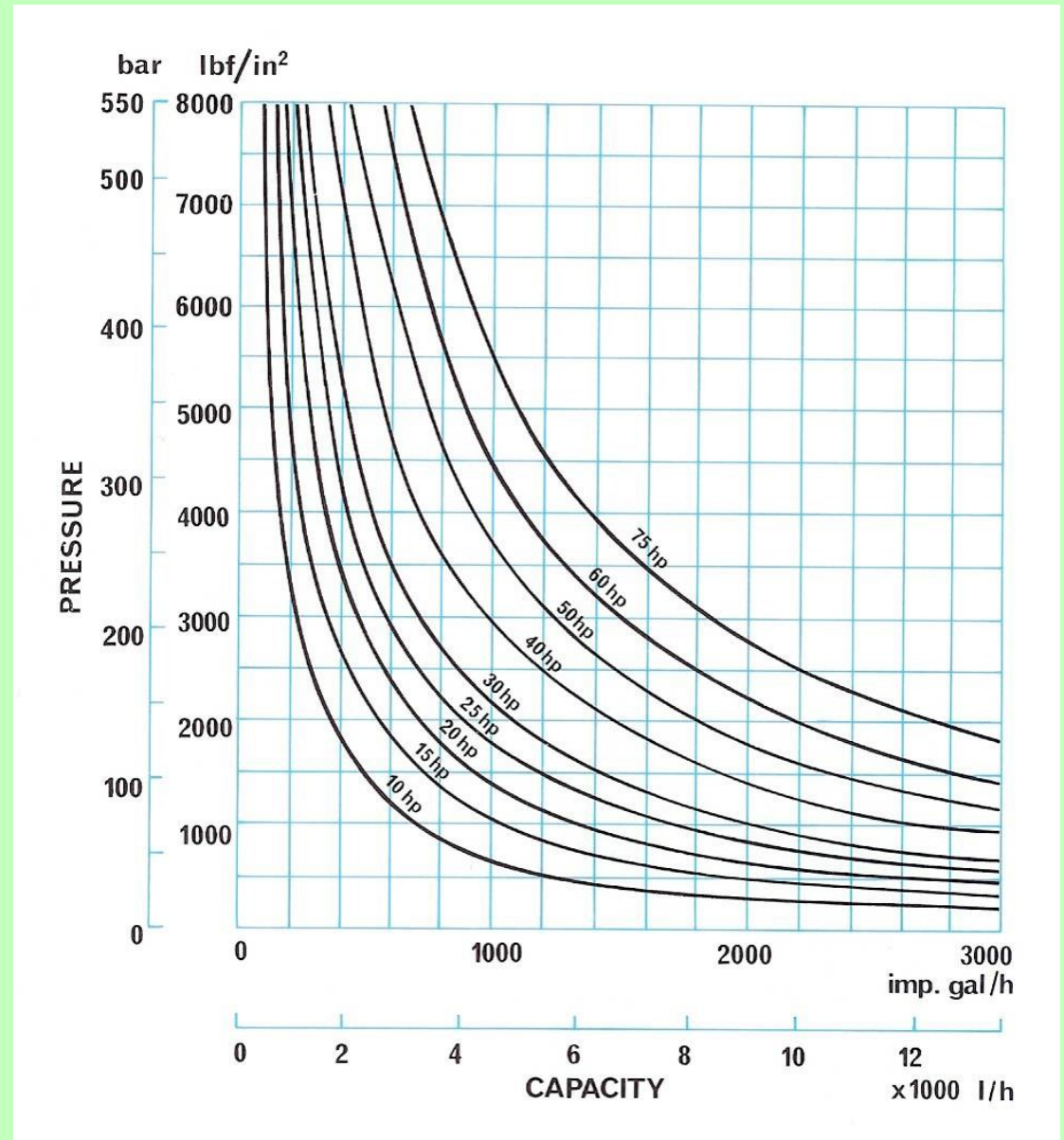
Csak a dugattyús.

Az egyenletesebb működés érdekében 3 dugattyú dolgozik, fáziseltolással



NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

A homogenizátor működési jelleggörbéje lényegében azonos a szivattyúéval.

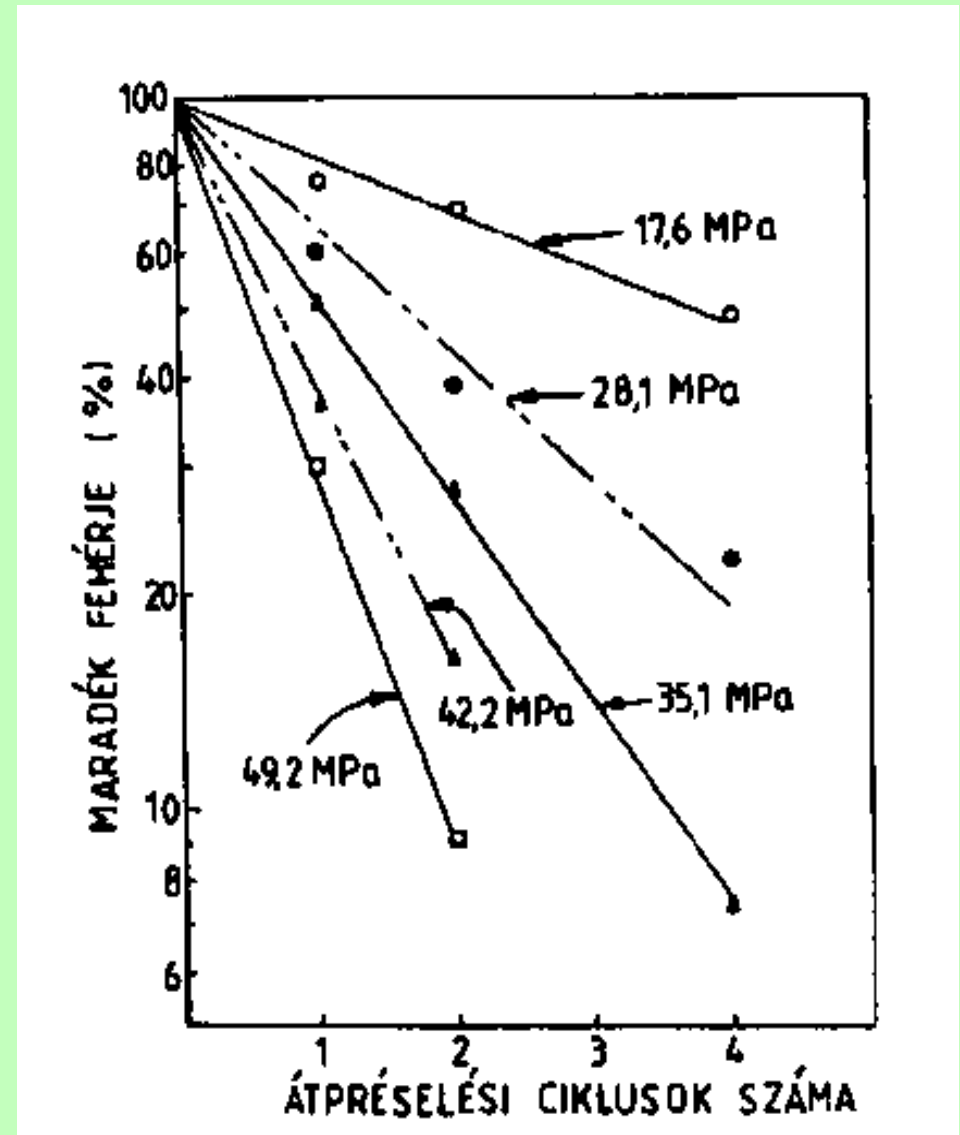


NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

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



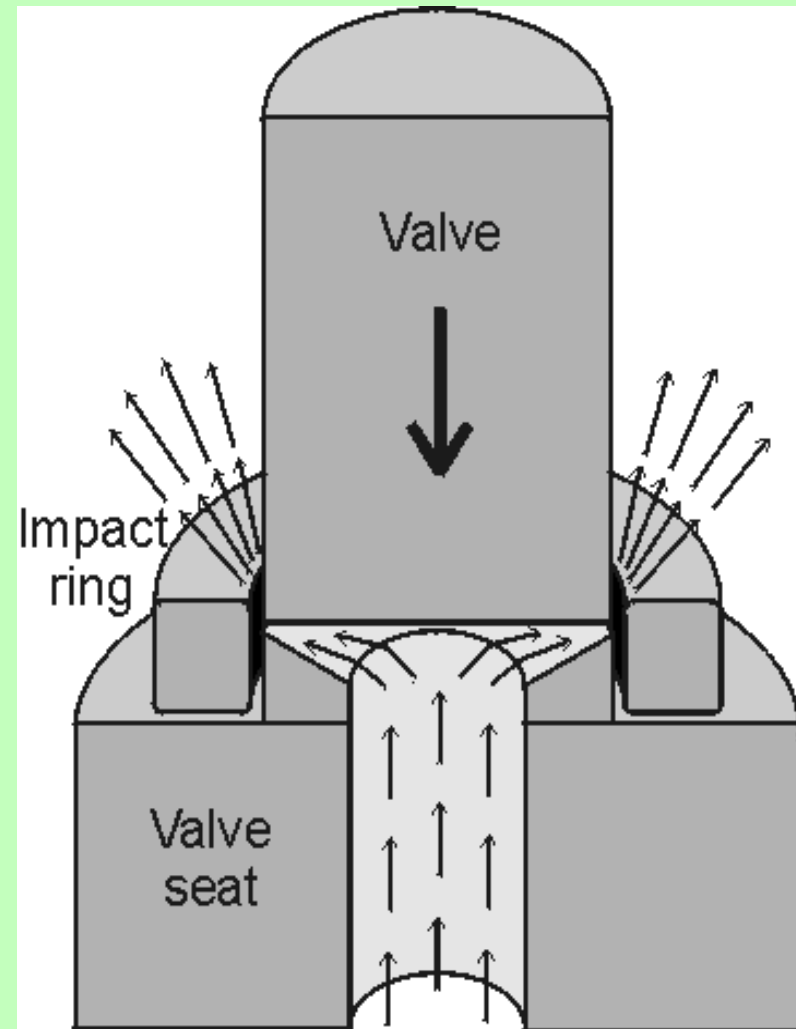
NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Előnyök:

- Folytonosítható
- Léptéknövelhető

Hátrányok:

- Nagy energiafogyasztás
- masszív szerkezet
- eltömődésveszély

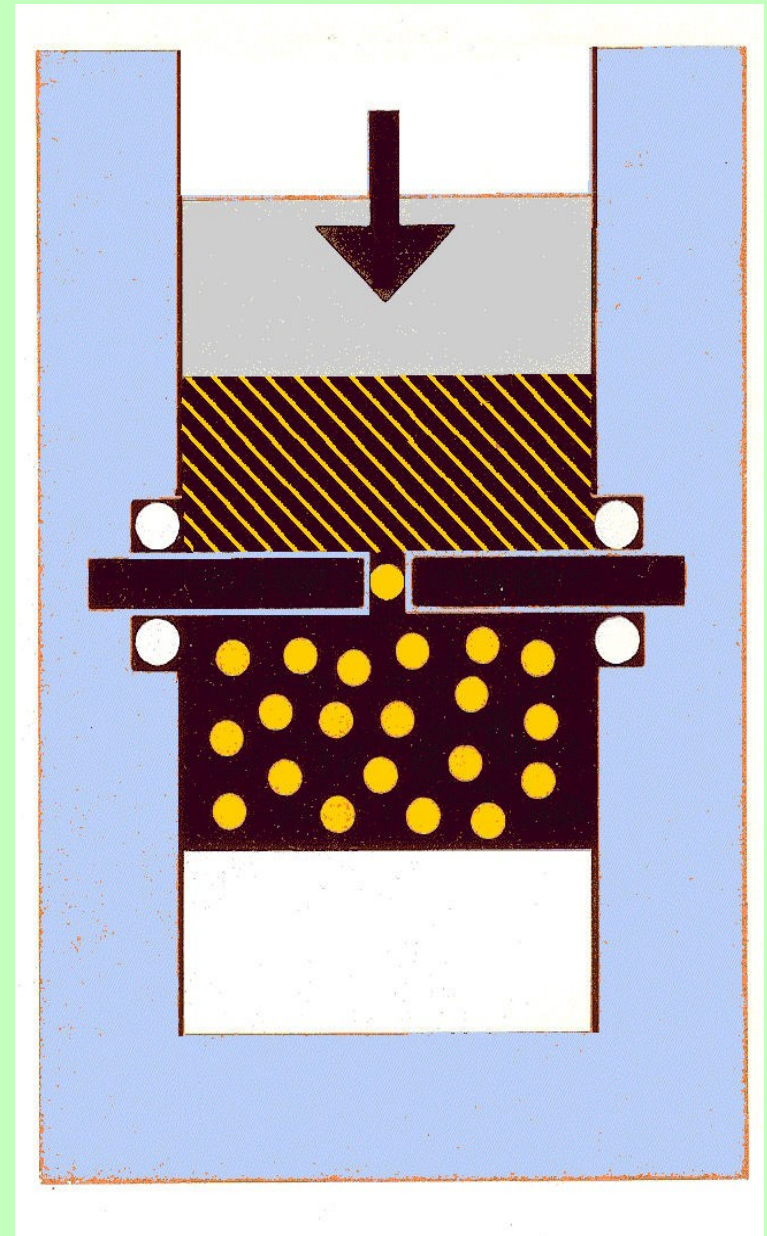


X-PRESS

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:

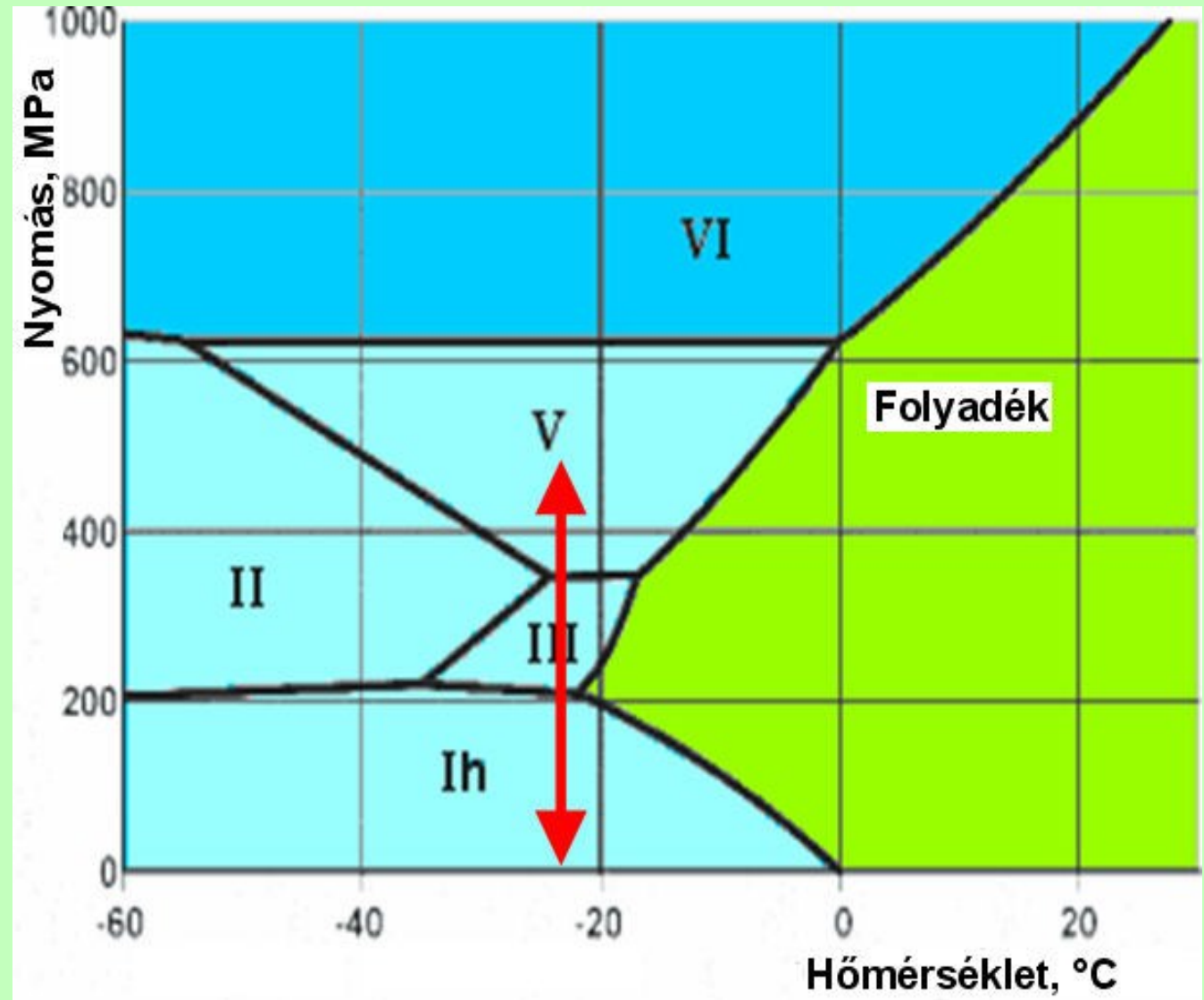
Jég-1 → 0,92

tf csökkenés: -19%

Jég-3 → 1,14

tf csökkenés: -7%

Jég-5 → 1,23



X-PRESS

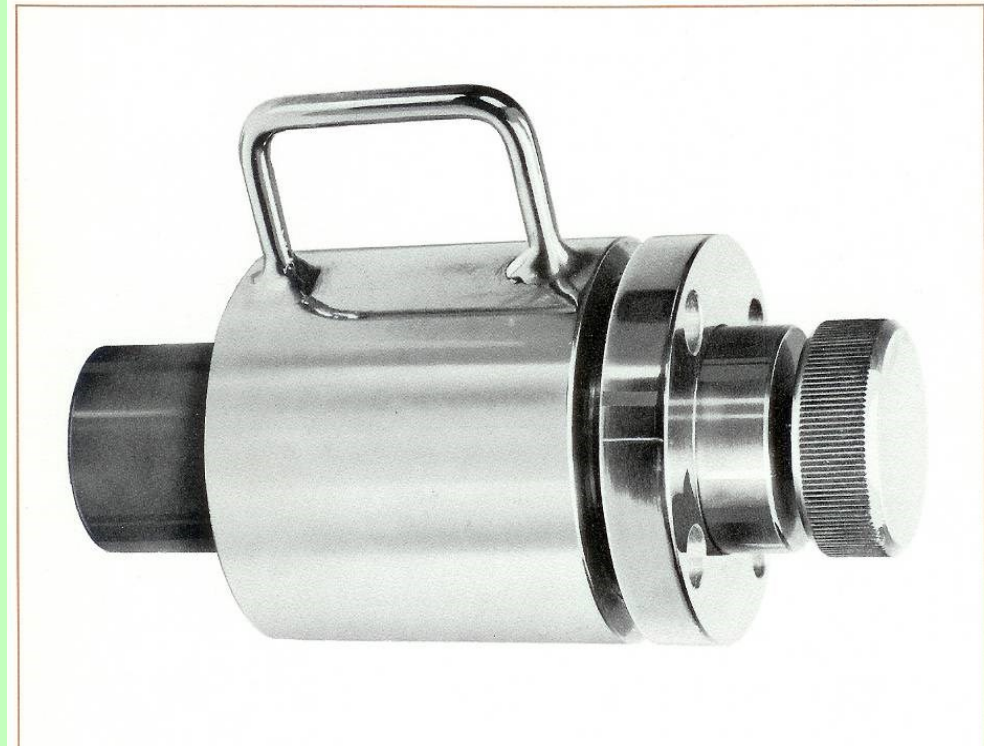
Előnyök:

- 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 (liofilezés) (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

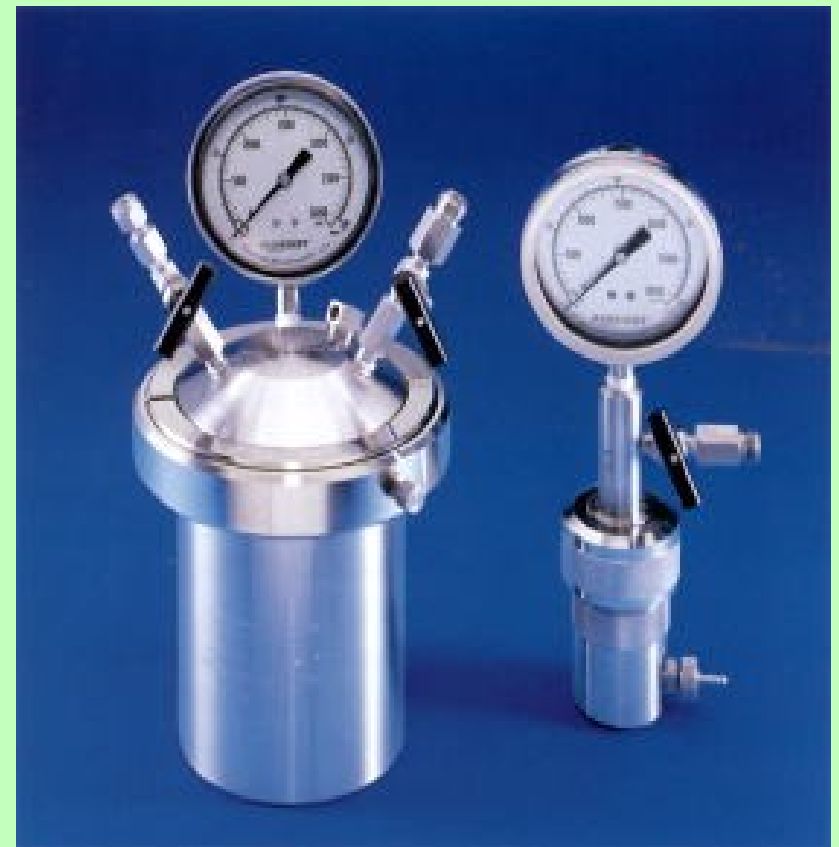
Dekompresszió

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

