



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Írta:

PÉCS MIKLÓS

Lektorálta:

BÉLAFINÉ BAKÓ KATALIN

FERMENTÁCIÓS FELDOLGOZÁSI MŰVELETEK

Egyetemi tananyag

2011



COPYRIGHT: © 2011-2016, Dr. Pécs Miklós, BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

LEKTORÁLTA: Bélafiné Dr. Bakó Katalin, Pannon Egyetem

Creative Commons NonCommercial-NoDerivs 3.0 (CC BY-NC-ND 3.0)
A szerző nevének feltüntetése mellett nem kereskedelmi céllal szabadon
másolható, terjeszthető, megjelentethető és előadható, de nem módosítható.

TÁMOGATÁS:

Készült a TÁMOP-4.1.2-08/2/A/KMR-2009-0028 számú, „Multidiszciplináris, modulrendszerű, digitális tananyagfejlesztés a vegyészmérnöki, biomérnöki és vegyész alapképzésben” című projekt keretében.



KÉSZÜLT: a [Typotex Kiadó](#) gondozásában

FELELŐS VEZETŐ: Votisky Zsuzsa

AZ ELEKTRONIKUS KIADÁST ELŐKÉSZÍTETTE: Waizinger József

ISBN 978-963-279-472-3

KULCSSZAVAK:

fermentációs termékek, feldolgozás, downstream processing, elválasztási műveletek, biomérnöki technológia, sejtfeltárás, membránműveletek, affin-műveletek, porlasztva szárítás.

ÖSSZEFOGLALÁS:

Az egyes biotechnológiai termékek bioszintézisének megvalósításán túl komoly technológiai feladatot jelent ezen anyagok kinyerése és tisztítása. A rendkívül összetett biológiai rendszerekből egyetlen komponens kinyerése csak többlépcsős, optimált műveletsorozattal valósítható meg. A feldolgozási kérdések fontosságát jelzi az a tendencia, hogy a legmodernebb termékek, a rekombináns fehérjék előállításának költségeiben a termék izolálása és tisztítása eléri a 80-90%-ot is.

Az összeállított tananyag felépítésében a feldolgozási folyamat logikájára épül. Előbb a sejtek elválasztásának műveleteit (szűrés, centrifugálás), és a sejtfeltárást tárgyalja, majd a koncentráció műveletek (extrakció, adszorpció, membránműveletek, csapadékképzés) következnek. Ezt követik a tisztítás és végtisztítás műveletei, mint a kristályosítás és a szárítás. A sort olyan finomkémiai műveletek zárják, amelyek csak laboratóriumi, vagy preparatív léptékben alkalmazhatók (affin-műveletek, elektroforézisek, fókuszálások).

Az anyag szintéziseként végül műveletsorok, technológiák kerülnek bemutatásra, így a zárványtestek (inclusion body) feldolgozása, a citromsav és a monoklonális antitestek (Mab) feldolgozási technológiája.

TARTALOM

1.	BEVEZETÉS.....	5
2.	A SEJTEK ELVÁLASZTÁSA	10
2.1.	Szűrés	10
2.2.	Centrifugálás	30
2.3.	Számítási feladatok	41
2.4.	Ajánlott irodalom	46
3.	SEJTFELTÁRÁS	47
3.1.	Bevezetés	47
3.2.	A sejtfalak összetétele és szerkezete	48
3.3.	A feltárás vizsgálata	53
3.4.	Mechanikai módszerek	56
3.5.	Nem-mechanikai módszerek.....	73
3.6.	Összefoglalás	77
3.7.	Ajánlott irodalom	78
4.	KONCENTRÁLÓ MŰVELETEK.....	80
	Bevezetés	80
4.1.	Extrakció	80
4.2.	Adszorpció	92
4.3.	Membránműveletek	104
4.4.	Kicsapás, kristályosítás	144
5.	A VÉGTISZTÍTÁS MŰVELETEI.....	166
5.1.	Affintechnikák	166
5.2.	Elektroforézis-technikák	183
5.3.	Porlasztva szárítás	200
6.	ZÁRVÁNYTESTEK FELDOLGOZÁSA	212
6.1.	A zárványtestek.....	212
7.	ESETTANULMÁNY-1: CITROMSAV GYÁRTÁSA	219
7.1.	A citromsav	219
7.2.	A citromsav gyártása.....	219
7.3.	Fejlesztési irányok.....	222
8.	ESETTANULMÁNY-2: MONOKLONÁLIS ANTITESTEK GYÁRTÁSA	223
8.1.	A monoklonális antitestek (MAB).....	223
8.2.	A monoklonális antitestek gyártása	223
8.3.	Tendenciák a MAB-feldolgozási technológiákban	227

9. SZÓSZEDET.....	228
ÁBRÁK, ANIMÁCIÓK, VIDEÓK, TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....	230
Ábrák.....	230
Animációk.....	235
Videók.....	236
Táblázatok.....	236

1. BEVEZETÉS

A tananyag címe „Fermentációs feldolgozási műveletek”, a biomézőnképés egy fontos területét fedile. Mit jelent ez a cím, és hol helyezkedik el a biomézőni tudomány egészében?

A fermentáció gyűjtőfogalom, olyan biotechnológiai folyamatokat, technológiákat jelent, amelynek során élő sejteket tenyészünk nagy léptékben valamilyen anyag (ez lehet maga a sejtömeg is) termelése vagy lebontása érdekében. A fermentációs technológiák két egymást követő szakaszra oszthatók:

- a fermentáció előkészítésétől a szaporítás, a termékképzés végéig terjed az „**UPSTREAM-PROCESSING**”. Ez magában foglalja az inokulumkészítést, a tápoldatkészítést, a sterilizést, a mikrobaszaporítást, levegőztetést, mindent a fermentáció végéig, amikor már rendelkezésünkre áll a kész fermentlé, amely tartalmazza a kívánt mennyiségű végterméket. Ezt a pontot nevezik a fermentáció „vágásának”. Ezekkel a műveletekkel foglalkozik részletesen a „Biomézőni műveletek és folyamatok” tantárgy és a hozzá készült digitális tananyag.
- a „vágás” után következik a végtermék izolálása, amelynek során a sokkomponensű fermentléből a tiszta (tisztított) végtermék felhasználásra alkalmas formába kerül. Ezt a feldolgozási műveletsort nevezik „**DOWN-STREAM PROCESSING**”-nek, ennek műveleteivel foglalkozik ez a digitális tananyag. Ezek az angol kifejezések nehezen fordíthatók le, a downstream processing magyar megfelelője „fermentlevek feldolgozása” vagy „biotermékek izolálása” lehetne.

Mit jelent az utolsó szó, a művelet? A biológiai iparok technológiái – hasonlóan a vegyipari technológiákhoz – olyan lépések, műveletek soraként foghatók fel, amely lépések a különféle technológiákban hasonlóak, és a konkrét technológiák és anyagok tulajdonságaitól függetlenül, azonos törvényszerűségekkel írhatók le. A művelet kifejezés tehát egy technológiai lépést jelent, ami egy fizikai (fizikai-kémiai) folyamaton alapul (pl. ülepedés, megoszlás, halmazállapot-változás, elválasztás, fázisátmenet), annak törvényszerűségeivel, egyenleteivel írható le.

Az „elválasztás” kifejezést kettős értelemben használjuk. Beleértjük a fázisok szétválasztását, valamint a komponensek (anyagok, molekulák) szétválasztását. Az anyagkomponensek szétválasztása a molekulák eltérő fizikai tulajdonságain (méret, töltés, polaritás/oldhatóság, forráspont) alapul. Minél nagyobb a különbség egy paraméterben a két anyag között, annál könnyebben választhatók szét. Megfordítva ugyanezt a gondolatot, az elválasztás megtervezéséhez keressük meg az anyagoknak azt a jellemzőjét, amelyben a legnagyobb az eltérés, és eszerint válasszunk műveletet.

A „Fermentációs feldolgozási műveletek” tehát a downstream processing műveleteit tárgyalja egyenként. Ezzel megalapozza a „Biotermék technológia” tárgyat, ahol a legfontosabb bioipari termékek gyártástechnológiáját tárgyaljuk, ahol a tanult műveletek már műveletsorrá, technológiává integrálódnak.

Első lépésként vizsgáljuk meg, milyen közös, illetve eltérő jellemzőket találunk a down-stream technológiákban. A fermentlevek közös tulajdonságai:

- a termék vizes közegben van (nem szerves oldószerben)
- a termék koncentrációja viszonylag kicsi (csak néhány technológiánál éri el a 10 százalékot, de sokszor csak néhány g/liter)
- többfázisú rendszer (a vizes fázisban diszpergálva ott vannak a sejtek, és egyéb lehetséges szemcsék, olajcseppek maradhatnak a habgátló olaj adagolásából vagy kőolaj alapú szénforrásból. A levegőztetés során buborékokat is juttatunk a fermentlébe, de ezek a feldolgozásig eltávoznak.)

- sokkomponensű a rendszer, bonyolult a mátrix, amiből a terméke(ke)t el kell különíteni. Már a tápoldatban biológiai eredetű komplex anyagokat (melasz, kukoricalekvár, szójadara stb.) alkalmaznak, ezekből a sejtek anyagcsereútjai több száz intermediert és végterméket állítanak elő. A technológiák célja, hogy a főtermék mennyiségével kiemelkedjen ebből a háttérből, de a zavaró komponensek nagy száma és változatos tulajdonságai sokszor gondot okoznak.

A feldolgozó üzemek igen sokfélék, mert:

- szélsőségesek a léptékek. Vannak nagy léptékben gyártott termékek (pl. citromsav, glutaminsav: több százezer tonna/év) és kis mennyiségben előállított anyagok (pl. emberi növekedési hormon, tumor nekrozis faktor, urokináz: a világpiac egy-két kg/év)
- sokféle elválasztási műveletet használnak. Míg például a petrokkémiában szinte csak desztillálnak; a szintetikus (gyógyszer és intermedier) vegyiparban a bepárlás, kristályosítás, szűrés hármasa jellemző; a biológiai termékek kinyerése során viszont tucatnyi különféle művelet, ezen belül szakaszos és folytonos, egyensúlyi és kinetikai, állandósult és tranzien elvű egyaránt előfordul.

A fermentlé feldolgozására nehéz általános sémát adni, mivel minden technológia más és más. A műveletsorozaton belül azonban funkcionálisan elkülöníthetők bizonyos szakaszok. Ezek sorrendje legtöbbször azonos, néhány esetben egy-egy lépcső kimaradhat.

- 1. SZILÁRD-FOLYADÉK ELVÁLASZTÁS:** a fermentlé folyadékfázisától különítik el a sejttömeget, és/vagy a táptalaj szilárd szemcséit, esetleg a kikristályosodott terméket.

Jellemző műveletek:

- szűrés/mikroszűrés
- ülepités/centrifugálás.

(1/b) (SEJTFELTÁRÁS) Erre a műveletre csak akkor van szükség, ha a kinyerni kívánt anyag a sejteken belül található (intracelluláris). Ekkor a sejtek falát és membránját el kell roncsolni ahhoz, hogy a termék molekulák kiszabaduljanak, homogén vizes fázisba kerüljenek.

- 2. IZOLÁLÁS/KONCENTRÁLÁS:** a legnagyobb mennyiségű idegen anyagokat, azaz elsősorban a vizet távolítják el, általában fázisváltással.

Jellemző műveletek:

- Extrakció (a termék átvitele szerves oldószer fázisba, a vizes fázis elválasztása)
- Adszorpció (a termék átvitele felületi kötött fázisba, elválasztás a vizes fázistól)
- Csapadékképzés (a termék átvitele szilárd fázisba, elválasztás a vizes fázistól)
- Membránszűrés (molekulaméret szerinti elválasztás)

(a biológiai iparban ritkábban alkalmazott víztelenítő műveletek: bepárlás, desztilláció).

- 3. TISZTÍTÁS:** a termék és a szennyező anyagok elválasztása

Jellemző műveletek:

- a fentiek bármelyike
- (ipari) kromatográfia (folyadék-kromatográfias elválasztást nemcsak analitikai léptékben/célből lehet alkalmazni, hanem ipari léptékben is, pl. aminoglikozid antibiotikumok elválasztása, glükóz-fruktóz elválasztás).

- 4. VÉGTISZTÍTÁS:** a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő tisztaságig tisztítják.

Jellemző műveletek:

- a fentiek bármelyike

- kristályosítás (a csapadékképzéstől eltérően a kristályosítás nagymértékű tisztítással jár együtt, az egykristály gyakorlatilag egykomponensű anyag, amely csak a felületén, illetve zárványaiban tartalmaz szennyezéseket)
- szárítás (minden termékspecifikáció a nedvességtartalom megadásával kezdődik, ennek beállítása a szárítással történik)

A tisztítás és végtisztítás első pillantásra nagyon hasonlóknak tűnnek, nem is éles köztük a választóvonal. A két szakasz szemléletében tér el egymástól. A tisztítás során a termék maximális kihozatalára törekednek, miközben a szennyezések mennyiségét csökkentik (mérnöki-műszaki szemlélet). A végtisztításnál viszont az előírt tisztaság elérése a cél, még azon az áron is, hogy esetleg a kívánt termék egy része elvesz, vagy visszakerül a feldolgozás egy korábbi lépcsőjére. A végtisztításnál a felhasználási célnak megfelelő tisztaságot kell elérni, amit általában előírások (gyógyszerkönyvek, szabványok, élelmiszer-minőségi előírások) fogalmazznak meg, és a piac az ezeknek megfelelő tisztaságú terméket fizeti meg (piaci-közgazdasági szemlélet). Ugyanazt a terméket különböző mértékben megtisztítva különböző célokra lehet eladni, általában minél tisztább, annál magasabb áron. A tisztaság-ár lépcsős függvény, amiből az is következik, hogy nem érdemes a terméket „túltisztítani”, mert az alaposabb tisztítás többletköltségeit a piac nem fizeti meg.

A tisztasági igényeket sorba állítva fő vonalakban a következő csökkenő sorrend állítható fel:

- Humán injekciós készítmény, nagy terápiás dóziszú (a készítmény egyenesen a véráramba/ sejt közötti folyadékba kerül – nem tartalmazhat semmilyen testidegen komponenst).
- Humán injekciós készítmény, kis dóziszú (a kisebb összesített terápiás dózis kisebb bevitt térfogatot jelent, ezáltal a bevitt minor komponensek mennyisége kisebb).
- Humán enterális gyógyszerek (a szájon át szedett gyógyszerek tisztasági szintje valamivel több szennyezést enged meg, mert az emésztőcsatornából nem minden komponens szívódik fel, és a felszívódó anyagok is a máj méregtelenítő rendszerén áthaladva jutnak el a szervezet egészébe).
- Állatorvosi gyógyszerek (az emberi és állatorvosi készítmények tisztasági követelményei közti különbség egyre csökken, de a gazdasági szempontok – a kevésbé tiszta hatóanyag olcsóbb – jobban érvényesülnek)
- Élelmiszerek, élelmiszer-adalékok (az élelmiszerekre vonatkozó szabályozás más jellegű, mint a gyógyszereké, másra irányul – pl. az élelmiszereket nem vizsgálják pirogénekre, de előírják a növényvédőszer-maradékok és az aflatoxinok szintjét).
- Külsődleges alkalmazású gyógyszerek (a kenőcsök, szemcseppek, fülcseppek anyagai nem jutnak be a szervezet egészébe – lokális, topikális készítmények – az esetleges szennyezések veszélyessége kisebb).
- Kozmetikumok (ezek is a test felületére kerülő készítmények, az előírások is hasonlóak. A szabályozás különbséget tesz a „bőrön maradó” és a „le mosandó” készítmények között. A rövid kontaktidejű készítményekben a megengedett koncentrációk magasabbak).
- Technikai minőségű anyagok (más gyártások alapanyagául szolgálnak, előírt tisztaságuk a vevő igényeitől függ).

A továbbiakban a fenti négylépcsős séma szerint vesszük sorra az elválasztási műveleteket.

A feldolgozási technológia kidolgozása során nem az egyes műveletek, hanem az egész technológiai sor gazdasági optimumát kell keresni. A mérnöki szemlélet hajlamos az egyes lépéseket valamilyen műszaki paraméter (hatásfok, kihozatal, koncentráció) szerint optimalálni, ez általában nem esik egybe az egész műveletsor optimumával.

A teljes optimalás viszont munkaigényes, mert:

- minden egyes paraméter megváltoztatásánál az egész lépéssor költségét kell vizsgálni
- léptéknövelésnél az optimalási iterálást előlről kell kezdeni.

Szerencsére már hozzáférhetőek olyan számítógépes (flowsheeting) programok, amelyek alkalmasak a teljes folyamat számítására és újraszámolására.

A laboratóriumi folyamatok ipari léptékre való átvitelében (scale up: léptéknövelés) gyakori az a hiba, hogy a laboratóriumi lépéseket és készülékeket próbálják felnagyítani. A helyes eljárás eleve az ipari léptékű eljárás kidolgozása. Célszerű megbecsülni a maximális piaci üzemenagyságot, ehhez tervezni a lépéssort, a műveleteket és berendezéseket, és ehhez kell elvégezni a kis léptékű kísérleteket (scale down: léptékcsökkentés). Új, kiforratlan technológiák bevezetésénél gyakori eljárás az, hogy a tervezett nagy, pl. százezer tonna/év kapacitású üzem megépítése előtt megépítenek egy mindenben hasonló, de jóval kisebb (a végleges üzemenagyság 1–2%-a, pl. 1–2000 tonna/év) pilot/modell üzemet, és ennek fél–egy éves próbaüzeméből nyert adatok/tapasztalatok alapján tervezik újra és építik meg a termelő üzemet.

A tervezéshez célszerű minél több fizikai, kémiai és termodinamikai adatot begyűjteni.

Egy új technológia megtervezésénél többféle gondolatmenetet követhetünk:

- a. Másolás – hasonló anyaghoz hasonló technológia. Gyökeresen új problémákat így nem lehet megoldani
- b. Heurisztikus – nem merev szabályok, hanem tapasztalati ajánlások, alapelvek. A tervezés kezdeti, induló döntésinél segítenek, nem a finomításban. Inkább kizár, mint állít. A tipikust írja le, nem az egyedit.
- c. Szakértői rendszerek – számítógépes programban feldolgozott tapasztalat, IF – THAN döntések sorozatával közelíti a megoldást. Nem zárt algoritmus, sok a kvalitatív ítélet. Megfelelő programozással olyan esetre is helyes tanácsot ad, amire nincs bevitt tapasztalat.
- d. Matematikai modell – sok paraméter és összefüggés szerepel benne, emiatt bonyolult. Olyan sok mért adat kell hozzá, hogy mire az összegyűlik, addigra rendszerint az optimum a modell nélkül is adódik.

A gyakorlatban ezek kombinációját alkalmazzák. Másolnak, ha lehet, emellett az általános sémából indulnak ki, és annak elemeit variálják.

A felsorolásban szó esett a heurisztikus tervezési elvekről. Ezek közül röviden bemutatunk néhányat, amely hasznos lehet a feldolgozási műveletsor kialakításánál.

Tervezési elvek:

- Kis felbontású lépés előre, nagy felbontású hátra a műveletsorban (a nagyon eltérő tulajdonságú anyagok elválasztására a kis felbontás is megfelelő, a hasonló szennyezések elkülönítésére viszont nagy felbontású művelet szükséges).
- Az olcsóbb elválasztást vedd előre, a költségesebbet hátra (a feldolgozandó anyagmennyiség a folyamat során csökken, a költséges művelettel kisebb mennyiséget kell feldolgozni).
- A kívánt terméket válaszd el utoljára (törekedjünk a termék minél nagyobb mértékű továbbvitelére a szennyezések leválasztása során).
- A nagy kihozatalú lépést tedd hátra (a sok művelettel, sok költséggel már megtisztított anyagból minél kevesebbet veszítünk).

Műveletválasztási elvek:

- kerülj a vákuumot és a hűtést (költségesebb)
- inkább atmoszférikus desztilláció, mint vákuum (költségesebb)

- inkább membránszűrés, mint centrifugálás (költséges)
- először a nagy tömegű anyagot válaszd el (pl. vizet = a koncentráció előzze meg a tisztítást).

Anyagi tulajdonságok szerint:

- keresd a legnagyobb különbséget a termék és a szennyezések tulajdonságai között, és ennek alapján válaszd el (így lehet hatékony az elválasztás)
- egymást követő lépéseknél különböző elveket használj (nem célszerű azonos elven – méretkülönbség, töltéskülönbség stb. – alapuló műveleteket ismételni)
- a veszélyes és korrozív anyagokat minél hamarabb tüntesd el (az ilyen anyagokkal való munka költséges, minél hamarabb ártalmatlanítják ezeket, annál olcsóbb a technológia).

Összetételi elvek:

- vizsgáld a végtermék összetételét gazdaságilag (a „túltisztítást” a piac nem fizeti meg, csak annyira érdemes tisztítani, hogy éppen megfeleljen a követelményeknek)
- több termék esetén a legnagyobb tömegűt válaszd el először (ez esetben a tovább menő anyagáram kisebb, kevesebb anyagból kell kinyerni a minor komponenseket).

A feldolgozási műveletsor egységes tárgyalása után térjünk át az egyes műveletek részletes leírására.

2. A SEJTEK ELVÁLASZTÁSA

A fermentlevek feldolgozásának jellemzően első lépése a sejtek elválasztása a létől. Pontosabban megfogalmazva egy szilárd-folyadék fázis-szétválasztási lépés, mivel a sejteken kívül más lebegő szilárd részecskék (táptalaj maradványok, CaCO_3 , termék-kristályok) is lehetnek a fermentlében. A szilárd szemcsék leválasztására a szűrés és a centrifugálás művelete alkalmazható.

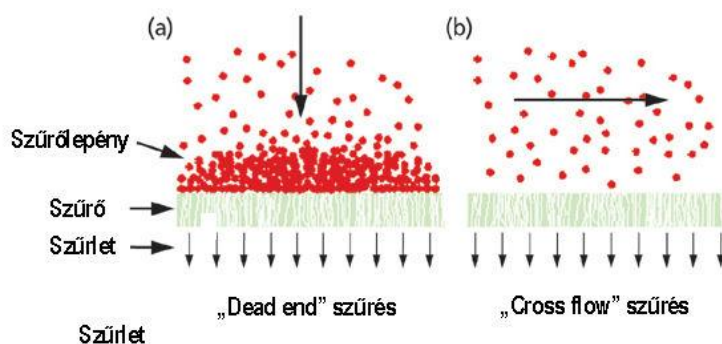
2.1. Szűrés

A szűrés során a folyadékot lyukacsos szilárd anyagon vagy szűrőanyag rétegen nyomatják át. A lebegő szilárd részecskék részben vagy teljesen visszamaradnak a szűrőn. Ez egyszerű és jól kezelhető vegyipari művelet jól definiált méretű és alakú kristályok esetében. A kicsi és képlékeny sejtek jelenléte azonban megnehezíti a fermentlevek vagy más biológiai oldatok szűrését. A klasszikus szakaszos szűrési módszerek alkalmazásával a művelet legtöbbször túlságosan lassú lenne az ipari léptékű technológiákban.

A biológiai anyagok szűrése tehát eltérő megközelítést igényel, ennek megfelelően épül fel a fejezet gondolatmenete. A Vegyipari műveletek tantárgyban alaposan tárgyalt alapfogalmak és összefüggések érintése után tárgyaljuk ezek speciális alkalmazásait a biológiai anyagok elválasztásaira. Az eltéréseket elsősorban a szűrőn összegyűlő sejt-tömeg tulajdonságai okozzák. A biomasza legtöbbször nyálkás, ragacsos réteget képez a szűrőn, amely nagyon hamar összetömörödik, és nem engedi át a szűrletet. Az ilyen rendszereket legtöbbször csak szűrősegédanyagok (szemcsés, inert, merev, porózus anyagok, amelyek jól átengedik folyadékot) hozzákeverésével lehet elválasztani.

2.1.1. Alapfogalmak

A szűrőlepleny által okozott problémák másik kiküszöbölési módja az ún. keresztáramú (cross flow), vagy tangenciális szűrés. Ennél a szűrőfelületen létrehozott erőteljes turbulens áramlás akadályozza a szilárd részecskék lerakódását. Ez a megoldás szilárd szűrőlepleny helyett betöményített szuszpenzió elvételével jár. Míg a hagyományos (dead end) szűrésnél egy folyadékfázist (szűrlet) és egy többékevésbé szilárd fázist (szűrőlepleny) kapunk szakaszos műveletben, a keresztáramú szűrésnél két folyadékfázis lép ki a szűrőanyag (membrán) két oldaláról folyamatosan.



2.1.1.1. ábra: A „dead end” és „cross flow” szűrés elve

Az egyik a szűrőn átlépő tisztított folyadék (szűrlet, permeát), a másik a visszamaradt folyadék, amely értelemszerűen gazdagabb a szűrő által visszatartott anyagokban (koncentrátum, retentát). A keresztáram általános elv, többféle műveletnél is alkalmazzák. A kolloid szilárd részecskék (sejtek) elválasztásánál mikroszűrésnek nevezik, oldott anyagok membrános szétválasztásánál pedig az ultraszűrés és a reverz ozmózis műveleténél alkalmazzák (ld. később a membránműveleteknél). A keresztáram kifejezés onnan származik, hogy a szűrletáram és a kényszeráram egymásra merőlegesen, „keresztben” mozognak. A „tangenciális” jelző pedig érintőlegesen jelent, arra utal, hogy a kényszeráram a szűrő felületéhez képest érintőlegesen mozog.

Ezekhez kapcsolódik egy további fogalompár is, a mélyégi és a felületi szűrés. A mélyégi szűrés a „dead end” szűrés egy más megközelítése. A mélyégi jelző arra utal, hogy a szűrés egy vastag töltetként történik. Ez a porózus anyag lehet maga a lerakódott szűrőlepleny, de lehet valamilyen inert szűrősegédanyagból felvitt réteg is. A töltet pórusai nem egységesek és állandó méretűek, az áramló folyadék kacskaringós úton és változó sebességgel halad. A lebegő szemcsék elválasztása nem a szűk csatornák méretkizárása miatt történik, hanem a mozgó szilárd részecskék a tágabb csatornában is elakadnak bizonyos valószínűséggel. Ezért nevezik ezt az elvet valószínűségi szűrésnek, mert mindig van számítható valószínűsége annak, hogy egy részecske átjut a szűrőrétegen. A folyamatot elsőrendű kinetikával írhatjuk le, az átjutó részecskék száma/az átjutás valószínűsége a réteg vastagságával exponenciálisan csökken. Definiálni szokták az L_{90} értéket, ez az a rétegvastagság, ami a szemcsék 90 %-át leválasztja. Ennek kétszerese 99 %-ot, háromszorosa 99,9 %-ot tart vissza. Tökéletes szűréshez eszerint végtelen szűrővastagság tartozna. A felületi szűrésnél a visszatartást egy jól definiált pórusokkal rendelkező membrán végzi. A pórusok átmérőjénél nagyobb részecskék nem hatolnak be a szűrő anyagába, a folyadékban maradnak. A membrán felületén nem rakódhat le szűrőlepleny, mert az már mélyégi szűrést végezne - itt kapcsolódik a keresztáramú szűréshez, ahol a kényszeráramlás tisztán tartja a membrán felületét. A valószínűségi szűréssel szemben ezt a műveletet abszolút szűrésnek nevezzük, a visszatartást a membrán pórusainak átmérője határozza meg.

Az iparban a klasszikus, szűrővászonnal, szűrőlappal végrehajtott szűrések a két elvet egyesítik. A szűrés elején, amíg nem alakul ki a szűrőlepleny, felületi szűrésként működik. Csak a legnagyobb részecskéket tartja vissza, a szűrlet zavaros. A szűrőlepleny kialakulásával viszont már mélyégi szűrésként működik, sokkal hatékonyabbá válik, a szűrlet kitisztul. A technológiai előiratokban gyakran szerepel az a kitétel, hogy a szűrlet első 5-10 százalékát külön kell felfogni, és a szűrőlepleny kialakulása után újra le kell szűrni.

2.1.1.1. táblázat: A szűréseket jellemző fogalompárok

Hagyományos, „dead end” szűrés	Keresztáramú, „cross flow”, tangenciális szűrés
Mélyégi szűrés	Felületi szűrés
Valószínűségi szűrés	Abszolút szűrés

2.1.2. A szűrés általános leírása

A szűrés műveletének matematikai leírását a Vegyipari műveletek tárgy alaposan tárgyalja, itt csak egy rövid felfrissítésre van szükség. Az általános egyenleteket ezután kiterjesztjük összenyomható szűrőleplenyre is. A berendezések működésének leírását csak a vákuum dobszűrőre, mint a legáltalánosabban használt ipari léptékű berendezésre vizsgáljuk.

D’Arcy törvénye

A D’Arcy egyenlet szerint az áramlási sebesség egy porózus szilárd ágyon keresztül arányos a nyomáseséssel.

$$v = \frac{k \cdot \Delta p}{\mu \cdot l}$$

Ahol v a folyadék sebessége, k az anyagfüggő tényező, amit az ágy átjárhatóságának (permeabilitás) is neveznek, Δp a nyomásesés az ágy teljes l vastagságán, és μ a folyadék viszkozitása. Ez az összefüggés analóg az Ohm törvénnyel, az áramlás itt is egyenesen arányos a potenciálkülönbséggel (Δp), és fordítottan az ellenállással ($l/k =$ a vezető hossza / fajlagos vezetőképesség). Szigorúan vizsgálva a D’Arcy törvény csak akkor érvényes, ha a

$$\frac{d \cdot v \cdot \rho}{\mu \cdot (1 - \varepsilon)} < 5$$

feltétel teljesül. Az összefüggésben d a részecske mérete a szűrőrétegben (gyakran helyettesítik a pórusmérettel vagy az egyenértékű pórusátmérővel), ρ a folyadék sűrűsége és ε a szűrőréteg hézagter-

fogata. A biológiai elválasztásoknál a fenti dimenziómentes mennyiség (Reynolds szám) majdnem mindig kielégíti a felírt egyenlőtlenséget.

Szakaszos szűrés esetén a szűrési sebességet felírhatjuk a

$$v = \frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt}$$

formában is, ahol V a szűrlettérfogat, A a szűrőfelület, és t az idő. A szűrési ellenállást (l/k) is felbonthatjuk a szűrőanyag ellenállására (R_M) és a felhalmozódott szűrőlepeny (R_C) ellenállására.

$$l/k = R_M + R_C$$

Az egyenletek kombinálásával felírható az állandó nyomású szűrés alapvető differenciálegyenlete:

$$\frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{\mu \cdot (R_M + R_C)}$$

A szűrőanyag (pl. szűrővászon) ellenállása (R_M) időben állandó, míg a szűrőlepeny ellenállása (R_C) a leszűrt térfogattal növekszik. A növekedés jellege függ attól, hogy a lerakódott szilárd réteg összenyomható-e vagy sem.

2.1.2.1. Összenyomhatatlan szűrőréteg

Ha a szűrőréteg összenyomhatatlan, akkor a kialakuló rétegvastagság egyenesen arányos a szűrlettérfogattal és fordítottan a réteg szűrőfelületével. Ennek megfelelően a kialakuló réteg ellenállása (R_C) leírható az

$$R_C = \alpha \cdot \rho_0 \cdot \left[\frac{V}{A} \right]$$

egyenlettel, ahol α jelenti a szűrőréteg fajlagos ellenállását és ρ_0 a szuszpenzió szilárdanyag tartalmát (kg szilárd anyag / m³ szűrlet). Visszahelyettesítve a differenciálegyenletbe az

$$\frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{\mu \cdot [\alpha \cdot \rho_0 \cdot (V/A) + R_M]}$$

alakot kapjuk. Feltéve, hogy a folyamat kezdetén még nem haladt át anyag a szűrőn, a $t = 0$, $V = 0$ kezdeti feltételekkel integrálható:

$$\frac{At}{V} = K \cdot \left[\frac{V}{A} \right] + B,$$

ahol

$$K = \frac{\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0}{2 \cdot \Delta p}$$

$$B = \frac{\mu \cdot R_M}{\Delta p}.$$

A fentiek szerint az (At/V) mennyiséget (V/A) függvényében ábrázolva lineáris összefüggést kapunk, amelynek meredeksége K , tengelymetszete B . A meredekség a nyomásesés (Δp) és a szűrőlepeny tulajdonságainak függvénye (α és ρ_0). A tengelymetszet független a szűrt anyag jellemzőitől, inkább az „üres” szűrő jellemzőitől függ. A szűrővászon ellenállása gyakran elhanyagolható, ekkor az összefüggés a következő formára egyszerűsödik:

$$t = \left[\frac{\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0}{2 \cdot \Delta p} \right] \cdot \left[\frac{V}{A} \right]^2$$

A felírt összefüggések használhatóságát később számpéldákon vizsgáljuk meg.

2.1.2.2. Összenyomható szűrőréteg

Sajnos a valóságban a biológiai anyagokból kialakuló rétegek majdnem mindig összenyomhatók, ezért rájuk az előbbieken adott egyszerű leírás nem alkalmazható. A szűrőréteg összepréselődéssel a szűrési sebesség csökken, ami a folyamat hatékonyságának romlásával jár.

Az összenyomhatóság hatásának kiszámításához feltételezzük, hogy az α ellenállás a nyomásesés függvénye:

$$\alpha = \alpha' \cdot (\Delta p)^s$$

ahol az α' állandó elsősorban a kiszűrt részecskék alakjától és méretétől függ, az s kitevő pedig a réteg összenyomhatóságától. Merev, összenyomhatatlan szűrőlepleny esetén s értéke közelítően nulla ($\alpha \approx \alpha'$), erősen tömörödő anyagnál pedig tart az 1 értékhez ($\alpha \approx \Delta p \cdot \alpha'$). A gyakorlatban 0.1 és 0.8 közötti s értékekkel számolhatunk. A két konstans, α' és s értékét kísérleti adatokból egyszerűen meg lehet határozni. Felvéve az α értékeket a nyomáskülönbség függvényében kétszer logaritmikus ábrázolásban egyenest kapunk, amelynél meredeksége s , a tengelymetszete pedig $\lg \alpha'$. Nagy s értékeknél mindenképpen érdemes megfontolni szűrősegédanyagok alkalmazását.

A folyamat leírható a korrigált α érték visszahelyettesítésével az integrált egyenletekbe. A B konstans értéke nem változik, míg K függése a Δp -tól bonyolultabbá válik.

2.1.3. Előkezelések

A fermentlevek és más biológiai folyadékok különösen nehéz szűrési problémát jelentenek. Részben a szűrőlepleny már említett kompresszibilitása, részben a folyadék extrém reológiai viselkedése (nagy viszkozitás, nem-Newtoni, általában pszeudoplasztikus jelleg) nehezíti a feladatot, mind a micéliális, mind a bakteriális levek esetében. Sok esetben segít, ha a folyadékot a szűrés előtt előkezelik. Bevált módszerek a hőkezelés, koagulálás és flokulálás, valamint szűrősegédanyagok alkalmazása. Érdemes megjegyezni, hogy az utóbbi kivételével ugyanezek a kezelések hasznosak lehetnek más fáziszétválasztási műveletek (ülepítés, centrifugálás) előtt is.

Hőkezelés

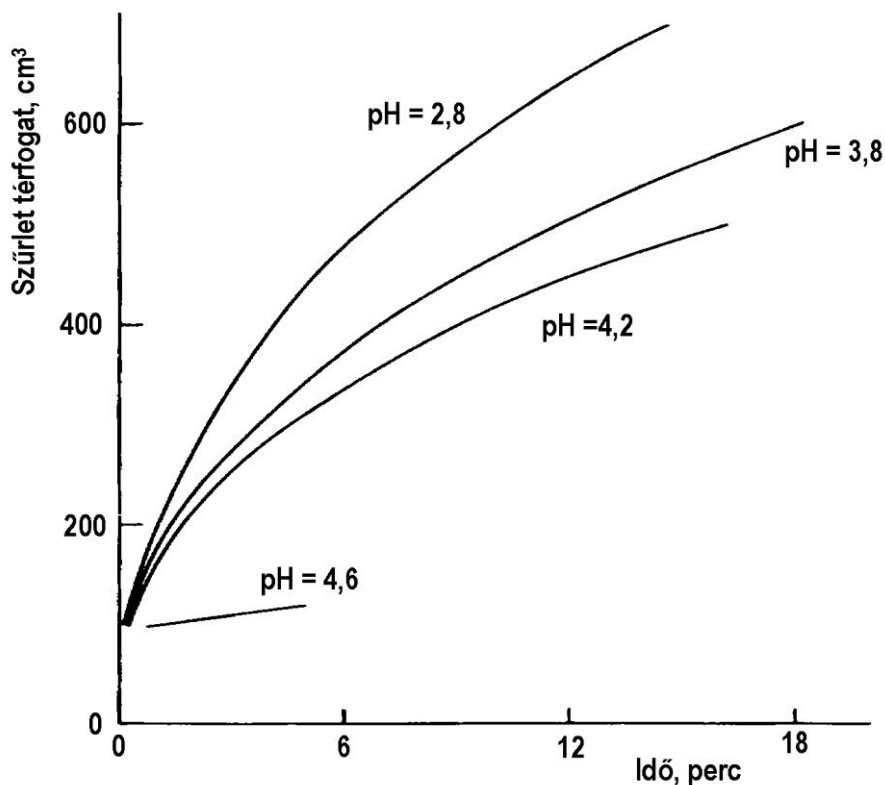
A legegyszerűbb és sokszor a legolcsóbb előkezelés a felmelegítés. Ezáltal nem csak a lé kezelhetőségét javítjuk, hanem a csíraszámot is csökkenthetjük (pasztörözés). Alapvető kérdés a termék hőstabilitása, mindent ez határoz meg.

A hőkezelés hatékonyságának mechanizmusa sok részfolyamatból tevődik össze. Az egyik fő folyamat a fehérjék denaturálódása, a másik vélhetőleg a biológiai membránok dezintegrálódása a lipidek „megolvadása” következtében. Számottevő a vizes oldatok viszkozitásának csökkenése is a melegítés hatására. A változások eredője legtöbbször a szűrhetőség javulása.

Koagulálás és flokulálás

Másik lehetőség az előkezelésre elektrolitok adagolása, amelyekkel koaguláció illetve flokuláció váltható ki. Elektrolitként az egyszerű szerves ionoktól a szintetikus polielektrolitokig bármi alkalmazható, ezekkel az adalékokkal részletesen foglalkozunk a később a [4.4.1. fejezetben](#).

Savak és bázisok bevitelle megváltoztatja a pH-t, és ezzel a részecskék, sejtek, makromolekulák töltését. Az eredő töltés csökkenésével, vagy megszűnésével (izoelektromos pont) a részecskék közötti taszító erők is mérséklődnek, összetapadásuk gátja megszűnik. Ha a pH-t nem a megfelelő irányba toljuk el, a töltés növekszik, és a szűrhetőség romlik. A pH hatását a szűrhetőségre jól szemlélteti a 2.1.3.1. ábra egy *Streptomyces* fermentlé példáján.



2.1.3.1. ábra: pH hatása a szűrési sebességre

A hosszú láncú polielektrolitok (hídképzők) adszorbeálódnak a sejtek felszínén, ezáltal hidakat képeznek közöttük, amivel valósággal összeragasztják azokat nagy, jól elválasztható pelyhekké.

Az elektrolitos kezelés nehezen írható le kvantitatívan, inkább kísérleteken, empirikus elveken alapul. A jelenlévő sokféle komponens sokféle kölcsönhatását bonyolult összegezni. Ráadásul az egyes adalékok hatása sem egyszerű. A többértékű fémionok például egyszerre hatnak pufferként, töltéselnyomóként és hídképző ágensként is. Több különböző segédanyag együttes hatása esetenként lényegesen nagyobb lehet, mint a külön elért hatások összege. A koaguláció és flokuláció kérdéseit a későbbiekben részletesen tárgyaljuk a Csapadékképzés fejezetben.

Szűrősegédanyagok alkalmazása

A harmadik szűrőkönyítítő előkezelési mód a szilárd szűrősegédanyagok használata. A szűrősegédanyagok legtöbbször ásványi eredetű inert, szemcsés, laza szerkezetű, porózus anyagok. Felhasználásuk kétféle lehet. Hozzákeverhetjük a feldolgozandó fermentléhez, ekkor a szűrés során a kirakódó lepény nem csak sejtekből áll, hanem jelentős mennyiségű segédanyagot is tartalmaz. A koloid részecskék, adott esetben a sejtek adszorbeálódhatnak a részecskék felületén, miáltal az így kialakuló szűrőréteg lényegesen stabilabb lesz, kevésbé tömörödik, mint a csak sejtekből álló. Másik lehetőség, hogy a segédanyagból előréteget képezünk a szűrő felületén. A fermentlé szűrése előtt a segédanyagot vízben szuszpendálják, és ezt szűrik az adott szűrőberendezéssel. A szűrő felületén tisztán segédanyagból álló több centiméter vastag előréteg alakul ki. Ezután következik a sejtömeg szűrése, az előrétegen mélységi szűrés megy végbe, a sejtek a réteg pórusaiban akadnak el. A „kevert” szűrőlepény áteresztő képessége sokkal jobb, jóval több fermentlé szűrhető le egy menetben.

Hátrányt jelent viszont a keletkező kiszűrt szilárd anyag mennyiségének növekedése, még akkor is, ha az csak elhelyezendő hulladékként jelentkezik. Ha a sejtekre van szükség a további feldolgozási technológiában (pl. intracelluláris termék), akkor a sejtekkel együtt leválasztott segédanyag pusztán mennyiségével (ballaszt anyag) megnehezítheti a feldolgozási technológiát.

A két leghatékonyabbnak bizonyult segédanyag a [diatómaföld](#) és a [perlit](#). A diatómaföld szilikátvázas tengeri élőlények nagy tömegben lerakódott maradványaiból áll. A perlit vulkáni eredetű kőzetek, amelyeket izzítással „kiterjesztenek”, így érik el a rendkívül laza, porózus szerkezetet.

2.1.3.1. táblázat: Szűrősegédanyagok jellemzői

Gyártmány	Sűrűség (kg/m ³)		pH	Vízfelvétel %	Relatív térfogatáram
	száraz	nedves			
Diatómaföld					
Filter Cel	112	254	7	235	100
Standard Super Cel	128	286	7	255	200
512 Hyflo	128	286	7	250	300
Super Cel	144	286	10	245	500
501	152	270	10	250	750
535	192	282	10	245	1350
545	392	288	10	240	2160
560	310	320	10	220	7500
Perlit					
Terracel	110	260	7,5	-	300
Terracel	130	240	7,5	-	900

A felsorolt anyagok tulajdonságait az 2.1.3.1. táblázat, jellemző felhasználásait 2.1.3.2. táblázat mutatja be.

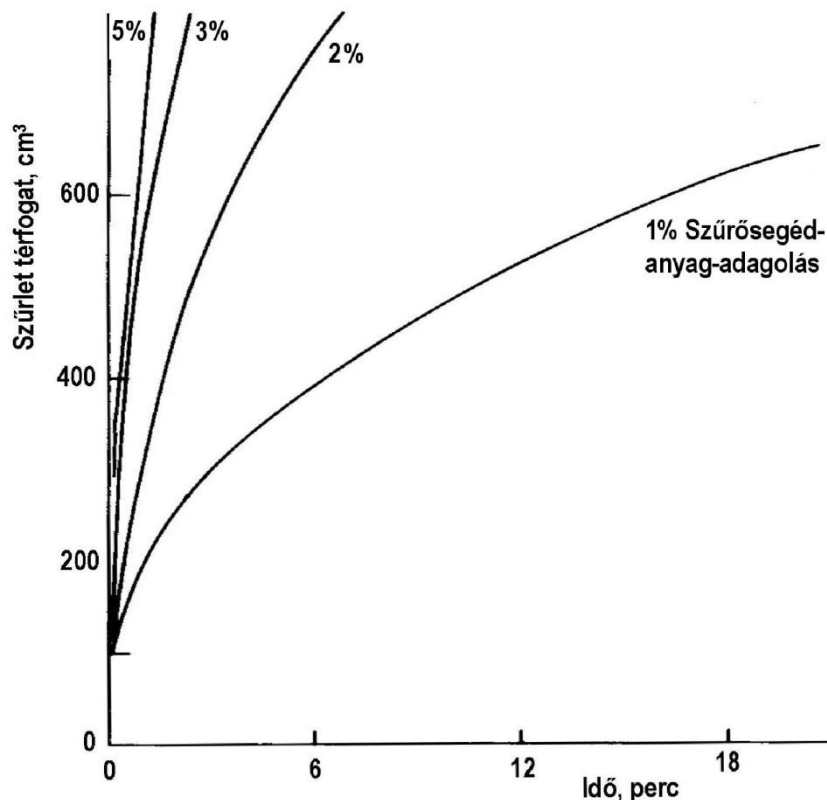
2.1.3.2. táblázat: Szűrősegédanyagok és felhasználásuk

Márkanév	Relatív szűrési sebesség rel. %	Szűrlet tisztaság rel. %	Alkalmazások
Celatom FP-2	100	1000	sör, olaj, pektin, cukor, bor, ecet, alkohol, citromsav, polimerek, zselatin, faggyú, zsír
Celatom FP-4	200	995	sör, olaj, pektin, cukor, ecet, alkohol, citromsav, petrol-ipari termékek, lakk, foszforsav
Celatom FW-6	300	986	sör, antibiotikumok, zománc, ragasztó, gyümölcs-lé, petrolipari termékek, zselatin
Celatom FW-20	1000	960	savak, citrát, must, zsírok, olajok, gyümölcs-lé
Celatom FW-50	2500	940	alginátok, antibiotikumok, préselt gyümölcs-lé, aromák, kazein, szirup, glutén, poli-merek
Celatom FW-80	5500	927	alginátok, antibiotikumok, biovegyszerek, polimerek

Azokban a speciális esetekben, amikor szilikát-bázisú segédanyag nem alkalmazható, őrölt fapépet, szalmatöredéket vagy keményítőt használnak.

A szűrősegédanyag alkalmazásának pozitív hatása jól lemérhető a 2.1.3.2. ábrán. A szűrősegédanyag kiválasztásánál szempont az, hogy csak mechanikai, szerkezetjavító hatása legyen, kémiai legyen inert. A segédanyag nagy felületén felléphetnek adszorpciós jelenségek is. Ha ez egyes szennyező anyagok megkötésével jár, akkor előnyös a feldolgozás szempontjából, de ha a célterméket köti meg, akkor anyagvesztéset okoz. Néhány termék, például az aminoglikozid antibiotikumok erősen, majdnem irreverzibilisen kötődnek a diatómaföldön, így ezt nem lehet a szűrésnél alkalmazni.

A különböző szűrősegédanyagok összehasonlításánál figyelembe kell venni, hogy a nagyobb szűrési sebességgel általában egyre romló klarifikálás jár, azaz egyre több lebegő anyag kerül át a szűrletbe.



2.1.3.2. ábra: Szűrősegédanyag-adagolás hatása

2.1.4. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

Az egyenletek levezetése során egyesekben bizonyára az a kép alakult ki, hogy a szűrés méretezéséhez nem kell más, mint papír, számológép és némi agymunka. Ez a valóságban nincs így, laboratóriumi vizsgálatokra is szükség van. Egyszerű vizsgálati módszerek kellene az előkezelés, a kompresszibilitás, a mosási hatékonyság és hasonló jellemzők megismeréséhez. Minél egyszerűbb kísérleti módszereket használunk, annál általánosabban alkalmazhatjuk azokat.

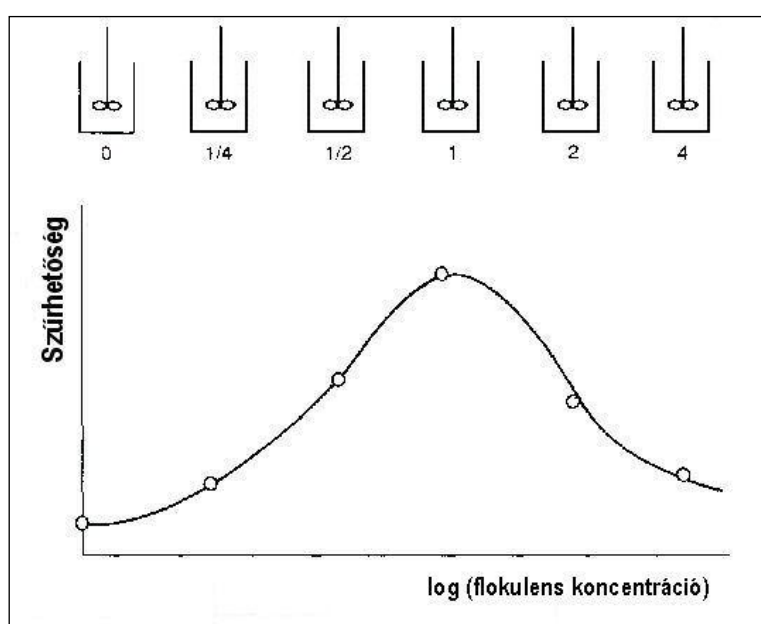
Ezeket a laborvizsgálatokat mutatjuk be ebben a fejezetben. A kísérletek során az eddigieken kívül olyan paraméterek is felbukkannak, amelyek az általános matematikai leírásban nem szerepeltek. Például a szűrlet tisztasága (átlátszósága), a szűrőlepeny ragacsossága, tapadása a szűrőfelülethez, a mosás nehézsége, a réteg repedezése, végül a levett anyag nedvességtartalma; ezek mind befolyásolják a sikeres szűrést.

A módszerek ismertetése előtt egy figyelmeztetés. Minden esetben győződjünk meg arról, hogy a kísérletekhez felhasznált minta reprezentatív módon azonos a nagyobb léptékben feldolgozni szándéko-

zattal. Fertőzés, hőmérsékletváltozás vagy a sejtek lízise váratlan mértékben megváltoztatja a lé fizikai tulajdonságait. A mikrobiológiai fertőzés a sejtömeg összetételét és ezen keresztül szűrési jellemzőit változtatja meg. A hőmérséklet a szűrlet viszkozitását befolyásolja, és ezzel a szűrési sebességet módosítja. Vízesetében például a hőmérséklet emelése 20 °C-ról 60 °C-ra a kétszeresére növeli a szűrési sebességet. Törekedjünk tehát arra, hogy a vizsgált minta előléte minél jobban hasonlítson az üzemi anyagéhoz.

2.1.4.1. Előkezelés hatásának vizsgálata

A különböző előkezelési módszereket könnyen összehasonlíthatjuk egyszerű, szakaszos ülepítési próbákkal. Egy sorozat egyforma – esetleg lassújárású keverővel felszerelt – edénybe azonos mennyiségű levet mérünk. Ezekbe azután különböző mennyiségű (esetleg minőségű) flokulánst adunk, megkeverjük, majd ülepedni hagyjuk. Egy meghatározott idő elteltével a flokulálás minőségének valamely jellemzőjét (pl. a felülúszó extinkciója, ülepedés, szűrési sebesség) mérjük. A 2.1.4.1.1. ábra eredményei tipikusnak mondhatók, gyakran észlelhető többé-kevésbé éles optimum. A bemutatott példában a sav hatására koagulált a biomassza, de túl nagy adagok esetén a részecskék áttöltődnek, és újra stabilizálódik a szuszpenzió.



2.1.4.1.1. ábra: Előkezelés vizsgálata

2.1.4.2. Szűrés szivótölcséren

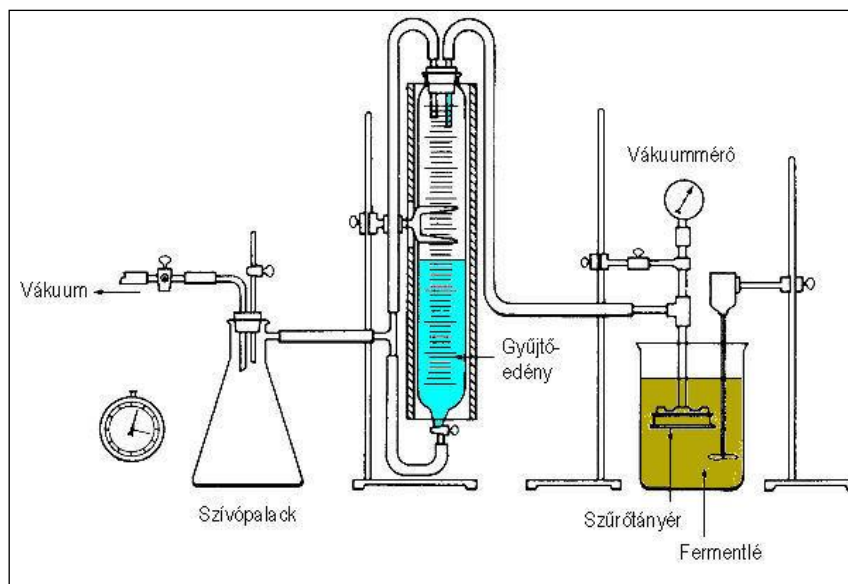
Új szűrési feladatoknál, mint például új tenyészet, új tápoldat vagy megváltozott körülmények, egyszerű, de hasznos tájékozódó vizsgálatokat végezhetünk egy Büchner tölcsérral. A szokásos módszer az, hogy felviszünk a szűrőre egy réteget a kívánt szűrősegédanyagból, ráviszünk 100 ml előkezelt vagy kezeletlen fermentlevet és meghatározott ideig szűrjük az üzemihez hasonló nyomáskülönbség mellett. Általában a szűrlet térfogatát és átlátszóságát mérik. Példaként *Bacillus subtilis* tenyészet szűrésének adatait mutatjuk be a 2.1.4.2.1. táblázatban. A kapott eredmények azt mutatják, hogy kompromisszumot kell kötni a szűrési sebesség és a szűrlet tisztasága között. Mindkét szempontot figyelembe véve 1,2 % flokulens adagolása javasolható a technológiában.

2.1.4.2.1. táblázat: *Bacillus subtilis* fermentlé szűrési adatai

Flokulens %	Szűrési sebesség liter / óra	A szűrlet tisztasága
0,0	9,60	iszapos
0,8	2,04	enyhén zavaros
1,0	1,92	enyhén zavaros
1,2	2,76	tiszta
1,4	2,76	tiszta
1,6	3,12	enyhén zavaros

A kapott idő és térfogatadatok felhasználhatók a nagyobb léptékű szűrés időigényének meghatározáshoz. Bár megbízható összefüggések kialakításához sok adatot kell összegyűjteni, az eredmény megéri a befektetett munkát. Ugyanakkor a kapott szűrletek felhasználhatók analitikai célra is, aminek révén további információkat szerezhethünk.

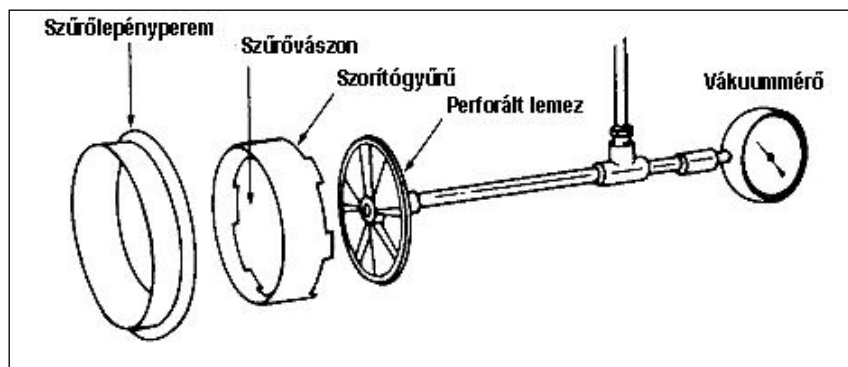
2.1.4.3. Kísérleti szűrőtányér (Filter Leaf)



2.1.4.3.1. ábra: Összeállítás laboratóriumi szűrési kísérletekhez

A vákuum dobszűrő alkalmazásához a szűrőtányérral végzett teszt a következő lépés. A legtöbb esetben a vákuum dobszűrő alkalmazását, sőt vásárlását is szűrőtányéros kísérletek alapján határozzák el. A vizsgálat során egy manuálisan működtetett, ismert felületű kísérleti szűrővel szimulálják a dobszűrő kerületén végbemenő műveletsort. A szűrőlepeny vastagsága és minősége, a szűrlet mennyisége és minősége, a mosás hatékonysága és a szükséges mosófolyadék mennyisége egyaránt meghatározható. Ez a technika jól modellezi laboratóriumi méretekben a dobszűrő működését, kisméretű dobszűrőket ilyen vizsgálatokra nem is használnak. A kísérleti összeállítást az 2.1.4.3.1. ábrán mutatjuk be.

Főrészei: - maga a szűrőtányér, - kalibrált gyűjtőedény a szűrletnek és a mosófolyadéknak, - szabályozható vákuumrendszer. A bemerülő szűrőtányér összeállítási rajza a 2.1.4.3.2. ábrán látható. Az állítható perem egyrészt a kialakuló szűrőlepeny vastagságának mérésére, illetve az esetleges előréteg vastagságának beállítására szolgál.



2.1.4.3.2. ábra: A szűrőtányér részei

Ha előretegezett szűrést vizsgálnak, akkor először a kiválasztott segédanyagot szívatják rá a szűrőre. Ha előreteg nélküli a szűrés, akkor egyből a vákuum alá helyezett tányért merítik a fermentlébe annyi időre, ahány másodpercig a dobszűrő egy pontja a lébe merül (t_f). A réteg kialakulása közben enyhe keveréssel a dobszűrő teknőjében fellépőhöz hasonló kevertetési állapotot tartanak fenn. A szűrési idő leteltével a tányért a vákuum fenntartása mellett kiemelik, majd a dob forgásának megfelelő szívatási idő multán a mosófolyadékba merítik. A továbbiakban is szigorú időprogram szerint kezelik, kiemelik a mosófolyadékból, szívatással szárítják, majd eltávolítják a szűrőlepenyt. Ehhez leveszik a lepeny védőgyűrűjét, megméri a szabaddá vált réteg vastagságát. Az anyagmérleg felállításához rendelkezésre áll a szűrlet és a szűrőlepeny. A kapott adatok jól adaptálhatók az üzemi léptékre.

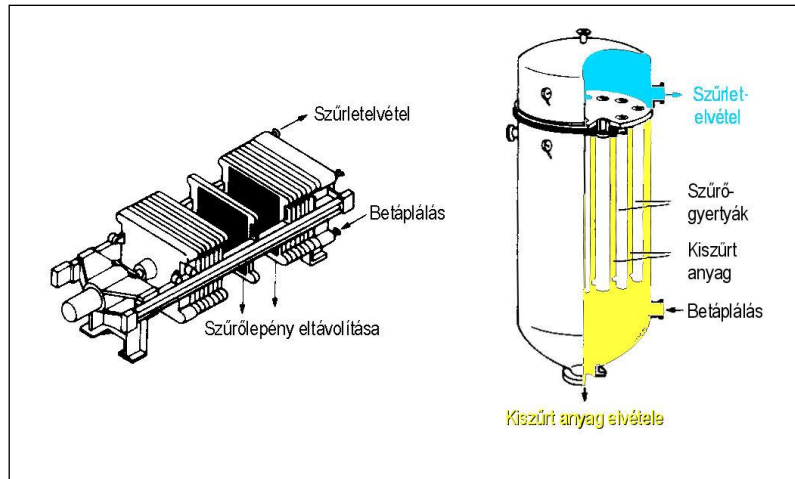
A különféle fermentleveknél előretegezéssel kapott jellemzőket az 2.1.4.3.1. táblázatban foglaltuk össze.

2.1.4.3.1. táblázat: Jellemző szűrési sebességek vákuumszűrésnél

Termék	Mikroorganizmus	Szűrési sebesség
kanamicin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	– 0,7
linkomicin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	2,6 – 3,3
neomicin	<i>Streptomyces fradiae</i>	– 1,1
eritromicin	<i>Streptomyces erythreus</i>	2,9 – 5,7
penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	12 – 16
proteáz	<i>Bacillus subtilis</i>	0,9 – 3,7

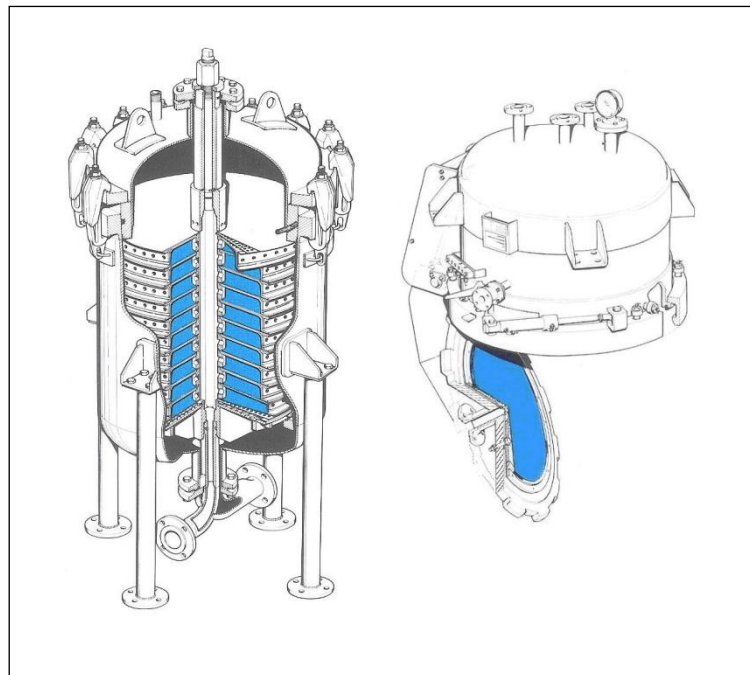
2.1.5. A szűrés berendezései

A szűrőberendezések kialakítása igen változatos, a hagyományos keretes szűrőpréstől a vákuum dobszűrőig sokféle konstrukció jött létre. A kisebb teljesítményű szűrők két alaptípusát mutatja be a 2.1.5.1. ábra. A legismertebb, a keretes szűrőprés sorba rendezett szűrőtartó keretekből áll, a szilárd anyag az elemek közötti térben rakódik le. A szűrő anyaga lehet a keretre szerelhető vászon, cellulóz szűrőlap, esetleg fém (rozsdamentes acél). Nagyobb mennyiségű szűrőlepeny kialakulása esetén a szűrőtér megnövelhető a közbe illesztett nyitott (üres) keretekkel. Ezt a szűrőtípust akkor célszerű alkalmazni, ha viszonylag tömör, kis nedvességtartalmú szűrőlepenyre van szükség. A szűrő kapacitása, azaz a szűrőfelület, a beszerelt elemek számával gyakorlatilag fokozatmentesen változtatható. A szétszerelésnél elkerülhetetlen a rendszer megnyitása és az anyag manuális eltávolítása. Emiatt működtetésük meglehetősen munkaigényes, és a típus nem ajánlott mérgező vagy biológiailag veszélyes levek szűrésére.



2.1.5.1. ábra: Szűrők

A másik típusnál, a gyertyás szűrőnél ez a probléma nem lép fel, ez zárt rendszerben is működtethető. A szintén függőleges elrendezésű gyertyaszűrő esetében a hengeres szűrőelemek (gyertyák) általában felülre szerelt tartólapon helyezkednek el. A szilárd fázis a gyertyák külső felületén rakódik le, ahonnan a folyadékáram irányának megfordításával (backflush) lökhető (mosható) le. Az anyagot azután az alsó nagy átmérőjű leírtó cszonkon át távolítják el. A szűrletet a készülék fejrészből vezetik el. A berendezés így sok szűrési cikluson keresztül zárt rendszerben üzemeltethető, de a szűrőelemek cseréjéhez itt is meg kell bontani a rendszert.



2.1.5.2. ábra: Nyomószűrők

Kisebb anyagmennyiségek szűrésére széles körben alkalmazott szűrőberendezések a nyomószűrők. Túlnyomással működnek, ennek megfelelően egy nyomástartó edényben helyezkedik el egy vagy több szűrőlap/vászon. A szűrőlepleny eltávolítására ezt a készüléket is meg kell bontani, hátrányai ugyanazok, mint a keretes szűrőpréznél.

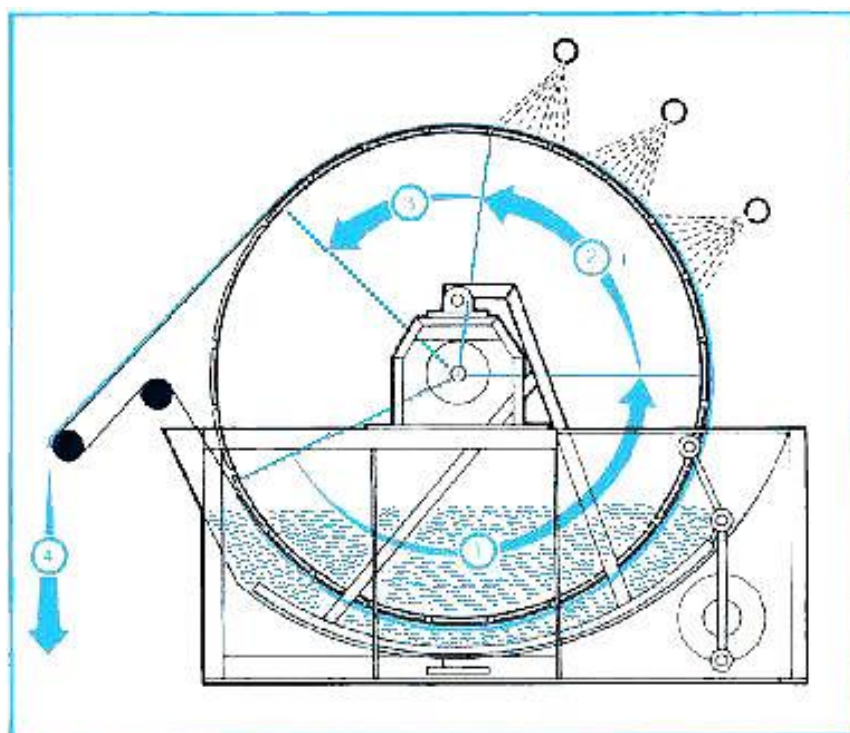
2.1.5.1. A vákuum dobszűrő

A kisebb kapacitású berendezések után térjünk át a vákuum dobszűrőre.

A vákuum dobszűrő az egyik leggyakrabban alkalmazott szűrőberendezés. Az ipari antibiotikumgyártásban gyakrabban fordul elő, mint az összes többi szűrőtípus együttvéve. Nehéz és lassú szűrések megoldására is mindig érdemes kipróbálni. Szinte korlátlanul léptéknövelhető, nehezen szűrhető levek feldolgozására is alkalmazható. Működtetése egyszerű, részben automatizálható is, ezért kicsi az élőmunka igénye.

A vákuum dobszűrő szellemesen oldja meg a szakaszos működés folytonosítását. A hagyományos dead end szűrés mindenképpen szakaszos művelet, az indulásnál teljesen tiszta szűrőfelületre fokozatosan rakódik le a szűrőlepeny, elér egy bizonyos vastagságot, ekkor el kell távolítani a kiszűrt anyagot, és a tiszta felülettel kezdődhet előlről a folyamat. Ezt a lépéssort a dobszűrő egy körülfordulása alatt végrehajtja, tehát szakaszos, pontosabban ciklikus a működése. Az egész egységet tekintve viszont azt tapasztaljuk, hogy folyamatosan távozik a szűrlet és a szűrőlepeny. Ezt az ellentmondást úgy oldhatjuk föl, hogy az egyes cellák, szegmensek működése ténylegesen szakaszos, de a fáziseltolással működtetett sok cella együtt már kvázi-folytonos működést eredményez.

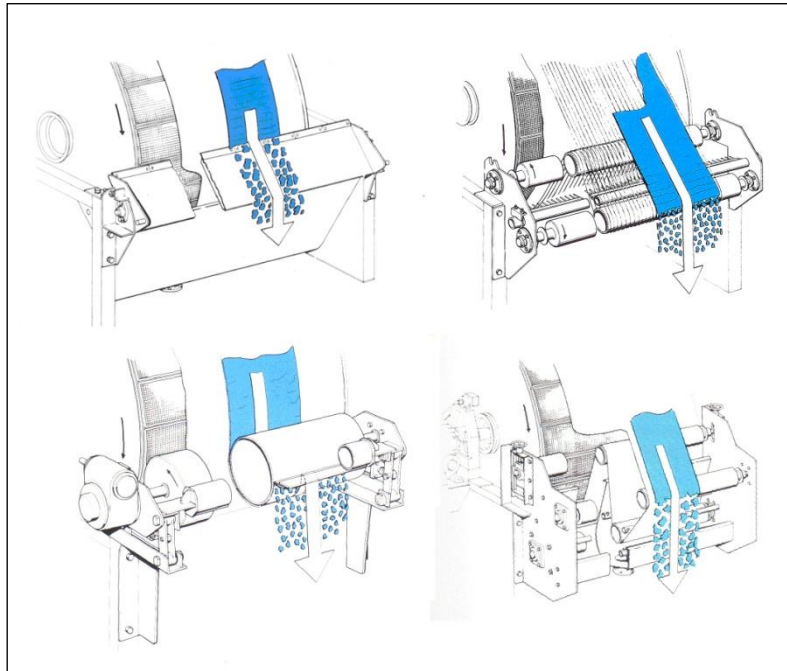
Sokféle vákuum dobszűrőt építettek már, a 2.1.5.1.1. ábrán egy tipikus konstrukció felépítését és működését mutatjuk be.



2.1.5.1.1. ábra: Vákuum dobszűrő

Főegysége egy szektorokra osztott forgó dob, amely részlegesen a szürendő lébe merül. A nyomás a dobon kívül atmoszférikus, a dob szektorainak nagy részében viszont csökkentett nyomás uralkodik. A szűrőréteget a lassan forgó dob felületére feszített szűrővászon, illetve az erre ráakódott anyagréteg alkotja. A dob külső felületére a bemerülő zónában rakódik fel a szűrőlepeny, a szűrlet a henger belsejébe, a szívókamrába kerül. A léből kiemelkedve a folyamatos szívás következtében a szűrőlepeny víztartalma csökken. A lepeny felületére jutott mosófolyadékkal, amit a vákuum szintén beszív a dob belsejébe, az elválasztás tovább javítható. A folyamat következő szakasza a víztelenítés, esetleg szárítás. Az összefüggő folyadékfázis elfogyásával levegő áramlik át a szűrőlepenyén, ami tovább csökkenti a víztartalmat. Az utolsó lépésre, a szilárd réteg eltávolítására, amit az ábrán késcs kaparóval mutatunk be, de több konstrukciós megoldást is kifejlesztettek (2.1.5.1.2. ábra). A késcs mellett gyakran alkalmazzák a lefutó zsinóros, illetve a végtelenített szűrővásznas megoldásokat is. Az elsónél a szűrővászon felületén sűrűn egymás mellett (1–3 cm-re) vékony zsinórok feszülnek, amelyeket a kés helyén egy görgő emel a dob felületéről. A zsinórok leemelik a szűrőlepenyt a vászonról, és a görgőnél elhelyezett tartóba vezetik. A második megoldásnál maga a szűrővászon ír le hasonló pályát, a vászon emeli el a kiszűrt anyagot a dobról, és a kis sugarú görgők által

kikényszerített iránytörések miatt az anyag leválik a vászonról és a gyűjtőbe hullik. A negyedik megoldásban egy nagy átmérőjű görgő érintkezik a szűrődobbal, a kiszűrt anyag ennek a felületére tapad át, és erről távolítja el egy kaparó.



2.1.5.1.2. ábra: Szűrőlepeny leválasztása

Az utóbbi három megoldás nem alkalmazható abban az esetben, ha a szűrőt előréteggel kell el-látni. A néhány centiméter vastagságú előrétegnek mindvégig rajta kell maradnia a dobon, ezt nem célirányos egy fordulat után leválasztani. Minden fordulatnál csak az elszennyeződött felületi réteget választják le, a tiszta felületű előréteg merül újra a szűrődob lébe. Ehhez nem megfelelő az egyszerű kaparó, hanem precízen állítható, menet közben is előtolható (hámozó)kést alkalmaznak. Számottevő különbség az is, hogy míg az alapváltozatnál a szűrőlepeny leválasztását a megfelelő kamrára adott túlnyomással segítik elő, addig az előrétegzett szűrőnél minden kamrában állandóan vákuumot kell fenntartani. Hátrányt jelent a keletkező szilárd anyag mennyiségének növekedése, még akkor is, ha az csak elhelyezendő hulladékként jelentkezik.

A továbbiakban tekintsük át a vákuum dobszűrő méretezését. Ahogy a 2.1.5.1.1. ábrán látható, a folyamat négy szakaszra osztható:

1. rétegeképződés
2. a réteg mosása
3. víztelenítés
4. a réteg leválasztása

A negyedik lépés, a kiszűrt anyag leválasztása – mint láttuk - többféle módon történhet. Ennek megválasztása fontos az egész művelet hatékonysága szempontjából, de nem befolyásolja a szűrő méretezését. Ezért itt csak az előző szakaszokat leíró összefüggéseket vizsgáljuk.

Rétegeképződés

A szűrő egy adott pontján akkor kezdődik meg a szűrőlepeny kialakulása, amikor az belemerül a lébe. A folyamatos vastagodás akkor szűnik meg, amikor kiemelkedik a folyadékból. Feltételezve, hogy maga a szűrővászon kis ellenállású ($R_M \ll R_C$), a következő formájú differenciálegyenletet alkalmazhatjuk:

$$\frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{\mu \cdot R_C}$$

A szűrőréteg ellenállását az összenyomható anyagra felírt összefüggéssel kifejezve:

$$R_C = \alpha \cdot \rho_0 \cdot \left[\frac{V}{A} \right] = \alpha' \cdot \rho_0 \cdot \left[\frac{V}{A} \right] \cdot (\Delta p)^s$$

Az integrálás kiindulási feltételül most is $t = 0$, $V = 0$ -t választjuk, a végpont pedig a kiemelkedéshez tartozó t_f idő és V_f szűrlettérfogat.

$$t_f = \frac{\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0}{2 \cdot (\Delta p)^{1-s}} \cdot \left[\frac{V_f}{A} \right]^2$$

A körülfordulási idővel (t_c) is kifejezhetjük a t_f időt:

$$t_f = \beta \cdot t_c$$

ahol β a hengerfelület bemerülő hányada. Ezt a kifejezést alkalmazva:

$$\frac{V_f}{A} = \left[\frac{2 \cdot \beta \cdot t_c \cdot (\Delta p)^{1-s}}{\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0} \right]^{\frac{1}{2}}$$

A szűrlet fluxusára átrendezve látható, hogy egy adott konstrukciójú dobszűrőnél a bemerülés mértékével (β) négyzetgyökösen növekszik a szűrési sebesség, míg a fordulatszámmal ($1/t_c$) szintén négyzetgyökösen csökken.

A réteg mosása

A szűrőlepeny kialakulása után még jelentős mennyiségű, oldott anyagokban gazdag oldatot tartalmaz. Ezt a lémenységet általában mosással (néha utólagos préseléssel) távolítják el. A mosásnak kettős szerepe van: egyrészt kimossa, lecseréli a lepeny pórusaiban maradt folyadékot, másrészt erősíti a diffúziót a sejttömegből. Ez utóbbinak akkor van jelentősége, ha a céltermék a sejten belül helyezkedik el.

A mosásnál két technológiai paramétert célszerű szem előtt tartani. Az egyik paraméter a szűrőlepenyben maradó fermentlé mennyisége, ez az alkalmazott mosóvíz térfogatának növelésével csökkenthető. A másik paraméter a mosóvíz áthatolási sebessége a kialakult rétegen. Ezt a szűrőréteg vastagsága és tulajdonságai határozzák meg, azaz kevésbé befolyásolható. A mosás időigénye behatárolja a dob forgási sebességét is. Vizsgáljuk meg a két faktor hatását külön-külön.

A szűrőlepenyben maradó fermentlé arányát, koncentrációját az alábbi összefüggéssel írhatjuk le:

$$r = (1 - \varepsilon)^n$$

Ahol $r = c/c_0$ – a lepenyben maradó és az eredeti fermentlé (oldott anyag) koncentrációjának hányadosa

$n = V_m/V_r$ – a mosóvíz és a szűrőlepenyben lévő folyadék térfogataránya

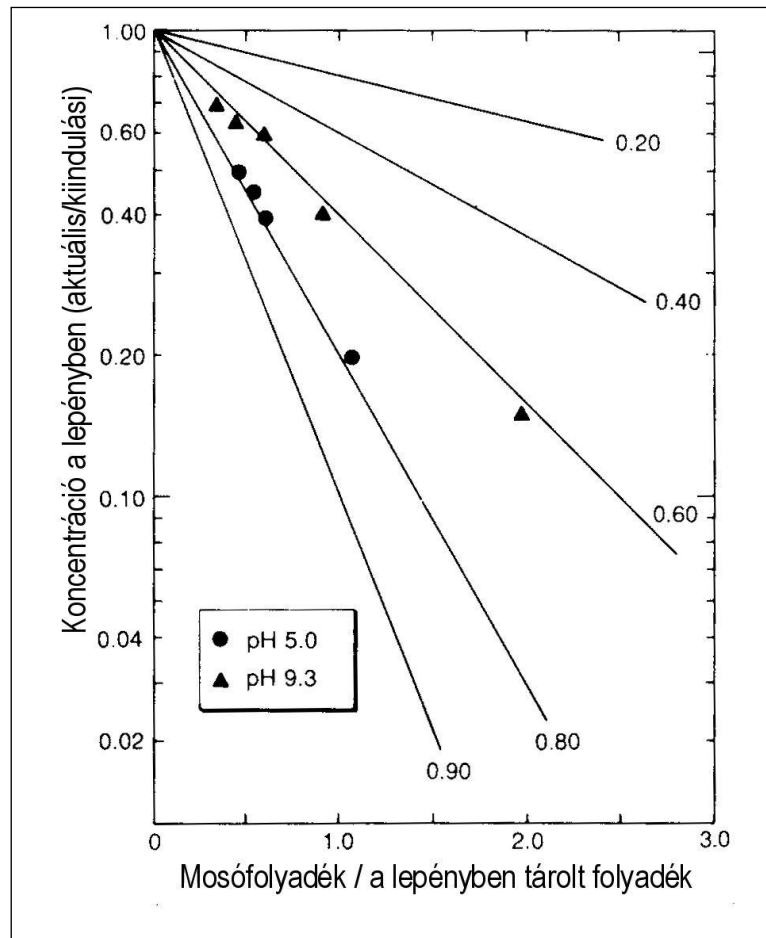
ε – a mosás „hatékonysági állandója”

Az r arány a kiindulási 1 értékről fokozatosan csökken, aszimptotikusan közelíti a nullát. Az ε állandó értéke szintén 0 és 1 közé esik, a nagyobb értékek jellemzik a gyors és hatékony mosást.

A fenti hatványfüggvény analóg a Folyamatirányítás tárgyban oktatott témakörrel, az ideális kevert tartályreaktorok válaszát egységugrás zavarásra leíró függvénnyel. Az ott levezetett

$$\frac{c}{c_0} = e^{-\frac{V_m}{V_r}}$$

összefüggés kitevője ez esetben kiegészül az empirikus $\ln(1/(1 - \varepsilon))$ állandóval.



2.1.5.1.3. ábra: A mosás hatékonysága

Bár a szűrőlepény által visszatartott folyadékokban nincs keverés, az összefüggés mégis általánosan használható a mosás leírására. A modell és a kísérleti eredmények jó egyezését mutatja a 2.1.5.1.3. ábra, linkomicin fermentlé szűrésének példáján, két különböző pH-n.

Féllogaritmikus ábrázolásban az r maradékarány lineárisan függ a mosóvíz térfogatától. Az összefüggés birtokában számíthatjuk a szükséges mosófolyadék mennyiségét, illetve a visszamaradó szennyezések koncentrációját.

A másik kulcskérdés a mosófolyadék áramlási sebessége, fluxusa a rétegen keresztül. Ez a folyadék már nem tartalmaz szilárd részecskéket, a réteg nem vastagszik tovább, tehát ellenállása állandó, és megegyezik a szűrési szakasz végpontjában kialakult ellenállással:

$$R_c = \alpha' \cdot \rho_0 \cdot \left[\frac{V_f}{A} \right] \cdot (\Delta p)^s = \left[\frac{2 \cdot \rho_0 \cdot \alpha' \cdot t_f \cdot (\Delta p)^{1+s}}{\mu} \right]^{\frac{1}{2}}$$

A mosásnál így a

$$\frac{V_m}{A} = t_m \cdot \left[\frac{(\Delta p)^{1-s}}{2 \cdot \mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0 \cdot t_f} \right]^{\frac{1}{2}}$$

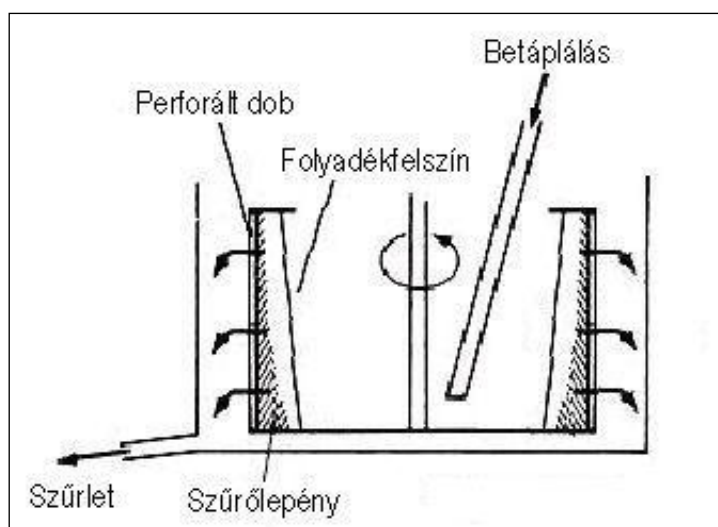
összefüggés érvényes, ahol V_m a mosóvíz térfogata, t_m pedig a mosás ideje. A gyakorlatban sokszor célravezetőbb a szűrési és mosási egyenlet hányadosát használni:

$$\frac{t_m}{t_f} = 2 \cdot \frac{V_m}{V_f} = 2 \cdot \frac{V_m}{V_r} \cdot \frac{V_r}{V_f} = 2 \cdot n \cdot f$$

ahol V_r a szűrőleplenyben visszamaradt szűrlet térfogata, f pedig a visszatartott és az áthaladt szűrlet mennyiségének hányadosa. Ennek az egyszerűsített felírási módnak az alkalmazását szemlélteti a fejezet végén a 4. számpélda.

2.1.5.2. Szűrőcentrifugák

A szűrőcentrifugákat sokszor a centrifugálás műveleténél tárgyalják, mivel a berendezések számos elemükben hasonlítanak az ülepítő centrifugákhoz. A működési elv azonban eltérő, itt nem a sűrűségkülönbségen alapuló ülepítés valósul meg, hanem ez valójában szűrés, amihez a szükséges nyomáskülönbséget a centrifugális erő által megsokszorozott hidrosztatikai nyomás biztosítja.

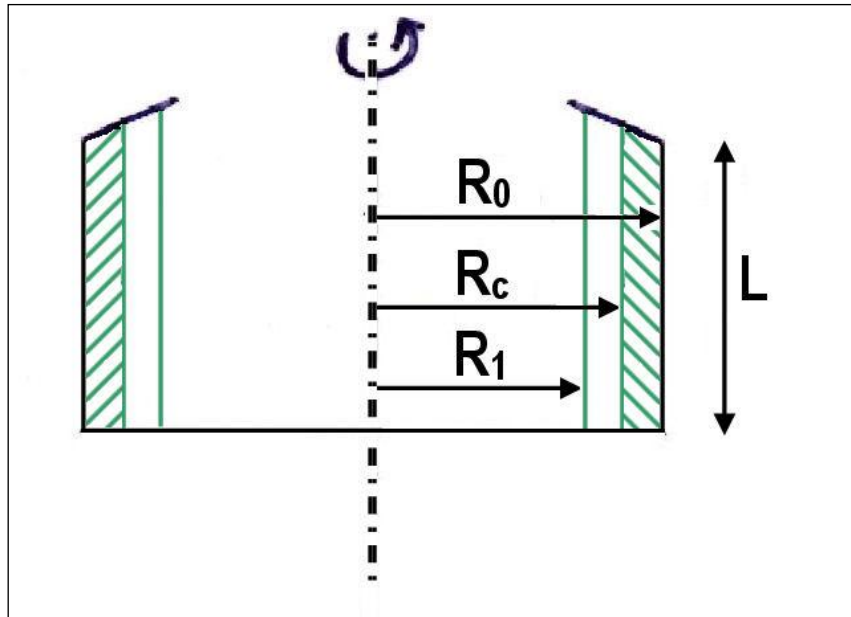


2.1.5.2.1. ábra: Szűrőcentrifuga vázlata

Kialakítása: a centrifuga forgórésze egy hengeres, palástján perforált dob (mint a háztartási ruha-centrifugánál), ennek belső felületére rásimul egy szűrővászon zsák. A dob felső behajló pereme tartja bent a folyadékréteget. A szabad csővégen át beengedett szürendő folyadékot a centrifugális erő a dob palástjára teríti, a folyadék felszín kis fordulatszámoknál paraboloid, nagy fordulatszámoknál hengeres, a dob falával párhuzamos alakot vesz fel.

A szűrlet áthalad a szűrővászonon és a dob nyílásain át kilép, a gyorsan forgó dob felületéről cseppek formájában kivágódik. Ezeket a külső ház fogja fel, alul összegyűlik és általában szabad kifolyással távozik. A kiszűrt anyag a dob belső felületén réteget képez. Itt az anyag helyben mosható, illetve hosszabb pörgetéssel vízmentesíthető.

A szűrőcentrifuga működésének leírásához nem elegendő a dob átmérőjének ismerete. Ismerni kell kirakódó réteg vastagságát, és a folyadék réteg vastagságát (a hozzá tartozó sugarak R_c és R_0) is. A dob palástjának magassága L .



2.1.5.2.2. ábra: Szűrőcentrifuga fő méretei

A számításokhoz felhasznált adatok:

R_0 - az üres dob belső sugara

R_c - a szűrőlepleny felületének távolsága a tengelytől

R_1 - a folyadék felszínének távolsága a tengelytől

L - a dob magassága

Felhasználva az eddig tárgyalt összefüggéseket a szükséges nyomáskülönbség:

$$\frac{\Delta p}{l} = \mu \alpha \rho_0 v$$

Ahol $l = (R_0 - R_c)$ a kirakódott szűrőlepleny vastagsága, v a lineáris áramlási sebesség.

A számításokat különösen bonyolulttá teszi az, hogy mind a nyomás, mind az áramlási sebesség helyfüggő, azaz változik a sugár függvényében. A sebesség felírásánál figyelembe kell venni azt, hogy a tengelytől távolodva ugyanaz a térfogatáram egyre nagyobb és nagyobb felületen oszlik meg, tehát a lineáris sebesség csökken.

$$v = \frac{W}{A} = \frac{W}{2\pi r L}$$

ahol W = térfogatáram

Ezt a sebességet helyettesítjük be a nyomás változását leíró egyenletbe:

$$-\frac{dp}{dr} = (\mu \alpha \rho_0) v = (\mu \alpha \rho_0) \frac{W}{2\pi r L}$$

A létrehozott nyomáskülönbség a folyadékoszlopra ható centrifugális erővel számítható:

$$\Delta p = \frac{1}{2} \cdot \rho \omega^2 (R_0^2 - R_1^2)$$

A differenciálegyenletet szétválasztással integrálhatjuk, a nyomás felső határaként a fenti kifejezést helyettesítve az

$$W = \frac{\pi L \rho \omega^2 (R_0^2 - R_1^2)}{\mu \alpha \rho_0 \ln(R_0 / R_c)}$$

összefüggést kapjuk. A térfogatáramra nézve ez a kifejezés jól használható.

Ha viszont időben kívánjuk leírni a folyamatot, akkor nehézségekbe ütközünk, mivel mind W , mind R_c időben változik. Ennek a problémának az analitikus megoldása meghaladja tárgy kereteit, bonyolult úton is csak közelítő megoldást ad. Ezért inkább egyszerűbb megközelítést választunk. Tekintsük a szűrőfelületet sík lapnak, ahol a felület $A = 2r\pi L$, a rétegvastagság pedig $l = (R_0 - R_c)$. A sík felületű szűrőknél használt összefüggés

$$t = \left(\frac{\mu \alpha \rho_0}{2\Delta p} \right) \left(\frac{V}{A} \right)^2$$

Bevezetjük ezen kívül a ρ_c állandót, ez a szűrőlepeny szilárdanyag-tartalma, analóg a ρ_0 -lal. Ennek segítségével anyagmérleget írhatunk fel a szilárd anyagra:

$$\rho_0 V = \rho_c A (R_0 - R_c)$$

BEVITT = KIRAKÓDOTT

ebből:

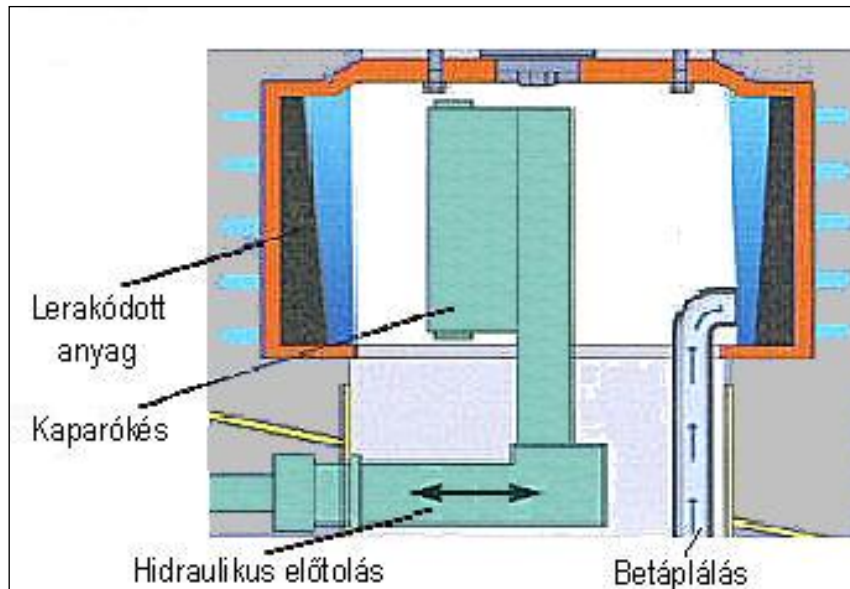
$$\frac{V}{A} = \frac{\rho_c}{\rho_0} (R_0 - R_c)$$

Visszahelyettesítve:

$$t = \frac{\mu \alpha \rho_c^2}{2\rho_0 \Delta p} (R_0 - R_c)^2$$

Ez az egyszerűsített megközelítés legtöbbször jól leírja a valós szűrési műveletet.

A szűrőcentrifugák is ciklikus működésű berendezések, előbb-utóbb megtelik a dob, el kell távolítani a lerakódott anyagot. A töltés felső határát a dob felső, befelé hajló pereme szabja meg, elvileg a peremig meg lehet tölteni a centrifugát. Gyakorlatilag, ha már peremig áll benne a szűrőlepeny, akkor nincs hely fölötte a betáplálendő folyadéknak, így ezt az állapotot nem nagyon lehet elérni. A kívánt mennyiség felvitele után a további pörgetés a szűrőlepenyt hatékonyan vízteleníti. Ha mosásra van szükség, akkor azt a készülék leállítása nélkül meg lehet oldani, ugyanazon a betápláló csövön keresztül, amelyen át a szürendő anyagot bevittük. A mosás után újabb víztelenítés következik, majd a kinyert szilárd anyagot el kell távolítani. Ez történhet a készülék leállításával, illetve anélkül. Álló helyzetben az összepréselt anyagot ki lehet kotorni manuálisan, vagy ki lehet emelni a készülék felső peremének levétele után daruval, vagy más emelőszerkezettel. Ha a szűrőzsák elég erős, töltetével együtt kiemelhető. Forgó gépből is el lehet távolítani a szűrőlepenyt megfelelően kialakított késcaparóval, amely „kihámozza” a szilárd fázist a centrifugából. Ez sem jelent teljesen folytonos üzemet, nem lehet egyszerre betáplálni és kikaparni, hiszen az anyag kivétele csak akkor lehetséges, ha a felületét nem borítja folyadék. Ráadásul a kaparóval a szűrőzsák megsértésének veszélye miatt nem lehet tökéletesen eltávolítani a szilárd anyagot, egy vékony réteget meg kell hagyni. A kikapart anyag eltávolítása legegyszerűbben gravitációs úton történhet. Ehhez viszont az elvételt lefelé kell megoldani, ami az előző ábrán bemutatott elrendezéssel nem valósítható meg. Meg kellett változtatni a konstrukciót, a készüléket „fejre állították”. A forgórész zárt oldala a meghajtással felülre került, a nyitott oldal a betáplálással és a hidraulikusan mozgatott benyúló kaparóval pedig alulra (2.1.5.2.3. ábra).



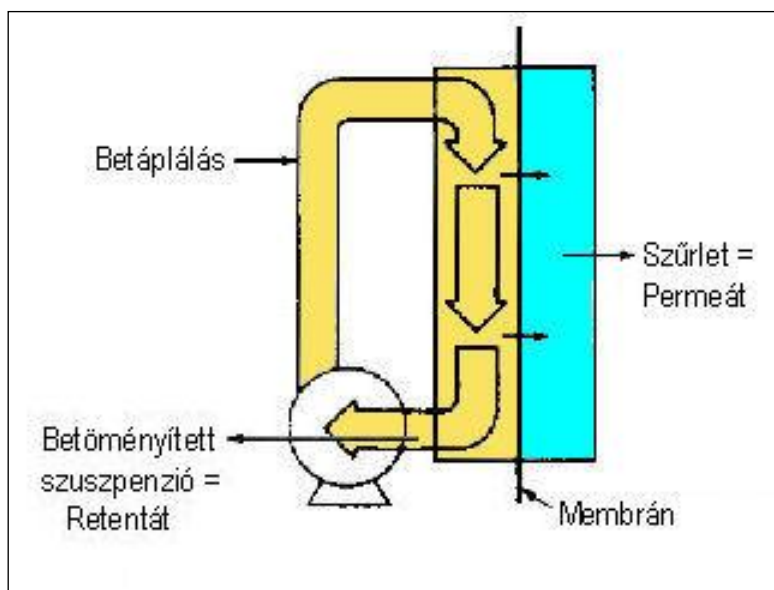
2.1.5.2.3. ábra: Alul nyitott szűrőcentrifuga

2.1.6. Mikroszűrés

Az eddigiek alapján a szűrőlepenyről sok mindent elmondhatunk. Tudjuk, hogy a nyomásesés túlnyomó részét ez okozza. Ismert, hogy az összenyomható szűrőlepeny megnehezíti a szűrést és annak matematikai leírását is. Ráadásul ez az egyre vastagodó réteg teszi a szűrést tipikusan szakaszos műveletté. Mindezek alapján érdemes keresni a lehetőséget a szűrőlepeny nélküli szűrésre. Erre az egyik megoldás az előbb tárgyalt dobszűrő, amelynél a dob felületéről eltávolítják a szűrőréteget, ezáltal tiszta szűrőfelületet hoznak létre. A másik lehetőség a keresztáramú (cross flow, tangenciális szűrés alkalmazása, amelynek elvét a fejezet bevezető részében már ismertettük. E technikánál a szűrőfelülettel párhuzamos (érintőleges, tangenciális) turbulens áramlást hoznak létre, amely megakadályozza a visszatartott anyagok lerakódását. Az áramlási kép kialakítására változatos technikai megoldásokat alakítottak ki, pl. keringető szivattyúval fenntartott intenzív áramlás (2.1.1.1. ábra), mechanikus keverés a szűrőfelület közvetlen közelében, vagy maga a szűrőelem forog nagy sebességgel a folyadékban. A cirkulációs megoldásnál technológiai feltétel a nagy lineáris sebesség a szűrőnél, ami azt jelenti, hogy a keringetés sebessége legalább egy nagyságrenddel meghaladja a szűrletét.

A mikroszűrés a membránműveletek közé tartozik, matematikai leírását az ismétlések elkerülése végett később, a membránműveletek fejezetben tárgyaljuk.

A mikroszűrés kulcsa maga a szűrőanyag, a membrán. Ezek a membránok vékonyak és mikropórusosak. A pórusok kicsinyek és monodiszperzek, azaz közel azonos átmérőjűek. Funkciójuk szerint vissza kell tartaniuk a kívánt szilárd részecskéket, ugyanakkor lehetőleg gyorsan át kell engedniük a folyadékot. A kis átmérőjű pórusok áramlási ellenállása nagy (kapillaris tartomány, Hagen-Poiseuille egyenlet), ami nagy nyomáskülönbséget tesz szükségessé. Ez alapvető különbség a hagyományos szűrőanyagokhoz képest (szűrővászon, szűrőlap). Ez utóbbiak átteresztőképessége nagy, áramlási ellenállása kicsi. A megvizsgált számpéldákban is látható, hogy a szűrőanyag ellenállása legtöbbször elhanyagolható a szűrőlepenyé mellett. A membránszűrésnél ez fordítva van, mivel nincs szűrőlepeny, az egyedüli ellenállás a membrán nyomásesése.



2.1.6.1. ábra: Mikroszűrő

A mikroszűrő működhet szakaszos és folytonos üzemben is. A szakaszos eljárásnál nincs állandó betáplálás, a retentátot recirkuláltatják. A betáplálás legtöbbször híg szuszpenzió, ami a szűrlet eltávolításával fokozatosan betöményedik. Eközben a viszkozitás még a koncentrációnál is erőteljesebben emelkedik, ezáltal a keringetés egyre nehezebbé válik. Szakaszos üzemben a betöményített levet időnként leengedik, és a berendezés kitisztítása után újabb adag lével folytatódik a feldolgozás. Folytonos üzemben a recirkuláció részleges, vagy hiányzik, 2.1.6.1. ábrán jelölt pontokon folyamatos betáplálással és elvétellel az állandósult állapot hosszabb ideig fenntartható.

Ha a szilárd fázis (tökéletes) elválasztása, víztelenítése a cél, a mikroszűrésből kikerülő koncentrátumot centrifugálással vagy hagyományos szűréssel dolgozzák tovább fel.

Érdeemes megvizsgálni a szűrők kialakítását, alakját. A mikroszűrésnél a szűrlet fluxusa sokkal kisebb, mint a hagyományos szűrőknél. Ezt jóval nagyobb szűrőfelületek beépítésével ellensúlyozzák. A készülék külső méreteit viszont nem célszerű túlságosan növelni, ezért a szűrőfelületek „összehajtogatásával” igyekeznek minél hatékonyabb berendezéseket építeni. Három alapkoncepció terjedt el: a keretes összeállítás, a spirálmembrán modul és a csőmembrán modul.

A keretes elrendezés lényegében megfelel a keretes szűrőprésnek, megfelelő membránnal felszerelve. A felület / térfogat arány a legkisebb, de előnyére szól, hogy eltömődésre kevésbé hajlamos, szétszereléssel könnyen tisztítható, és membránszakadás esetén csak egy, viszonylag kis felületű és értékű darabot kell kicserélni.

A spirális tekercsmembrán és a csőmembrán modulok felület/térfogat aránya kedvezőbb, de érzékenyebbek pl. az eltömődésre. A spirális membrántekercs egy jókora borítékra vagy fóliazacskóra emlékeztet, amelynek a belsejébe táplálják be a levet, és a külső felületen jelenik meg a szűrlet. Az egész lazán feltekerve egy hengeres házban (modul, patron) helyezkedik el. A csőmembrán modulok ([hollow fiber](#)) felépítésükben a csöves hőcserélőkre emlékeztetnek, csak éppen a csövek helyén néhány mm vastagságú mikropórusos csőmembránok találhatók. A folyadék a csövecskék belsejében áramlik, a falon átlépő szűrlet a csövek között, a „köpenytérben” jelenik meg. Mindkét modulnál a membrán károsodása esetén az egész modult cserélni kell.

E rövid áttekintés után még egyszer felhívjuk a figyelmet arra, hogy további információk találhatóak az analóg művelet, az ultraszűrés kapcsán a Membránműveletek fejezetben.

2.1.7. A szűrés összefoglalása

A szűrés a híg biológiai szuszpenziók (pl. fermentlevek) szétválasztásának sokrétűen alkalmazható művelete. Végrehajtására sokféle kialakítású berendezést alkalmaznak. Ezek közül egyesek (pl. keretes szűrőprés, szűrőcentrifuga) a vegyiparban is elterjedtek, míg pl. az előrétegezett vákuum dob-szűrő a biológiai ipar specialitása.

A levezetett matematikai összefüggések megfelelőek a legtöbb kísérleti eredmény interpretálására, de nem adnak elegendő alapot a tervezéshez laboratóriumi kísérletek nélkül. Ez visszatér majd a további műveletek tárgyalása során is, a biológiai anyagok viselkedése laboratóriumi vizsgálatok nélkül nem modellezhető. Az anyagi jellemzők általában nem szerepelnek a táblázatokban, ezeket az adott feladat megoldásához meg kell határozni, és azután lehet az összefüggésekben felhasználni.

Sok biológiai szuszpenzió nehezen szűrhető. A szűrés lassú, a keletkező szűrőlepeny összenyomható ragacsos massa. Ezekben az esetekben gyakran segít a szűrősegédanyagok adagolása, bár ennek megvan az a hátránya is, hogy a költségeken kívül növekszik az elhelyezendő szilárd hulladék mennyisége is. Ha a szűrés nem oldható meg gazdaságosan, megfontolandó a centrifugálás alkalmazása, ami már a következő alfejezet témája.

2.2. Centrifugálás

A művelet célja ugyanaz, mint a szűrésnél: a vizes fázisból a lebegő részecskék elválasztása. A működési elv azonban eltérő. A szűrés méret szerinti elválasztás, a centrifugálás (ülepités) viszont sűrűség szerinti. A sűrűség-különbség szerint kétféle elválasztás lehetséges: - a sejtek, csapadékok sűrűsége a víznél (fermentlénél, anyalúgnál) nagyobb, ezek művelet során leülepednek. Más rendszereknél (pl. tej – tejszír) a lebegő zsírtartalmú micellák sűrűsége kicsi, ezek felülepednek (tejszín). A centrifugák szerkezeti kialakítása általában csak az egyik feladat ellátását teszi lehetővé. A biomérnöki gyakorlatban a nehéz fázis elválasztása a jellemző művelet, így csak ezekkel a berendezésekkel foglalkozunk.

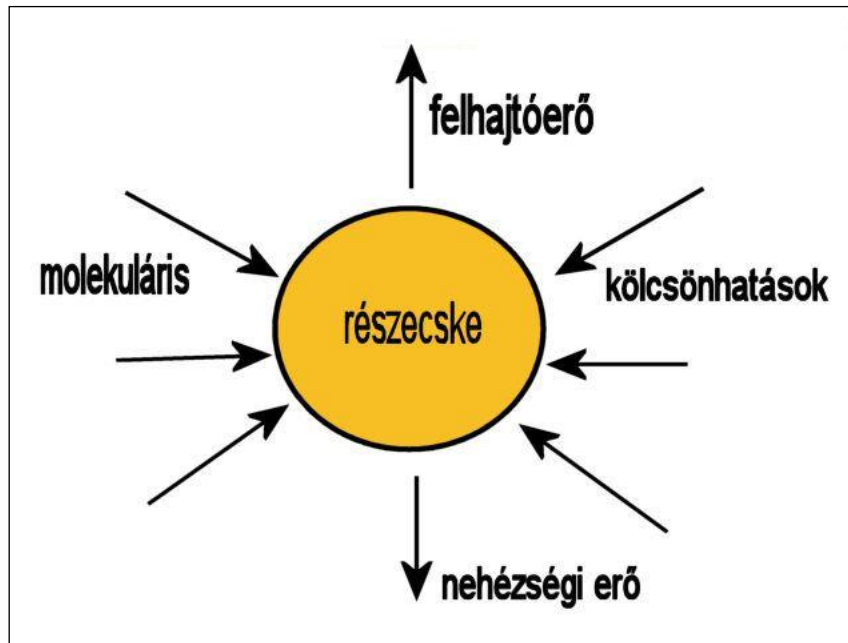
A műveletek helye a feldolgozási sorban azonos, az első fázisban a sejtek elválasztására, a későbbiekben mindenhol, ahol szilárd-folyadék elválasztásra van szükség (sejtfeltárás után, kristályosítás, csapadékképzés után).

A centrifugálás műveleténél is problémát jelent a folytonosítás. A centrifugálás (ülepités) általában véve szakaszos művelet, a szuszpenzióból kiülepedő részecskék lerakódnak a készülékben, és idővel ezeket el kell távolítani, és kezdődhet előlről a ciklus. A folytonosítás lehetősége analóg a keresztáramú szűréssel. Ott a szilárdra préselt szűrőlepeny helyett egy betöményített sejtuszuszpenziót vettünk el, a folyadék halmazállapotú be- és kilépő áramokat folyamatosan áramoltathattuk át a készüléken. A megoldás a centrifugálásnál is hasonló: ha a lecentrifugált tömeget nem tömörítjük be, hanem egy sűrű, de még folyékony szuszpenziót alakítunk ki, ez a fázis folyadékként elvezethető. Ez a megoldás ipari léptékben is alkalmazható, az élesztőgyártásnál például a sejteket szeparálják, és sűrű „élesztőtejet” állítanak elő.

A műveletválasztásnál szerepelt az a heurisztikus szabály, vagy inkább csak ajánlás, hogy: „csak akkor centrifugálj, ha szűréssel nem lehet megoldani az elválasztást”. Ez a tanács azon alapul, hogy a centrifugák általában műszakilag igényesebb, drágább berendezések (nagyobb beruházási költség), és nagy fordulatszámú és teljesítményű motorjuk folyamatos üzemel (nagyobb működtetési költség).

2.2.1. Alapfogalmak

A centrifugálásnál az ülepedés folyamata ugyanúgy megy végbe, mint a gravitációs ülepedésnél, azzal a különbséggel, hogy itt a részecskére ható gyorsító erő nem a súlyerő, hanem a centrifugális erő.



2.2.1.1. ábra: Az ülepedő részecskére ható erők

A részecskére ható eredő gyorsító erőt a két erő eredője (centrifugális erő mínusz felhajtóerő) adja.

$$F_{gy} = \left[\frac{d^3 \pi}{6} (\rho_s - \rho) \right] a$$

Centrifugálásnál a gyorsulás: $a = \omega^2 \cdot r$, ülepedésnél pedig egyszerűen g . Az ábrán nem szerepel a harmadik fellépő erő, a közegellenállás, mert az sebességfüggő, álló helyzetben nem működik. Levezethető a Stokes-törvényből, gömb alakú részecskére:

$$F_k = 3d\pi\mu v$$

Az összefüggés csak a lamináris tartományban, a

$$Re < 1 \quad \left(\frac{dv\rho}{\mu} < 1 \right)$$

feltétel teljesülése esetén érvényes. Ez a sejtek mérettartományában mindig teljesül.

A gyorsító erő igyekszik a szemcse sebességét növelni, a közegellenállás viszont a növekvő sebességgel arányosan egyre erősebben fékezi. Egy rövid átmeneti szakasz után a gyorsító és közegellenállási erők kiegyenlítődnek,

$$F_{gy} = F_k$$

a részecske nem gyorsul tovább, hanem egyenletes sebességgel halad:

$$v = \frac{d^2(\rho_s - \rho)a}{18\mu}$$

ez a sebesség függ a sugártól, mert $a = r \cdot \omega^2$. A tengelytől való távolodással az állandósult sebesség lineárisan nő.

Az általános elvek tisztázása után ennél a műveletnél is biológiai iparok sajátosságait vesszük szemügyre. A sejtek centrifugálásánál érdekes jelenségek léphetnek fel, amelyeket egyszerű, inert, merev részecskékénél, kristályoknál nem tapasztalunk.

Kis koncentrációnál, ahol az egyes sejtek távol vannak egymástól, nincs közöttük kölcsönhatás, az elméletnek megfelelően viselkednek, nincs eltérés.

Nagyobb koncentrációnál a sejtek közelebb kerülnek egymáshoz, elektrosztatikus, vagy más kölcsönhatások léphetnek fel. Vonzás esetén a sejtek aggregálódhatnak, összetapadnak, nagyobb csomókat, pelyheket képezhetnek. A nagyobb részecskék pedig gyorsabban ülepednek, így ez a jelenség előnyös az elválasztás szempontjából. Taszítás esetén sejtek távol maradnak egymástól. Azonos méretű, azonos töltésű és töltéserősségű sejtek esetén mindegyik szomszédjuktól egyenlő távolságra törek-szenek. Így sajátos, rendezett szerkezet jön létre, a sejtek közelítőleg felveszik a hatszöges/tetraédes elrendeződést, és ebben az alakzatban haladnak át a folyadékon.

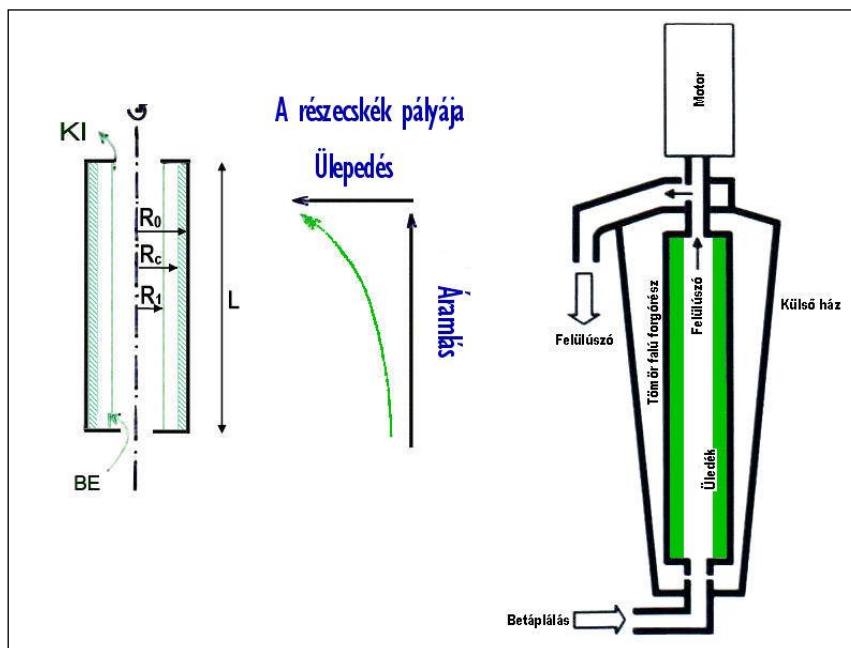
Amikor a sejtek elérik a készülék falát, lerakódnak és üledéket alkotnak. Ez az üledék a sejtekből álló szűrőlepenyhez hasonlóan a terhelés, nyomás hatására deformálódik, összehérselődik, nem tartja meg a szerkezetét, mint a kristályos anyagok.

2.2.2. Készüléktípusok

A centrifugák mindegyike forgásszimmetrikus, de geometriájukban, az anyagáramok vezetésében, ürtésük módjában nagy különbségek vannak.

2.2.2.1. Csőcentrifuga (szupercentrifuga, tubular bowl)

A legegyszerűbb forgástest a henger, a csőcentrifuga forgórésze ilyen, látszólag egyszerű felépítésű. A csőszerű forgórész két végén a peremek tartják vissza a folyadékot, és állítják be a folyadékszintet. Alul történik a betáplálás, a folyadék végig vándorol a fal mentén a rotor felső végéhez, és ott a peremen átbukva távozik. Áramlás közben a centrifugális erő kiülepíti a részecskéket a forgórész falára.



2.2.2.1.1. ábra: Csőcentrifuga

A sejtek trajektóriája két mozgásból tevődik össze. Függetlenül, tengelyirányban a folyadékáram viszi magával, egyenletes sebességgel. A lineáris sebesség a térfogatáram és az áramlási keresztmetszet hányadosaként írható fel:

$$\frac{dl}{dt} = \frac{W}{(R_0^2 - R_1^2)\pi}$$

Sugárirányban pedig a mozgás sebessége nem állandó, a tengelytől távolodva gyorsul:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{d^2}{18\mu}(\rho_s - \rho)r\omega^2$$

Ebben a kifejezésben: $\frac{d^2}{18\mu}(\rho_s - \rho)g = v_g =$ gravitációs ülepedési sebesség.

A gyorsuló mozgás miatt a pályagörbe nem lesz egyenes, egyre meredekebben közeledik a falhoz. A sejtek mozgását a csőcentrifuga forgórészében a következő animáción mutatjuk be:



2.2.2.1.1. animáció

A centrifuga teljesítményét, azaz maximális folyadékterhelését arra a kedvezőtlen esetre állítjuk be, ha a belépő részecske a legtávolabbi pontból indul (R_1). Még ennek a sejtnak is az L távolságon való végighaladás közben el kell érnie a falig. Ha ez bekövetkezik, akkor minden más sejt is kiülep-szik közben. Ha nem, akkor a sejt a folyadékban lebegve marad, és van esély rá, hogy a kilépő felül-űszó magával viszi, és zavaros lesz a kilépő lé. Az integrálás határfeltételei tehát:

$$\int_{R_1}^{R_0} dr = \int_0^L dl$$

$$\frac{dr}{dl} = v_g \left(\frac{r\omega^2}{g} \right) \frac{\pi(R_0^2 - R_1^2)}{W}$$

Elvégezve az integrálást, és a térfogatáramot kifejezve a:

$$W = v_g \frac{\pi(R_0^2 - R_1^2)L\omega^2}{g * \ln(R_0 / R_1)}$$

kifejezést kapjuk. Ez a térfogatáram a csőcentrifuga maximális kapacitása az adott elválasztásra. Ha megvizsgáljuk az összefüggést, akkor két tényezőre egyszerűsíthetjük.

$$W = v_g * \Sigma$$

Itt v_g tartalmazza az anyagi rendszerre (a részecskére és a folyadékra) jellemző adatokat (szem-cseméret, sűrűségek, viszkozitás), míg a Σ paraméter a készülék jellemzőit (sugarak, fordulatszám, hossz). A Σ értékek ismeretében egy berendezésen végzett mérések eredményeit átvihetjük más készülékekre is.

A csőcentrifugákkal igen nagy gyorsulás (10-20.000 g) is elérhető (~10 cm-es sugár és 10-15.000/perces fordulatszám mellett). Nem csak sejtek, hanem sejttermelékek leválasztására is alkalmas. Ilyen feladat merül fel például sejtfeltárás után, vagy vírusszaporítás után a felbomlott sejtek darabjainak

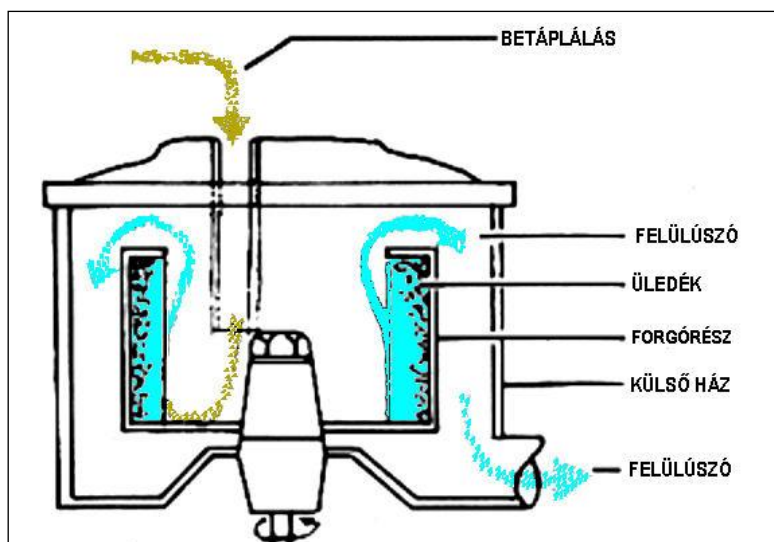
eltávolításánál. Feldolgozási kapacitása a többi centrifugához viszonyítva kicsi. Szakaszos működésű, a kiülepedett sejtek eltávolítása külön műveletben történik.



2.2.2.1.2. ábra: Csőcentrifuga (katalógusfotó)

2.2.2.2. Kosaras centrifuga (Imperforate basket centrifuge)

A forgórész kialakítása ennél is hengeres, de az arányok mások: nagyobb a dob átmérője, kisebb a hossza. Felületesen vizsgálva hasonlít a szűrőcentrifugához, de a dob fala nem perforált, és nincs belül szűrővászón. Ez a készülék ténylegesen centrifugál, nem szűr. A nagyobb átmérőjű és tömegű forgórészt kisebb fordulatszámra lehet felpörgetni, kisebb az elérhető g érték, de nagyobb a terhelhetősége, és az üledéktároló kapacitása.



2.2.2.2.1. ábra: Kosaras centrifuga

Működésének leírására ugyanazok az összefüggések használhatók, mint a csőcentrifugáknál.

2.2.2.3. Lemezes (disc stack) centrifuga

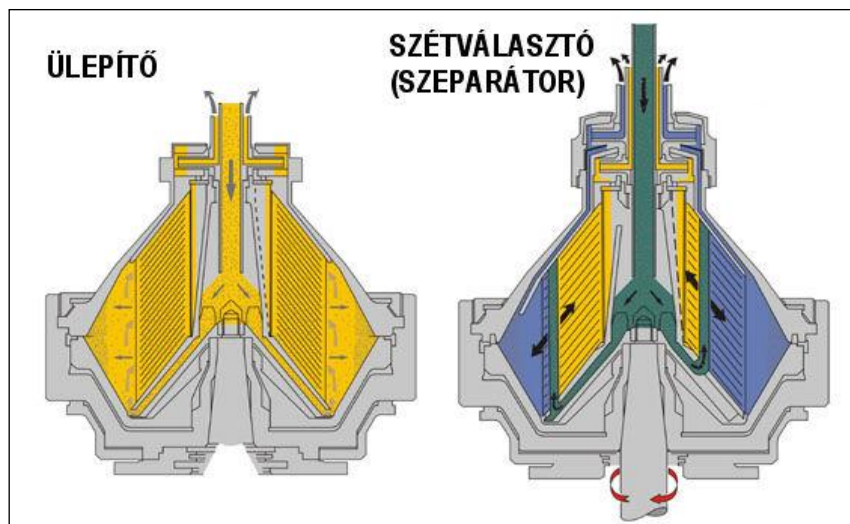
Már a klasszikus iszap-ülepítő medencéknél felismerték, hogy az ülepítés sebessége nagymértékben javítható, ha a zagyba ferdén párhuzamos lemezeket helyeznek el. A javulás oka az, hogy lecsökken az ülepedési úthossz. Az ülepedő részecskének nem kell megtennie a teljes utat a folyadék felszínétől a fenékig, hanem elegendő a két lemez közötti távolságon végighaladni. Így hamarabb eljut a ferde szilárd felülethez, azon lecsúszik a medence aljára, és ott összegyűlik.

Ugyanezt az elvet vették át a lemezes centrifugák építői is. A sugárirányban ülepedő részecskék útjába ferde fémlamezeket helyeztek, olyan sűrűn, hogy az ülepedési úthossz alig 1-2 mm-re csökkent. A ferde lemezek megfelelő forgástest a kúppalást, pontosabban csonka kúp palást alakú lemez. Ezekből több tucatnyit raknak egymásba olyan sűrűn, hogy köztük lévő távolság körülbelül azonos a lemez vastagságával – a lemezek közti távtartó csíkok ugyanolyan vastag anyagból készülnek, mint maguk a terelő elemek. Egy ilyen felépítésű centrifuga szétszerelését mutatja be a következő videó:



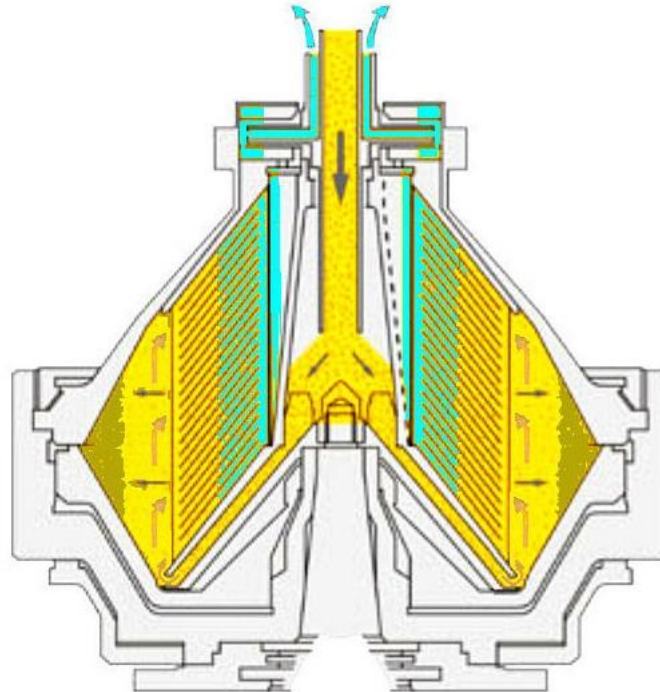
2.2.2.3.1. videó: Lemezes centrifuga szétszerelése

A lemezes centrifugák szakaszos és folytonos üzemre egyaránt kialakíthatók. Szakaszos működésnél az üledék a centrifuga legszélesebb részénél halmozódik fel, onnan időnként, ciklikusan el kell távolítani. Folyamatos üzemnél a besűrített szuszpenziót még folyékony állapotban folyamatosan kivezetik a készülékből. Ez utóbbi kialakítású berendezést eredetileg a vegyiparban két oldószer (könnyű és nehéz oldószer) extrakció utáni szétválasztására fejlesztették ki. A kétféle konstrukciót mutatja be az 2.2.2.3.1. ábra.



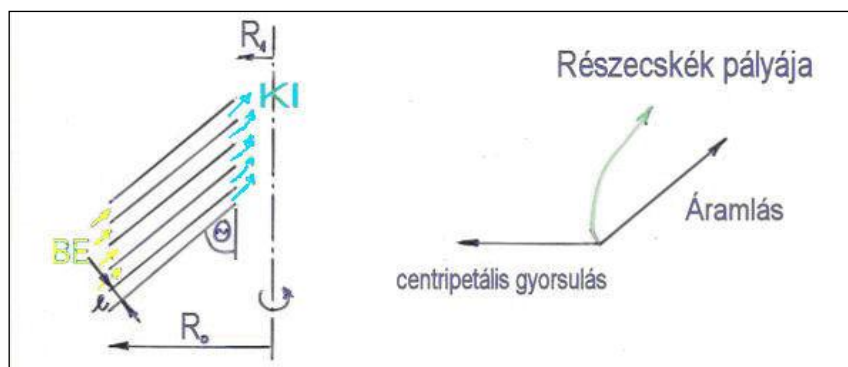
2.2.2.3.1. ábra: Ülepítő és szétválasztó centrifugák

A fázisok mozgását a lemezes centrifugában szemlélteti a 2.2.2.3.2. ábra.



2.2.2.3.2. ábra: A fázisok mozgása lemezes centrifugában

A részecske mozgásának matematikai leírásához külön célszerű vizsgálni a pályagörbét kialakító két sebességvektort. Mindkét komponens függvénye a sugárnak, így pontról pontra változó irányú és nagyságú eredő sebességet kapunk. A trajektória kialakulását az alábbi ábrán, illetve animáción mutatjuk be.



2.2.2.3.3. ábra: A részecskék mozgása lemezes centrifugában



2.2.2.3.1. animáció

A lemezek között, azokkal párhuzamosan áramló folyadék viszi magával a lebegő sejteket (konvekció), ennek sebessége nem állandó, mert a sugárral változik a keresztmetszet. Az anyammérlegből:

$$v_0 = \frac{W}{A} = \frac{W}{n2\pi rl}$$

ahol: n - a lemezek száma
 l - a lemezek távolsága

(Ez a felírás csak jó közelítés, mert nem veszi figyelembe a csatornán belüli sebességkülönbségeket, az áramlási profilt. Még turbulens, dugattyúszerű áramlásnál is a fal melletti határrétegben az áramlás sebessége nulla, és ez teszi lehetővé, hogy a falra kitapadt részecskék a folyadék áramlásával ellentétes irányba mozogjanak.)

A másik komponens a centrifugális erő és a közegellenállás által létrehozott állandósult ülepedési sebesség:

$$v_\omega = v_g \frac{r\omega^2}{g}$$

Ahol: v_g - a korábban bevezetett gravitációs ülepedési sebesség

A két vektor nem merőleges, az eredő kiszámításához rögzítenünk kell egy jól kezelhető koordináta-rendszert. Legyen ennek x tengelye párhuzamos a lemezekkel, azaz v_0 iránya. Ekkor v_ω x -komponense ellentétes irányú v_0 -lal, az eredő a kettő különbsége lesz:

$$\frac{dx}{dt} = v_0 - v_\omega \sin \theta$$

ha a lemezek elég közel vannak egymáshoz (l kicsi az R_0-R_1 csatornahosszhoz képest), akkor $v_0 \gg v_\omega$, azaz:

$$\frac{dx}{dt} \cong v_0 = \frac{W}{2\pi ln}$$

A lemezekre merőleges komponens:

$$\frac{dy}{dt} = v_\omega \cos \theta = v_g \frac{r\omega^2}{g} \cos \theta$$

a trajektória egyenlete:

$$\frac{dy}{dx} = \frac{2\pi ln v_g \omega^2}{Wg} r^2 \cos \theta$$

Figyelembe véve, hogy:

$$r = (R_0 - x \sin \theta)$$

A változót x -re váltva

$$\frac{dy}{dx} = \frac{2\pi ln v_g \omega^2}{Wg} (R_0 - x \sin \theta)^2 \cos \theta$$

az integrálás határfeltételei:

$$\int_0^l dy = \int_0^{(R_0-R_1)/\sin \theta} dx$$

A csőcentrifugához hasonlóan itt is az a feltétel, hogy a lemezek között áthaladó részecske az áthaladás ideje alatt tegyen meg l ülepedési utat, azaz érje el a külső lemez felületét és tapadjon rá.

Elvégezve az integrálást és W -re átrendezve a maximális terhelhetőség:

$$W = v_g \frac{2\pi\omega^2}{3g} (R_0^3 - R_1^3) \text{ctg } \theta = v_g \Sigma$$

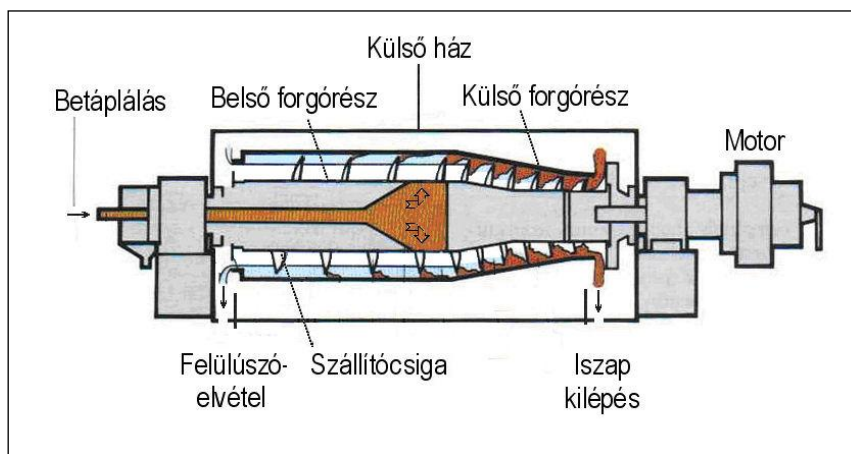
$$W = v_g * \Sigma$$

A kifejezést a csőcentrifugánál elvégzetthez hasonlóan két paraméterbe tömöríthetjük. Itt is v_g tartalmazza az anyagi rendszerre (a részecskére és a folyadékra) jellemző adatokat (szemcseméret, sűrűségek, viszkozitás), míg a Σ paraméter a berendezés jellemzőit (sugarak, fordulatszám, kúpszög, lemezek száma). Érdeemes megjegyezni, hogy a lemezek távolsága (l) a levezetés során kiesett ugyan, de n (a lemezek száma) formájában viszont szerepel az összefüggésben. Minél több lemezt helyezünk el az R_0 - R_1 távolságon, annál nagyobb lesz a centrifuga terhelhetősége.

Az ülepítő rendszerű lemezes centrifugák üritésére többféle megoldást dolgoztak ki. A lepény a készülék legszélesebb részén halmozódik föl. Ide az anyag kiengedésére nyitható réseket, fűvókákat építenek be, amelyek a felhalmozódó nehéz fázis megnövekedő nyomásának jelére pillanatszerűen nyílnak, és kiengedik az üledéket.

2.2.2.4. Dekanter centrifuga

Sűrű iszapok folyamatos leválasztására fejlesztették ki a dekanter centrifugákat. Beépített szállító csiga eleme folyamatosan kaparja a lerakódott iszapot és kitolja a készülékből (2.2.2.4.1. ábra).



2.2.2.4.1. ábra: Anyagáramlás a dekanter centrifugában

A betáplálás a tengelyben benyúló csövön át történik. A belső, perforált forgórészben eloszlik, majd a lyukakon keresztül kilép a külső forgórészbe. Itt történik meg az ülepítés, az iszap lerakódik a kúpos rotor falára, a felülúszó ezen belül helyezkedik el. A belső forgórészre szerelt szállítócsiga (2.2.2.4.2. ábra) annyira benyúlik a folyadékba, hogy majdnem eléri a külső rotor falát. A két forgórész fordulatszáma nem azonos (külön állítható), így a sebességkülönbség miatt a csiga a lerakódott iszapot a kúpos test szűkebb vége felé mozgatja. A kúpos felületen „fölfelé” kotort iszap kiemelkedik a folyadék felszíne alól, és a rotor végén kialakított nyílásokon keresztül kicsapódik a külső házba. A tiszta felülúszó a másik végen távozik. A külső forgórész pereme állítja be a folyadékszintet, a peremen átbukó felülúszó kicsapódik a házba, és elvezetik.



2.2.2.4.2. ábra: Dekanter centrifuga rotorja

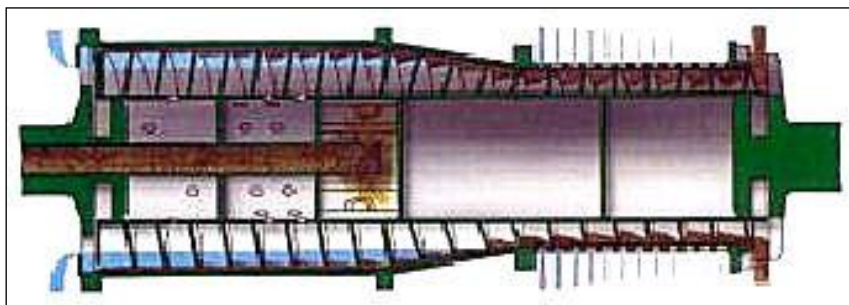
A dekantereknek több előnyös tulajdonsága is van más típusokkal szemben. Ilyen, hogy nagyon sűrű zagyok, iszapok is feldolgozhatók vele. A fordulatszámok megfelelő beállításával lehet az iszapok víztartalmát szabályozni, hosszabb tartózkodási idővel hatékonyan lehet vízteleníteni. Az iszap eltávolítása folyamatos, ténylegesen megvalósítható a folytonos üzem. Robosztus, léptéknövelhető készülékek, nagy teljesítményekre is építhetők.

Hátrányos tulajdonságaik közé tartozik, hogy a kettős, külön-külön szabályozható forgórész miatt gyártása magas műszaki színvonalat követel, emiatt kevés cég gyártja, és az árak magasak. Az elérhető G értékek nem túl magasak, ezért kisméretű sejtek (pl. baktériumok) leválasztására nem alkalmasak, inkább durvább zagyok, pl. eleveniszap feldolgozására használhatók.

A dekanterek széleskörű alkalmazhatóságát jelzi, hogy többféle változatot is kifejlesztettek különféle elválasztási célokra.

Szűréssel kombinált dekanter:

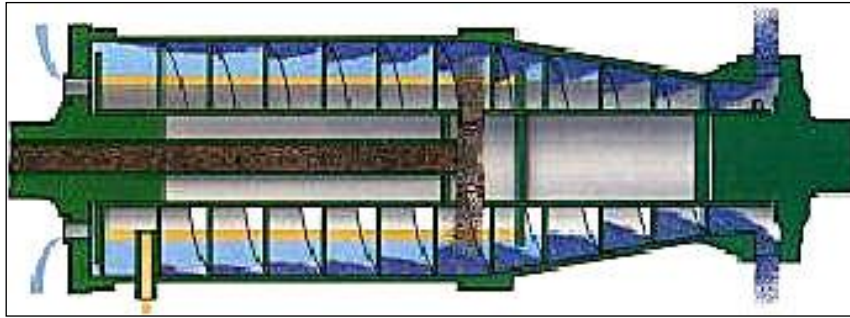
Az előzőekben bemutatott dekantert úgy egészítették ki, hogy a folyadékból kiemelt anyagot a kaparó egy hengeres szűrőfelületen viszi végig, eközben a víztartalma kipréselődik, jelentősen csökken.



2.2.2.4.3. ábra: Szűréssel kombinált dekanter

Háromfázisú dekanter:

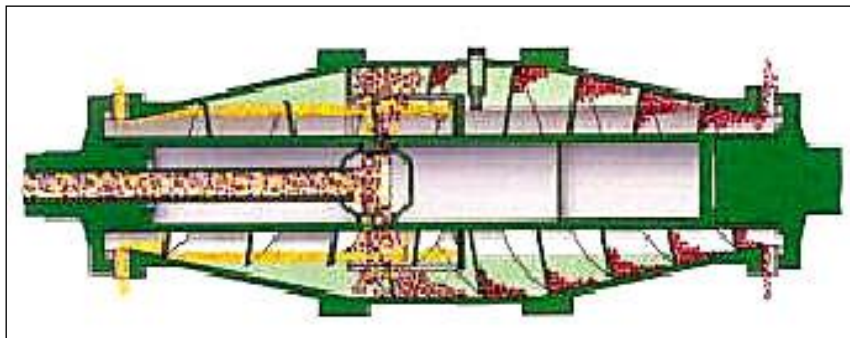
Szilárd anyagok elválasztása mellett két, nem elegyedő folyadékfázis elválasztására is alkalmas. A folyadékoldali elvételt úgy módosították, hogy a tiszta felülúszóból két szinten - az „aljáról” és a „te-tejéről” veszik el az oldószereket. A növény- és ásványolaj-ipari technológiákban van szerepe.



2.2.2.4.4. ábra: Háromfázisú dekanter

Trikanter, censor:

Ez is három fázis szétválasztására készült, de kétféle szilárd frakciót válogat szét a sűrűségkülönbség alapján (a folyadéknál nagyobb és kisebb sűrűségű, leülepedő és felúszó frakció). Ez még összetettebb felépítésű, két szállítócsigát is tartalmaz, amelyek a készülék két vége felé mozgatják a szilárd anyagokat (2.2.2.4.5. ábra). Az ábra jobb oldala ugyanúgy működik, mint az alaptípusnál. A másik csiga a bal oldalon a folyadék felszínén lebegő kisebb fajsúlyú anyagot mozgatja a bal oldali kúpos rész felé. Ott az anyag kiemelését, és kidobását a nehéz fázishoz hasonlóan oldják meg. Az elrendezés érdekessége, hogy a folyadék elvétele középen történik, egy benyúló szintszabályozó túlfolyó csövön keresztül.



2.2.2.4.5. ábra: Trikanter

A biomérnöki gyakorlatban nagy méretű trikantereket használnak a keményítő iparban, ahol a gabonák keményítő és fehérje frakcióinak szétválasztására alkalmazzák.

2.2.3. Léptéknövelés, összehasonlítás

A centrifugák technológiailag nem rugalmas berendezések. A mechanikai méretek (sugarak, hosszúságok, peremek, szögek) nem változtathatók. Két paraméter szabályozható, a fordulatszám és a betáplálási sebesség. A fordulatszámot viszont általában a maximális értéken tartják, valójában ez sem variábilis. A betáplálás maximális áramát a minden centrifuga típusra kiszámítottuk.

A laboratóriumi csöves centrifugában végrehajtott szakaszos kísérletek eredményeinek alapján nem lehet a folytonos ipari műveleteket tervezni. Ipari berendezések között viszont az adatok átvihető, a léptéknövelés megoldható. A gyakorlatban kétféle egyszerűsített számítási módot alkalmaznak:

Nem egzakt, de egyszerű számítási mód a

$$G \cdot t = \text{állandó}$$

kritérium használata. Azaz az alkalmazott $G = \omega^2 R_0/g$ érték és a centrifugálás idejének szorzata a különböző készülékekben legyen állandó.

Elméletileg megalapozott eljárás a

$$W = v_g \Sigma$$

formula használata, ahol

v_g – a gravitációs ülepedési sebesség (az anyagi rendszerre jellemző konstans)

Σ – a készülék paramétereiből számítható érték, minden készülékre más és más.

Ennek alapján akár eltérő típusú centrifugák terhelhetőségét is át lehet számítani.

A biológiai iparban a sejtek elválasztása mellett más mérettartományban is használatosak a centrifugák.

2.2.3.1. táblázat: Egyes biológiai rendszerek lecentrifugálásához szükséges Gt értékek (tájékoztató adatok):

	$G \cdot t$ (10^6) sec
Eukarióták, algák	0,3
Baktériumok	18
Feltárt sejtek	54
Ribo- és egyéb szómák	1100

Végezetül néhány centrifugatípus összehasonlítása:

2.2.3.2. táblázat: Centrifugatípusok összehasonlítása

Típus	Betáplálható lebegő anyag tartalom (%)	Terhelhetőség W_{max} (m^3/h)
Csőcentrifuga	0-1	150
Lemezes (szakaszos elvétel fűvókán)	0,01-10	200
Lemezes (szakaszos elvétel réseken)	0,2-20	100
Lemezes (folytonos elvétel fűvókán)	1-30	300
Dekanter (szállítócsiga)	5-80	200

2.3. Számítási feladatok

1. példa: *Streptomyces* sejtömeg (fonalas) szűrése antibiotikum fermentléből. A fermentléhez szűrősegédanyagot adva laboratóriumi teszt-szűrőn a következő adatokat kaptuk:

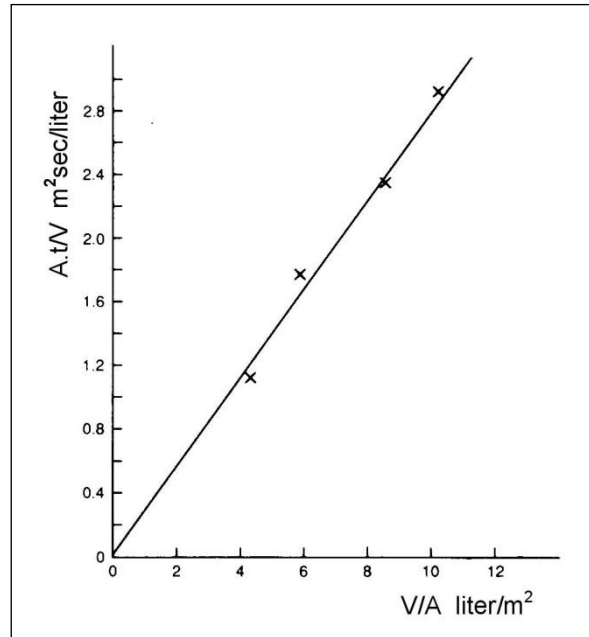
2.3.1. táblázat

szűrési idő (s)	szűrlettérfogat (l)
5	0,040
10	0,055
20	0,080
30	0,095

A szűrőlap felülete 1 dm^2 , a szűrlet viszkozitása 1.1 cP , a nyomásesés 520 Hgmm , a lé 15 kg/m^3 szilárd anyagot tartalmaz. Határozzuk meg a szűrőlap ellenállását (R_M) és a szilárd réteg fajlagos ellenállását (α)!

Megoldás:

Az alapegyenleteknek megfelelően ábrázoljuk az (At/V) értékeket a (V/A) függvényében (2.3.1. ábra):



2.3.1. ábra: Szűrési diagram

Az egyenes tengelymetszete gyakorlatilag zéró, tehát $R_M = 0$, azaz a szűrőlap csak elhanyagolható ellenállást képvisel.

Az egyenes meredeksége leolvasva

$$t \left(\frac{A}{V} \right)^2 = \frac{\mu \alpha \rho_0}{2 \Delta p} = 3,1 \cdot 10^5 \text{ sec/m}^2$$

Ebben az esetben az egyszerűsített, kvadratikus összefüggés használható:

$$\left(\frac{A}{V} \right)^2 \frac{2 \cdot \Delta p \cdot t}{\mu \cdot \rho_0} = \alpha$$

Behelyettesítve:

$$\alpha = 2,57 \cdot 10^{10} \text{ m/kg}$$

2. példa: Proteáz tartalmú fermentlé szűrése. A *Bacillus subtilis* mikroorganizmus által termelt mószszer-proteázt tartalmazó fermentléhez a sejtömeg 1,3-szorosának megfelelő mennyiségű Cellatom szűrősegédanyagot adtunk. Az így kapott lé szilárdanyag-tartalma 3,6 %, viszkozitása 6,6 cP. 5 cm átmérőjű Büchner tölcéséren vákuummal 100 ml levet 24 perc alatt sikerült leszűrni. Az elővizsgálatok szerint a szűrőlepeny összenyomható, s értéke 2/3. A feladat 3000 l előkezelt fermentlé szűrése keretes szűrőpréson. Ez 15 elemből áll, szűrőfelületük 3520 cm^2 . A szűrőelemek közti tér üres keretekkel növelhető, így a teljes anyagmennyiség egy menetben, szétszerelés nélkül leszűrhető. A szűrővásznon ellenállása a kialakuló réteghez képest elhanyagolható, a maximális megengedett nyomásesés 4,5 bar.

- Mennyi ideig tart a szűrés 3,5 bar nyomással?
- Mennyi ideig tart feleakkora nyomással?

Megoldás: Elsőként a szűrőréteg jellemzőit határozzuk meg. A feladat szerint a szűrővásznon ellenállása elhanyagolható, így az egyszerűbb másodfokú összefüggést használhatjuk:

$$t = \left[\frac{\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0}{2 \cdot \Delta p^{1-s}} \right] \cdot \left[\frac{V}{A} \right]^2$$

Az értékek behelyettesítésével:

$$\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0 = 2 \cdot 24 \cdot 60 \cdot \text{sec} \cdot (10^5 \text{ Pa})^{1/3} \left[\frac{5^2 \cdot \pi \cdot \text{cm}^2}{4 \cdot 100 \cdot \text{cm}^3} \right]^2$$

$$\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0 = 5,153 \cdot 10^7 \text{ sec} / \text{m}^2 (\text{Pa})^{1/3}$$

A kapott szokatlan dimenzió α' értelmezéséből következik.

a) A félüzemi folyamat adatait behelyettesítve:

$$t = \left(\frac{\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0}{2 \cdot \Delta p^{1-s}} \right) \cdot \left(\frac{V}{A} \right)^2 = \frac{5,153 \cdot 10^7 \text{ sec} \cdot \text{m}^2 (\text{Pa})^{1/3}}{2 \cdot (3,5 \cdot 10^5 \text{ Pa})^{1/3}} \left(\frac{3 \text{ m}^2}{2 \cdot 150,352 \text{ m}^2} \right)^2 = 29500 \text{ sec} \approx \underline{\underline{8,2 \text{ óra}}}$$

érdemes megjegyezni, hogy a megadott viszkozitás és koncentráció adatokat nem is használtuk fel a számításokban. Ezekre csak akkor van szükség, ha a $\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0$ szorzat helyett α' kifejezésére kényeszerülünk.

b) Ha a nyomáskülönbség a felére csökken, a fenti egyenlet behelyettesítéssel $t = 10,4$ órát ad. Az időszükséglet csak kismértékben növekszik (köbgyökös összefüggés).

3. példa: Deformálhatatlan szteroid kristályok szűrése. Kristályosítás után a szitoszterol kristályokat elhanyagolható ellenállású üvegszűrőn választották el. A laboratóriumi művelet adatai:

a kristályok tömege: 62 g
nyomáskülönbség: 1 bar
a szűrő átmérője: 5,1 cm
rétegvastagság: 12,5 cm
szűrési idő: 163 perc

A kristálytömeg gyakorlatilag összenyomhatatlan. A laboratóriumi teszt alapján számítsuk ki, hány szűrőelemre van szükség ($76 \cdot 76 \text{ cm}^2$ felület, 2,5 cm folyadéktér) a keretes szűrőpréshez, ha 63 kg szteroidot dolgozunk fel egy menetben. A betápláló szivattyú 0,7 bar nyomást hoz létre, a szűrőletet a szűrő után 4,5 m magasságba kell feladni.

Megoldás: Elsőként állapítsuk meg egy elem hasznos felületét:

$$A = 2 \cdot 76^2 = 11552 \text{ cm}^2 \approx 1,15 \text{ m}^2$$

(a keret mindkét oldala szűrőként viselkedik). A kiszűrt anyag számára keretenként

$$V = d \cdot A = 2,5 \cdot 76^2 = 14440 \text{ cm}^3 = 0,0144 \text{ m}^3$$

térfogat áll rendelkezésre. A szűrőréteg sűrűsége: $62 \text{ g} / 253,3 \text{ cm}^3 = 245 \text{ kg/m}^3$.

Az anyag teljes térfogata: $63 \text{ kg} / 245 \text{ kg/m}^3 = 0,257 \text{ m}^3$.

A feldolgozáshoz tehát minimálisan $0,257 \text{ m}^3 / 0,0144 \text{ m}^3 = 17,8 \approx 18$ keret szükséges, ennyi gyakorlatilag telítődik az adott anyagmennyiséggel.

Ez ideig csak az anyagmennyiséget állítottuk fel, tekintet nélkül a kísérleti eredményekre. A szűrési idő meghatározásánál az összenyomhatatlan szűrőrétegre és elhanyagolható alapelállásra felírt egy-szerűsített összefüggést alkalmazzuk.

$$t = \frac{\mu \cdot \alpha}{2 \cdot \rho_0 \cdot \Delta p} \cdot \frac{(\rho_0 \cdot V)^2}{A^2}$$

Mivel sem a szilárdanyag tartalom (ρ_0), sem a szűrlettérfogat nem adott, a kettő szorzatát (anyagmennyiség) írjuk be a négyzetes tagba. A számértékeket behelyettesítve:

$$\frac{\mu \cdot \alpha}{2 \cdot \rho_0} = \frac{163 \cdot 60 \text{ sec} \cdot 10^5 \text{ Pa} \cdot (0,25 \cdot \pi \cdot 5,08^2 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2)^2}{0,062^2 \text{ kg}^2} = 1,045 \cdot 10^6 \frac{\text{m}^3}{\text{kg} \cdot \text{sec}}$$

A szűrőrétegen fellépő nyomásesés számításához a szivattyú nyomásából le kell vonni a szűrő utáni folyadékoszlop ellennyomását:

$$\Delta p = p_{sz} - p_{hydr} = 0,7 - 0,45 = 0,25 \text{ bar} .$$

Ismét az előző összefüggést alkalmazva:

$$t = \frac{\mu \cdot \alpha}{2 \cdot \rho_0} \cdot \frac{(\rho_0 \cdot V)^2}{\Delta p \cdot A^2} = 1,045 \cdot 10^6 \frac{63 \text{ kg}^2}{2,5 \cdot 10^4 \text{ Pa} \cdot (18 \cdot 1,15 \cdot \text{m}^2)^2}$$

$$t = 387,2 \text{ sec} = 6,45 \text{ perc}$$

Bár a nyomásesés nagyon kicsi, a nagy felületen gyorsan átszalad a folyadék.

4. példa: A cél 15000 l/óra *Streptomyces* fermentlé (ld. 1. példa) leszűrése vákuum dobszűrőn. A berendezés ciklusideje 50 másodperc, felülete 37,2 m². A vákuumszivattyú 520 Hgmm nyomáskülönbséget képes fenntartani. Az előkezelt fermentléből összenyomhatatlan szűrőlepeny rakódik le, amelynek ellenállása $K = 2,9 \cdot 10^5 \text{ s/m}^2$ (az 1. példában kiszámított adat). A szűrőlepenyt egy százalék maradék szűrletig kell mosni, a becsült mosási hatékonyság 70 %, és az összes szűrlet 1 %-a (150 l) marad a leszűrt anyagban.

- Számítsuk ki a szükséges szűrési időt (bemerülő felület hányadot)!
- Határozzuk meg a mosási időt!

Megoldás: a) A szűrési idő általánosan felírva:

$$t_f = \frac{\mu \cdot \alpha' \cdot \rho_0}{2 \cdot (\Delta p)^{1-s}} \cdot \left[\frac{V_f}{A} \right]^2 ;$$

összenyomhatatlan szűrőlepeny esetén $s = 0$ és $\alpha = \alpha'$, így:

$$t_f = \frac{\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0}{2 \cdot (\Delta p)} \cdot \left[\frac{V_f}{A} \right]^2 .$$

Egy ciklusra $V_f = 15 \text{ m}^3 / 3600 \cdot 50 = 0,208 \text{ m}^3$ szűrlet jut. Ezt behelyettesítve:

$$\underline{\underline{t_f}} = 3,1 \cdot 10^5 \cdot \left[\frac{0,208 \text{ m}^3}{37,2 \text{ m}^2} \right]^2 = \underline{\underline{10 \text{ s}}}$$

A szűrési idő 10 s, az összes felület 20 %-a merül a fermentlébe.

b) A mosási lépésre:

$$r = (1 - \varepsilon)^n$$

$$0,01 = (1 - 0,7)^n$$

$$n = 3,8$$

Az egyszerűsített felírással:

$$\frac{t_m}{t_f} = 2 \cdot n \cdot f$$

$$\frac{t_m}{10} = 2 \cdot 3,8 \cdot 0,01$$

$$t_m = 0,76 \text{ s}$$

Tehát már egy másodperces mosás is bőven elegendő.

1. *Feladat:* Kisléptékű kísérletben acetonban szuszpendált aureomicin kristályokat szűrtek elhanyagolható ellenállású szűrőn. A kapott mérési adatok:

2.3.2. táblázat

t (s)	V (l)
10	0,500
20	0,707
30	0,866

A szűrő felülete 89 cm^2 , a nyomásesés $2,6 \text{ m}$ vízoszlopnak felel meg. A léptéknövelésnél 7300 l szuszpenziót kell egy $1,3 \text{ m}^2$ -es szűrőn leszűrni. A szuszpenzió koncentrációja labortesztnél $3,4 \text{ g/l}$ volt, az ipari tételé $2,8 \text{ g/l}$. Mennyi időbe telik a szűrés azonos nyomásesés mellett? (23 óra)

2. *Feladat:* A feladat 6% szilárdanyag tartalmú citromsavas lé szűrése vákuum dobszűrőn. A szűrőfelület $18,1 \text{ m}^2$, ellenállása elhanyagolható. A ciklusidő 75 s , a nyomáskülönbség közel 1 bar . A szűrőlepeny összenyomhatatlan, mosási hatékonysága 60% , az átteresztőképessége: $\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0 / 2 \cdot \Delta p = 86 \text{ s/cm}^2$. A szűrlet 7% -a marad a rétegben, ennek a citromsav-veszteségnek 90% -át mosással nyerik vissza. Kiszámítandó a szűrési és mosási idő $3 \text{ m}^3/\text{óra}$ betáplálásnál. (10 s, 3,5 s)

3. *Feladat:* A fermentlében kétféle részecske van: baktériumsejtek ($d = 0,7 \mu\text{m}$) és spórák ($d = 0,3 \mu\text{m}$). A két anyag szűrési ellenállása a mérések szerint a következő:

$$\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0 \text{ (baktérium)} = 1,3 \cdot 10^9 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{s}$$

$$\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0 \text{ (spóra)} = 1,3 \cdot 10^9 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{s}$$

Más kísérletek szerint a kevert szuszpenzióra:

$$\mu \cdot \alpha \cdot \rho_0 = \left(\sum \varphi_i \cdot \sqrt{\alpha_i \cdot \rho_{i0} \cdot \mu} \right)^2$$

ahol φ_i az adott frakció részaránya az i számú összes komponens között. A szűrendő fermentlében a sejtek kétharmada spórásodott, azaz a spórakoncentráció kétszerese a sejt koncentrációnak.

a) Mennyi időszükséges 850 l lé leszűréséhez, ha a szűrőanyag ellenállása elhanyagolható, a nyomáskülönbség 10^5 N/m^2 , a felület $4,0 \text{ m}^2$? (8 perc)

b) Gyorsabb lenne-e előbb a baktériumokat kiszűrni (olyan szűrővel, amely a spórákat átengedi) és azután külön a spórákat? (Nem)

4. *Feladat:* A töltött oszlopokon átáramló folyadék viselkedése hasonló a szűrőlepenyén átnyomott oldathoz. A legfontosabb különbség az, hogy a „szűrőlepeny vastagsága” (itt: a töltet magassága) állandó. Egy tripeptid adszorpciós tisztításánál jó eredményeket értek el laboratóriumban egy 15 cm magas, $2,5 \text{ cm}$ átmérőjű oszlopon, amelyben a töltet szemcsemérete $75 \mu\text{m}$, a lineáris oldatsebesség 30 cm/óra , a nyomásesés $3,75 \text{ bar}$. Állandó sebesség mellett a nyomásesés fordítottan arányos a részecskék felületével. A léptéknövelés során az ágy térfogatát ezerszeresen, a magasságát tízszeresen növelik.

- a) Azonos felületi sebesség mellett mekkora lesz a nyomásesés? (37,5 bar)
 b) A szivattyú csak 7,5 bar nyomást képes biztosítani. Milyen szemcseméretű töltetet kell alkalmazni ilyen nyomáseséshez? (170 μm)

5. Feladat: A fermentáció során a keletkező sejtömeg on-line mérése igen nehéz feladat. Egy szűrő-mintavevőt próbáltak ki *Penicillium chrysogenum* fermentáció nyomon követésére. A szűrletet automatikusan gyűjtötték és mérték, ebből becsülték a sejt koncentrációt. Az adott szűrletterfogathoz tartozó időket az 2.3.3. táblázat tünteti fel.

2.3.3. táblázat: Szűrletterfogat és szűrési idők a fermentáció során

Szűrletterfogat (cm^2)	A tenyészet kora (óra)					
	45	69	92	130	154	226
10	0,078	0,12	0,17	0,25	0,34	0,81
20	0,14	0,20	0,30	0,43	0,61	1,23
30	0,20	0,29	0,42	0,59	0,83	-

- a) Kiszámítandó a sejtömeg relatív változása az időfüggvényében.
 b) Más időpontokban a szűrés nyomáskülönbségét változtatták, és a 30 cm^3 szűrlet nyeréséhez szükséges időtartamot mérték (2.3.4. táblázat). Összenyomható-e a lepény, vagy sem? ($s = 0,5$)

2.3.4. táblázat: Szűrési idők 30 cm^3 szűrletnél

Nyomáskülönbség Hgcm	Szűrési idő, s			
	A tenyészet kora, óra			
	70	86	106	134
10	163	271	433	600
20	113	191	305	416
30	98	163	235	326
40	75	138	208	282

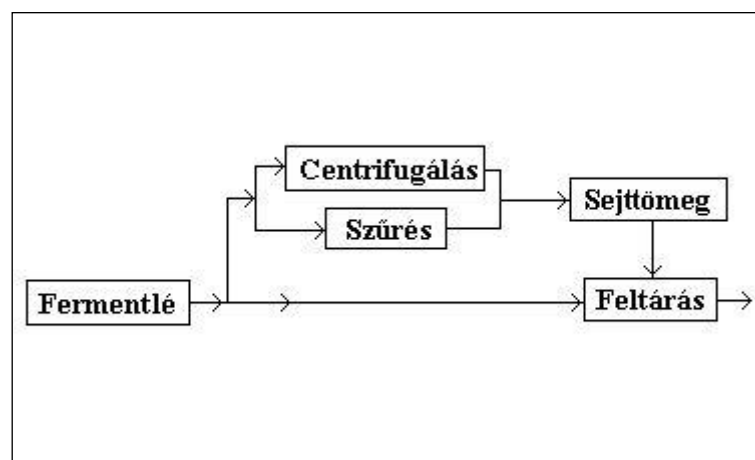
2.4. Ajánlott irodalom

- Bennett, C. O., Myers, J. E.: Momentum, Heat and Mass Transfer 2nd ed. N.Y. McGraw-Hill 1974
 Cheremisinoff, N. P., Azbel, D. S.: Liquid Filtration, London, Butterworth, 1983
 Jahreis, C. A.: Filtration: advances and guidelines, Chem.Eng. 83(4), 80 (1976)
 Wakeman, R. J.: Progress in Filtration and Separation, NY Elsevier, 1982
 Wiesmann, U., Binder, H.: Adv. Biochem. Eng. 24, 119 (1982)
 Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, W.S.: Bioseparations, Wiley-Interscience (1988)

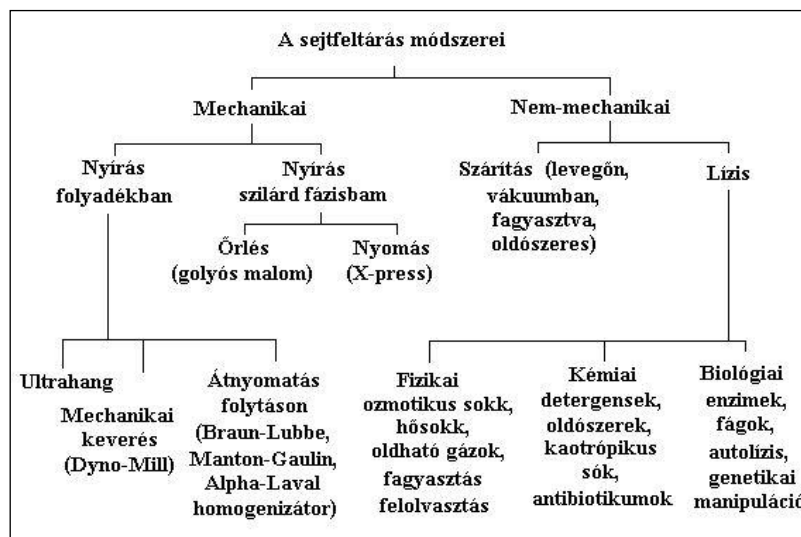
3. SEJTFELTÁRÁS

3.1. Bevezetés

A mikrobasejtek feltárása hozzásegítette a tudományt a sejtek összetételének és szerkezetének megértéséhez, az életfolyamatok kapcsolatainak megismeréséhez. A sejtek genetikai információjának manipulációs lehetőségei új termékeket és ezen keresztül új iparágakat hoztak létre. Bár ezen termékek felhasználása sokféle lehet, pl. orvosi diagnosztika vagy terápia, katalizátor-, alap- vagy segédanyag, vegyipari vagy élelmiszeripari célra, de majdnem minden esetben izolált és tisztított formában van rájuk szükség. A termékek nagy része szerencsére extracelluláris, de sokuk a sejten belül helyezkedik el, ami azt jelenti, hogy a feldolgozási technológia egyik első lépéseként a sejteket fel kell tární. A feltárás műveletét végezhetjük a teljes fermentléből vagy a szűréssel, centrifugálással leválasztott sejttömegeből (3.1.1. ábra).



3.1.1. ábra: A sejtfeltárás helye a feldolgozási technológiában



3.1.2. ábra: A sejtfeltárás módszereinek „családfája”

A sejtfeltárásnak nincs egy standardizált, általánosan használt módszere, sokféle technikát alkalmaznak. E módszereket sokféleképpen lehet csoportosítani elvük vagy gyakorlati alkalmazásuk szerint. A lehetséges eljárások „családfáját” a 3.1.2. ábra mutatja be.

A következőkben eszerint kerülnek bemutatásra a különböző műveletek. A sejtfeltárás megközelíthető empirikus módon is, de a feltárás célpontjának, a sejtfal szerkezetének ismerete hatékonyabb módszerek kialakításához vezethet. Ezért előbb néhány mikrotípus jellegzetes sejt-falszerkezetét tekintjük át.

3.2. A sejtfaik összetétele és szerkezete

A mikroorganizmus feltáráshoz a sejtet körülvevő burkot kell elroncsolni olyan mértékben, hogy az ne válassza el a sejt beltartalmát a külső folyadéktól. A feltáráshoz kerülő sejtek külső burka általában két rétegből áll, a citoplazmamembránból és az ezt kívülről határoló, támasztó merev sejtfaiból. A citoplazmamembrán elsősorban lipidekből és fehérjékből áll, funkciója az, hogy fenntartja a koncentrációkülönbséget a sejt belső és külső tere között, specifikus, szelektív és egyes esetekben irreverzibilis transzportot működtet. A sejtfa nélkül a membrán nagyon érzékeny az ozmotikus sokkra (pl. protoplasztok), ezért önmagában elhanyagolható a feltáráshoz szempontjából.

Pusztán fiziko-kémiai vizsgálatra vizsgálva a sejteket szembevetve, hogy jelentős koncentrációkülönbség van a belső és külső tér között. Ez nem egyenlítődik ki, részben a sejtfa félíg áteresztő jellege miatt, részben pedig az állandóan működő aktív transzportmechanizmusok következtében. A koncentrációkülönbség pedig jelentős ozmózisnyomást okoz, amely szétszakítani igyekszik a sejt burkát. A „fiziológiai” sóoldat (9 g/l-es NaCl-oldat) ozmózisnyomása desztillált vízzel szemben körülbelül 8 bar. A mikroorganizmusok általában ennél többet, 0,7–0,8 mólos koncentrációkülönbséget, azaz kb. 20 barnyi belső nyomást is elviselnek. Ezen a téren is akadnak extrém ellenállóképességű (ozmofílok) fajok, ezek akár 60–100 bart is tolerálnak. Ha az átmérő/falvastagság arányt állandó értéken tartva gondolatban felnagyítjuk ezt a „nyomástartó edényt”, makroszkopikus szerkezeti anyagaink közül kevés viselné el ezt az igénybevételt, minimum vasbetont vagy fémeket kellene alkalmaznunk. Ezt az ellenálló burkolatot kell a sejtfeltáráshoz során áttörni.

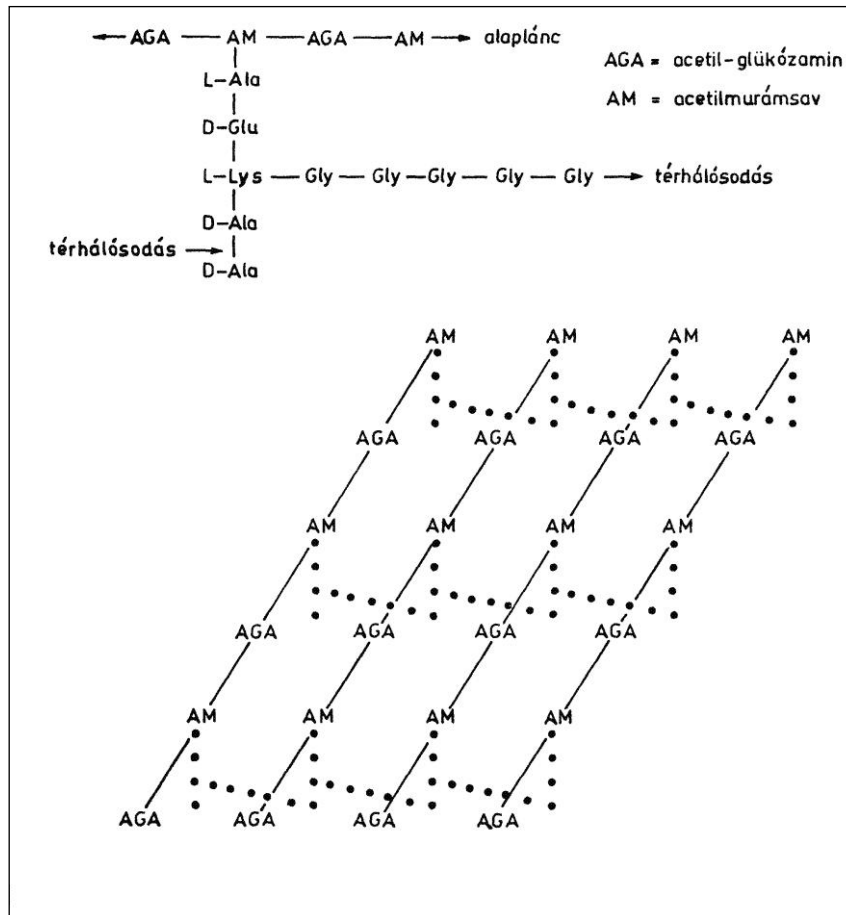
Mivel a főfeladatot a sejtfa roncsolása jelenti, ezért ennek összetételét és szerkezetét érdemes tanulmányozni a feltáráshoz. Az összetétel és szerkezet viszont genetikai és környezeti tényezőktől egyaránt függ, és részleteiben igen nagy változatosságot mutat. Fő szerkezeti tulajdonságait tekintve viszont az egyes mikroorganizmus-csoportokon belül hasonló. Így a sejtfa általános jellemzőit a mikrobák fajtái szerint tekintjük át (Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, élesztők és egyéb gombák).

3.2.1. A baktériumok sejtfaia

A baktériumok sejtfaia anyagát és jellemzőit nagyon sokan vizsgálták, mióta először sikerült a roncsoló sejtfeltáráshoz a falrészecskéket elkülöníteni a citoplazmától. A baktériumsejtek nagy többségének merev sejtfaia, eltekintve a mikoplazmáktól és a halofílok törzsektől, peptidoglikánból áll. Ez lineáris szénhidrátláncokból épül fel, amelyeket rövid peptidok keresztkötései térhálósítanak. A peptidoglikán így egyetlen folyamatos, alaktartó és ellenálló molekulahálót alkot a sejt körül.

A szénhidrátláncokat szinte kizárólag a felváltva ismétlődő N-acetil-glükózamin és N-acetil-murámsav egységek alkotják, amelyek β -(1-4) kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Az N-acetil-murámsav oldallánca a különböző fajoknál változhat, de ez nem befolyásolja a molekula térbeli szerveződését. (Az N-acetil-murámsav tejsav csoportjához kapcsolódnak az összekötő peptidok.)

Az N-acetil-murámsav laktill csoportjainak legalább egy részéhez peptid egységek kapcsolódnak. Az egymás mellett fekvő glükánláncok peptidfüggelékai két irányban is keresztkötést létesíthetnek (3.2.1.1. ábra).

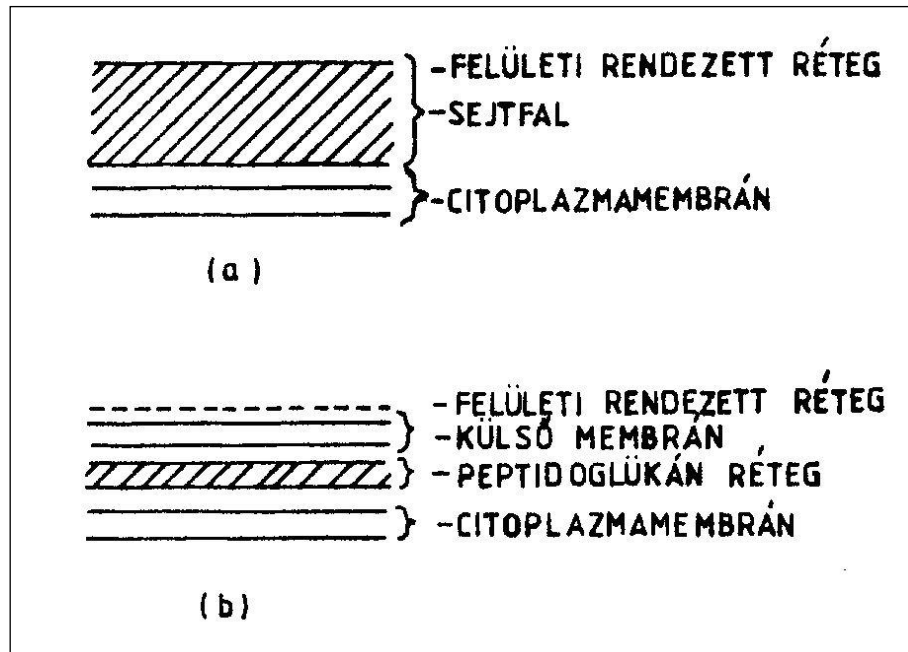


3.2.1.1. ábra: A peptidoglükán polimer felépítése és térhálósodása

A peptidlánc elágazását a bifunkciós lizin vagy más fajoknál diamino-pimelinsav molekulák teszik lehetővé. A keresztkötések gyakorisága lényegesen változó a különböző organizmusoknál. Az *Escherichia coli*-nál a peptidoldallancok kb. 50%-a nem kapcsolódik sehová, és a másik felük is csak egy irányban kötött. A *Lactobacillus acidophilus*-ban viszont a peptidek 90%-a kötésben van, és kb. 30%-a két irányban is kapcsolódik.

Bár csaknem valamennyi baktérium tartalmazza a peptidoglükán alapvázat, igen nagy a különbség a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok falának szerkezete között. A Gram-pozitív baktériumok sejtfala viszonylag vastag (15–50 nm), 40–90% peptidoglükánt tartalmaz, míg a fennmaradó rész elsősorban poliszacharidokból és teichoinsavakból áll. Néhány faj külső felületét szabályosan ismétlődő fehérjerészecskék borítják. A Gram-negatív baktériumok sejtfalában a peptidoglükán réteg sokkal vékonyabb (1,5–2 nm), és a külső felületen is található egy biológiai membrán, amely nagyon hasonlít a belső citoplazmamembránhoz. A térhálósodott réteghez kovalens kötéssel lipoproteinek is kapcsolódnak. A Gram-negatív organizmusok falában lényegesen több a lipidjellegű anyag (15-20%). Néhány fajnál itt is megfigyelhetők a külső felszín borító szabályos elhelyezkedésű fehérjék (3.2.1.2. ábra).

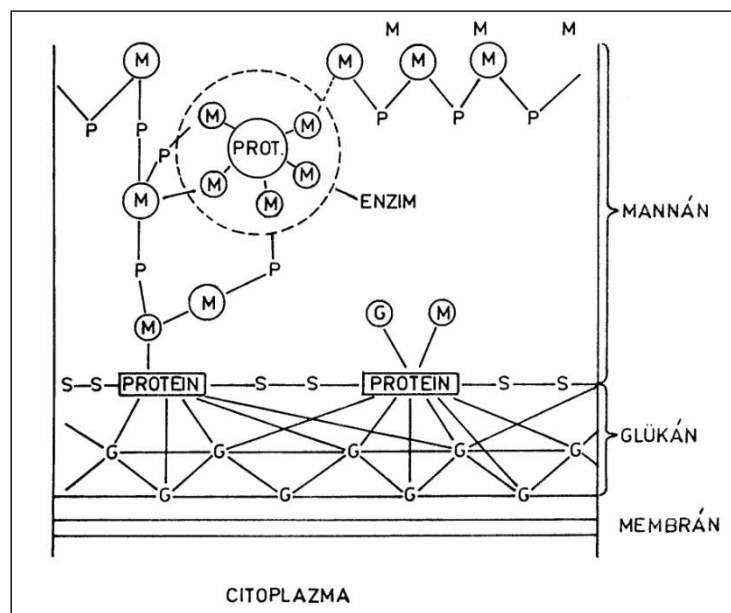
Ismereteink jelenlegi szintjén úgy tűnik, hogy a sejtfeltárásnál ennek a peptidoglükán hálózatnak a szétroncsolása jelenti a legnagyobb problémát. A térhálósított réteg vastagsága és erőssége a peptidláncok gyakoriságától, a keresztkötések gyakoriságától és a kapcsolódás egy- vagy kétirányúságától függ.



3.2.1.2. ábra: Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfalának vázlatos keresztmetszeti képe

3.2.2. Az élesztők sejtfa

Az élesztők falának szerkezetét jóval nehezebb felderíteni, mint a baktériumokét. Az alapvető építőelemeket (glükánok, mannánok, proteinek) azonosították, de összekapcsolódásuk módja, a szerkezet csak részben ismert. Az egész szerkezet valamivel vastagabb, mint a Gram-pozitív organizmusoknál. Pékélesztőnél kb. 70 nm-es falvastagságot írtak le, amely növekedett a sejt korával. Bár a szerkezet még nem teljesen ismert, de feltételezhető, hogy a burok mért vastagságnak csak egy része a merev és ellenálló sejtfa.



3.2.2.1. ábra: Az élesztősejtfa vázlatos felépítése: külső réteg foszfodiészter kötésekkel (P) összekötött mannánt (M) tartalmaz, a belső rész keresztkötésekkel rögzített glükánból (G) áll.

A bakteriális sejtfalakkal ellentétben, amelyek jellemzően peptidoglükánból állnak, az élesztők sejtfalában a fő komponensek a glükánok, mannánok és fehérjék. Ezekben a csoportokon belül az egyes komponensek szerkezete fajoként változik. Széles körű vizsgálatok alapján azonban megállapítható, hogy a glükánok helyenként összekötött glükózláncokból állnak, amelyekben a β -(1-3) és a β -(1-6) kötések jellemzőek. A pékélesztő mannánjainak alaplánc α -(1-6) kötésekkel kapcsolódó mannóz-egységekből áll, amelyhez rövid oldalláncok kapcsolódnak többnyire α -(1-2), ritkábban α -(1-3) kötésekkel. A mannánban foszfodiészter hidak is előfordulnak. A fehérjék az élesztősejtfalban mannán komplex formájában találhatóak. Többségük enzim és nem szerkezetalkotó elem, nem strukturális fehérje.

A kísérleti eredmények többségével összhangban van az 3.2.2.1. ábrán bemutatott modell.

A sejtfal legbelső rétegét glükánszálak alkotják, ez adja a sejt merevségét és alakját. A szálakat egy glikoproteinréteg fedi, e fölött pedig egy lazább, 1,6-foszfodiészter kötésekkel rögzített mannánháló helyezkedik el. Ebben a mannán hálóban helyezkednek el a mannán-enzim komplexek, amelyek kovalens kötésekkel vagy gyengébb kölcsönhatásokkal rögzülnek.

Más elképzelések szerint a mannán-enzim komplexek belül, a citoplazmamembrán és a szénhidrátréteg között helyezkednek el. Ez a különbség nem érinti a merevítő réteg leírását. A bakteriális sejtfalhoz hasonlóan az élesztőknél is a sejtfeltárás nehézségét az határozza meg, hogy milyen vastag és mennyi kereszt-kötést tartalmaz a szerkezeti réteg.

3.2.3. A fonalas gombák sejtfala

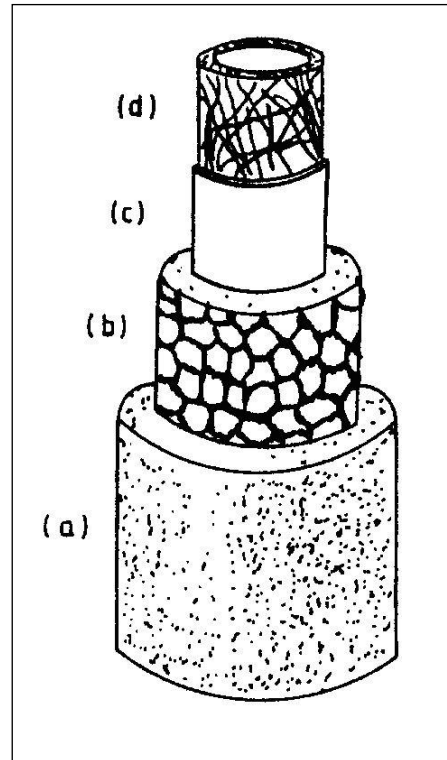
A további gombák sejtfaláról általános érvényű szabályokat nem mondhatunk, mivel egyrészt az egyes fajoknál az összetételben és szerkezetben jelentősek a különbségek, másrészt túl kevés fajról áll rendelkezésre részletes leírás ahhoz, hogy általánosítani lehessen. Ha viszont csak a sejtfeltárás szempontjából nézzük, néhány általános megállapítást tehetünk. Szűkítve a vizsgálati területet csak a hifafonalakról lesz szó, mivel egyrészt ezeket tanulmányozták behatóan, másrészt ipari szempontból ezek jelentősek.

A legtöbb gombában a sejtfal elsősorban poliszacharidokból áll, lényegesen kevesebb fehérjét és lipidet tartalmaz. Az aránylag kevés törzsen elvégzett részletes elemzések azt mutatják, hogy az egyes fajok között is nagyok a különbségek. A baktériumokhoz és az élesztőkhöz hasonlóan az alaktartás és a szilárdság a fal poliszacharidjain múlik. A poliszacharidok az egyes törzsekben láthatóan páronként fordulnak elő (pl. kitin és glükán), és ennek alapján taxonómiai osztályozás is lehetséges (3.2.3.1. táblázat).

3.2.3.1. táblázat: Sejtfalszerkezet és gombarendszertan

Kulcs-poliszacharidok	Taxonómiai csoport
cellulóz, glikogén	Acrasiomycetes
cellulóz, β -glükán	Oomycetes: Saprolegniales, Peronosporales, Leptomitales (Rhipidiaceae)
cellulóz, kitin, β -glükán	Oomycetes: Leptomitaceae
cellulóz, kitin	Hyphochytridiomycetes
kitozán, kitin	Zygomycetes
kitin, β -glükán	Chytridiomycetes, Ascomycetes kivéve: Hemiascomycetidae, Basidiomycetes kivéve: Sporobolomycetaceae
mannán, β -glükán	Hemiascomycetidae
mannán, kitin	Sporobolomycetaceae, Rhodotorulaceae

A legnagyobb fajszerű kategória a falában kitint és glükánt tartalmaz. A kitin-glükán csoportba tartozó gombák fala az élesztőkhöz hasonlóan rétegekből áll. Az alaposan tanulmányozott *Neurospora crassa* falában három különböző típusú polimer található: glükán, túlnyomórészt β -(1-3) és kisebb arányban β -(1-6) kötésekkel, mikrofibrilláris szerkezetű kitin, és egyfajta glikoprotein. Az érett sejtfalban ezek a komponensek koncentrikus rétegeket alkotnak (3.2.3.1. ábra).



3.2.3.1. ábra: A *Neurospora crassa* sejtfalának vázlatos szerkezete.

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

A fal a hifák csúcsánál vékonyabb, és a glikoprotein ezen a részen nem tömörül jól észlelhető rétegbe.

Bár az összetétel más, a réteges szerkezet bizonyított a *Schizophyllum commune* sejtfalában is. A fal szárazanyagtartalmának 70%-át három különböző polimer alkotja: (S)-glükán, (R)-glükán és kitin. Az (S)-glükán α -(1-3) kötéseket tartalmaz, ez képezi a külső réteget. Az (R)-glükán erősen térhálósodott polimer α -(1-3) és α -(1-6) kötésekkel, ez a kitinszállakkal komplex kötésben alkotja a belső réteget.

A gombafonalak falának szilárdságát a baktériumokhoz és az élesztőkhöz hasonlóan a térhálós molekulaháló adja. Ehhez járul az, hogy számos gomba sejtfa kitinből vagy cellulózból álló fonalas szerkezetű elemeket is tartalmaz, amelyek „kompozitként” tovább növelik a fal szilárdságát.

3.2.4. A falszerkezet és a feltárás kapcsolata

A mikrobiális sejtek falának alakja és szilárdsága a szerkezeti polimerektől, azok egymás közötti és más molekulákkal alkotott keresztkötéseitől függ. A sejt feltárásához le kell győzni a kovalens kötésekkel rögzített molekulahálózat ellenállását. A fal tulajdonságait nemcsak a genetikai információ határozza meg, hanem függ a tenyésztés körülményeitől, sőt a gombáknál a fejlődési fázisoktól is. A befolyásoló környezeti tényezők közé tartozik a keverés nyíró hatása is, egyes gombáknál a fal szerkezete változik a fermentor kevertetésének függvényében.

A mechanikai feltárásnál a sejt mérete és alakja mellett a szerkezeti polimerek térhálósodási foka befolyásolja a feltárás nehézségét. Elvileg a sejtfa szerkezetét befolyásolni lehetne a genetikai információ módosításával, illetve a környezeti paraméterek megváltoztatásával, de jelenleg nincs elegendő információ ahhoz, hogy ilyen módon könnyítsük meg a feltárást. Az eddig összegyűlt kutatási eredmények nem teszik lehetővé, hogy elméleti úton megállapíthassuk az egyes mikroorganizmusok relatív ellenállóképességét a mechanikai feltárási műveletekben.

A sejtfa kémiai összetételének és szerkezetének ismerete elsősorban az enzimes vagy kémiai úton végrehajtott lízisnél fontos. Mivel a szerkezeti molekulahálót külső védőburok is bevonhatja, mind a

szerkezeti, mind az egyéb komponensek ismerete hasznos a megfelelő enzimes vagy kémiai módszerek kiválasztásánál. A gyakorlatban sokszor fordított a megközelítés: a különféle lítikus enzimekkel és vegyi anyagokkal elért eredményekből következtetnek a sejtfa szerkezetére.

3.3. A feltárás vizsgálata

Ha a mikrobajelzők összetevőinek izolálását mennyiségileg is le akarjuk írni, a sejtek roncsolódásának mértékét meghatározó pontos analitikai módszerekre van szükség. Az elroncsolt sejtek részarányát meghatározhatjuk közvetlenül, az ép sejtek számának vagy tömegének mérésével, avagy közvetett módon, valamely kiszabaduló sejtalkotórész koncentrációjának mérésével. A közvetlen módszerekre mindig szükség van a többi módszer standardizálásához és kalibrálásához, a közvetett módszerek viszont általában pontosabbak, szélesebb körben alkalmazhatók és kevésbé munka- és időigényesek.

3.3.1. Közvetlen mérési módszerek

Az ép sejteket közvetlenül mikroszkóposan vagy elektronikus részecskeszámlálóval számlálhatjuk. A feltárás előtti sejtszám mérésére mindkét módszer általánosan alkalmas, de a feltárás során kibocsátott anyagok (DNS és más polimerek) később már zavarhatják a meghatározásokat. Az ép és a roncsolt sejtek mikroszkópos számlálásához differenciálfestést alkalmazhatunk. A roncsolt Gram-pozitív baktériumok gyakran Gram-negatívként festődnek, és élesztőknél a Gram-festés után az ép sejtek sötétpirosak, míg a sérültek halványvörösek lesznek.

Sok minta esetén a mikroszkópos számlálás egyhangú és időrabló módszer. Az élesztők feltárásának mértéke elektronikus részecskeszámlálóval is mérhető, de a sejttörmelék nagyobb darabjai megzavarhatják az érzékelőt. Ráadásul a számlálók, amelyeket általában vérszámológépekre fejlesztettek ki, nem elég érzékenyek a jóval kisebb méretű baktériumok észleléséhez.

3.3.2. Közvetett módszerek

A roncsolt sejtek arányát közvetett úton mérő módszerek azon alapulnak, hogy a sejtek szuszpendálására használt közegben a feltárás hatására megnövekedik a citoplazma-eredetű anyagok koncentrációja, azaz oldható fehérje vagy enzimaktivitás mérésén. Kis koncentrációjú sejtuszpenziók esetén egyszerűen a vizes fázis fehérjekoncentrációját vagy aktivitását hasonlítják össze a 100%-osan feltárt mintáéval. Enzimaktivitások mérése esetén ügyelni kell arra is, hogy az enzimkinetika más és más lehet az érintetlen sejt, a durva homogenizátum és a tisztított enzim esetében.

Töményebb szuszpenzióknál a pontosabb meghatározások érdekében korrekciót kell alkalmazni, amely figyelembe veszi a vizes fázis térfogatának növekedését, amit a sejtek beltartalmának kiszabadulása okoz. Ez az eljárás sem megfelelő olyan minták esetében, amelyekben a mért komponens egy része denaturálódik a feltárás károsító hatására (pl. hő sokk). Ilyen esetekben anyagmérlegeken alapuló módszereket használnak.

3.3.2.1. Hígítási módszer

Ha a denaturálódás veszélye nem fenyeget, a feltárás mértékét az oldható fehérje mérésével követhetjük nyomon. Ehhez a feltárt minta tiszta (centrifugált) felülúszójából (c_f) és egy hígított mintából (c_h) kell a fehérje koncentrációját megmérni. A feltárás mértékét, azaz a sejtekből kiszabadult vizes fázis arányát a összes sejteken belüli folyadékhoz képest (= F_d – értéke a feltárás előrehaladtával 0 és 1 között változik) a Hetherington-egyenlettel számíthatjuk:

$$V_{minta} = V_{ép\ sejt} + V_{kiszabadult\ víz} \quad (1)$$

$$F_d = \frac{V_{kiszabadult\ víz}}{V_{minta}} \quad (2)$$

A hígítás anyagmérlege:

$$V_{kiszabadult\ víz} \cdot c_{kiszabadult\ víz} = (V_{kiszabadult\ víz} + V_{hígítás}) c_{hígított} \quad (3)$$

Átrendezve:

$$V_{\text{kiszabadult víz}} = V_{\text{hígítás}} \frac{C_{\text{hígított}}}{C_{\text{kiszabadult víz}} - C_{\text{hígított}}} \quad (4)$$

A mintatérfigattal elosztva:

$$F_d = \frac{V_{\text{hígítás}}}{V_{\text{minta}}} \frac{C_{\text{hígított}}}{C_{\text{kiszabadult víz}} - C_{\text{hígított}}} \quad (5)$$

Az oldható fehérjék koncentrációját pl. valamely fotometriás módszerrel (Folin, Lowry, Bradford) mérhetjük.

A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy a felülúszó részaránya (F_d) általában független a hígítás mértékétől, azaz a fehérjék oldhatósága nem változik a hígítás következtében. Kevésbé kíméletes feltárási módszerek alkalmazásánál viszont előfordul oldhatóságváltozás, ezért alkalmazás előtt célszerű ellenőrizni a metodikát.

3.3.2.2. Anyagmérleg módszer

A másik lehetséges módszer a feltárási mértékének meghatározására az anyagmérlegek felírása. Feltételezzük, hogy feltárt minta vizes fázis frakciója (F) kifejezhető a feltárási előtti vizes fázis (F_0) és a feltárási során kiszabadult víz összegeként.

$$F = F_0 + (1 - F_0) M R \frac{\rho_c}{\rho_{aq}} \quad (6)$$

ahol $(1 - F_0)$ a sejtek térfogata a kiindulási állapotban, M a sejtek belső folyadéktartalma, R a feltárt sejtek részaránya, ρ_c a sejtek sűrűsége, ρ_{aq} a szuszpendáló vizes fázis sűrűsége. A (6) egyenletben feltételeztük, hogy csak a sejtek belső folyadéktartalma növeli a vizes fázis térfogatát.

Egy másik, független anyagmérleg állítható fel a nitrogéntartalomra, amely szintén tartalmazza az F és R paramétereket. Például Kjeldahl módszerével mérve a sejtek (c_{NS}) és a feltárt minta felülúszójának nitrogéntartalmát (c_N) felírhatjuk

$$R = \frac{F c_N}{x c_{NS}} \quad (7)$$

ahol x a minta kiindulási sejttartalma, $R \cdot x$ a feltárt sejtek mennyisége, $R \cdot x \cdot c_{NS}$ pedig a feltárt sejtekből kiszabadult nitrogén mennyisége.

A (6) és (7) egyenletből F -et kiejtve

$$R = \frac{F_0 c_N}{c_{NS} x - (1 - F_0) c_N M \frac{\rho_c}{\rho_{aq}}} \quad (8)$$

Mivel az anyagmérlegek felállításánál néhány feltételezésből indultunk ki, ez az eljárás a feltárási mértékének meghatározására kevésbé pontos, mint a hígítási módszer. Ezzel együtt jó közelítésként használható olyan esetekben, amikor a hígítási módszer nem alkalmazható.

3.3.2.3. Vezetőképesség-mérés

Sok esetben a feltárási mértékének gyors, közelítő meghatározására a vezetőképesség mérésén alapuló módszerek is alkalmasak. A módszer alapja, hogy a feltárt sejtek citoplazmájából a vizes fázisba kerülő ionos anyagok megváltoztatják a folyadék vezetőképességét. Bizonyos tartományban a vezetőképesség lineárisan növekszik a feltárási mértékével. A módszert kalibrálni kell más meghatározásokkal, mert csak relatív értékeket ad. Más szempontból nehéz a standardizálás, mert a mérési eredmények erősen függenek a mikroorganizmusok típusától és olyan környezeti paraméterektől, mint a sejtkoncentráció, a hőmérséklet és az elektrolitkoncentráció. Így a módszer

csak akkor látszik használhatónak, ha a feltárás mértékén kívül minden paramétert állandó értéken tartanak.

3.3.3. A sejtfeltárás kinetikája

A sejtfeltárást legegyszerűbben elsőrendű kinetikával szokták modellezni. Eszerint a fehérje kiszabadulása a sejtekből a következő egyenlettel írható le:

$$\frac{dP_i}{dt} = -kP_i \quad (9)$$

ahol P_i a sejtben lévő (maradó) fehérje mennyisége. Értéke a $t = 0$ időpontban $P_i = P_{i0} =$ maximális, a későbbi t időpontokban csökken, nullához közelít. A fenti egyenletet határozottan integrálva 0 és t között a

$$\int_{P_{i0}}^{P_i} \frac{dP_i}{P_i} = - \int_0^t k dt \quad (10)$$

összefüggéshez juthatunk.

$$\ln P_i - \ln P_{i0} = -k(t - 0) \quad (11)$$

átalakítva a

$$P_i = P_{i0} \cdot e^{-kt} \quad (12)$$

formát kapjuk. Ha a feltárás előrehaladásának mértékét nem a bennmaradó, hanem a kiszabadított fehérje mennyiségével (R_k) jellemezzük, akkor

$$R_k = P_{i0} - P_i \quad (13)$$

és

$$R_k = P_{i0} [1 - e^{-kt}] \quad (14)$$

Gyakran a kiindulási termék koncentrációra normálva ($R = R_k/P_{i0}$) fejezik ki a feltárás mértékét, ekkor a fenti összefüggés

$$R = [1 - e^{-kt}] \quad (15)$$

alakban írható fel. R itt azonos a (6) egyenletben bevezetett paraméterrel. Ezzel felírva a (12) összefüggést:

$$\ln \frac{P_{i0}}{P_i} = kt = \ln \frac{1}{1 - R} \quad (16)$$

A feltárás során a kiszabaduló termék, tipikusan a fehérje, rendszerint bomlást szenved, vagy denaturálódik. A művelet optimális körülményeinek és időtartamának meghatározásánál ezt a tényezőt is feltétlenül figyelembe kell venni. A feltételezés szerint a bomlás is elsőrendű kinetika szerint megy végbe, így felírható:

$$\frac{dS}{dt} = -K_d S \quad (17)$$

A (P) fehérjekoncentráció helyett itt az (S) fajlagos enzimaktivitás (aktivitás/mg fehérje) szerepel, ez fejezi ki, hogy a jelenlévő fehérje molekulák mekkora hányada aktív. Értéke a $t=0$ időpontban S_0 , tetszőleges t időpontban pedig S . K_d pedig a bomlási folyamat sebességi állandója. Az előzőekkel teljesen analóg módon levezethető az inaktiválódás exponenciális egyenlete

$$S = S_0 e^{-K_d t} \quad (18)$$

Az eredő termékkihozatal a két modell kombinációjával fejezhető ki:

$$R_e = R_k S \quad (19)$$

$$R_e = P_{i0} \left[1 - e^{-kt} \right] \left[S_0 e^{-K_d t} \right] \quad (20)$$

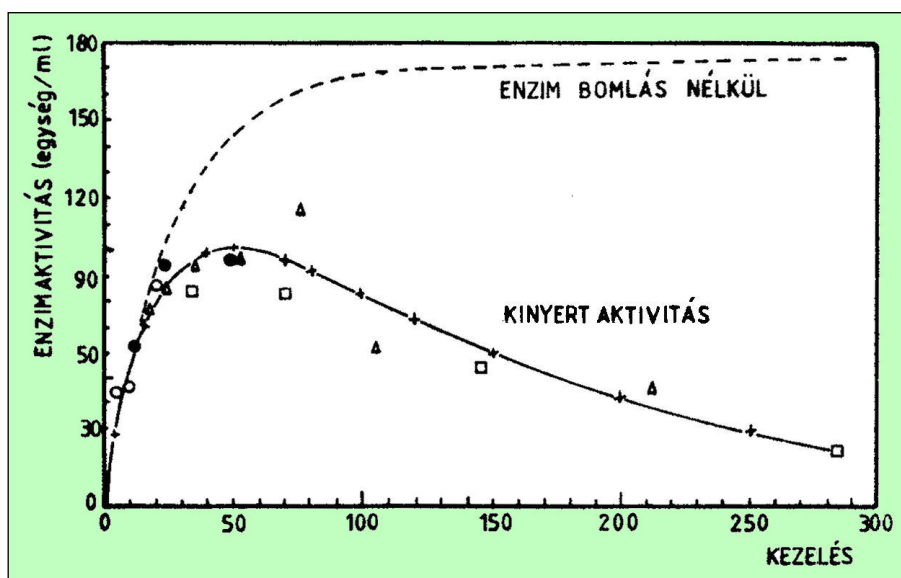
Az állandó értékeket összevonva

$$R_e = K \left(1 - e^{-kt} \right) e^{-K_d t} \quad (21)$$

A görbék alakulását animált digramon mutatjuk be:



3.3.3.1. animáció: A sejtfeltárás kinetikai görbéi



3.3.3.1. ábra: A kinyert enzimaktivitás alakulása a sejtfeltárás során.

A kettős exponenciális modell sok esetben jól egyezik a kísérleti eredményekkel (3.3.3.1. ábra). A két ellentétes lefutású exponenciális függvény szorzata maximumos görbét ad. Ez azt jelenti, hogy a sejtfeltáró kezelésnek van egy optimális ideje/mértéke, amelyet túllépve romlik a kihozatal.

3.4. Mechanikai módszerek

A feltárásnál tehát egyrészt a maximális feltárási hatékonyságot, másrészt a kinyert sejtbeli anyagok minimális károsodását tartották szem előtt. Laboratóriumi léptékben a feltárási módszerek a sejtek szerkezetének és működésének kutatását, illetve analitikai célokat szolgálták. Nagyobb, preparatív és ipari méretekben viszont enzimek vagy más sejtalkotók gyártása a cél.

Kis mennyiségű, néhány milliliternyi sejtszuszpenzió feltárását laboratóriumban manuálisan is elvégezhetjük. Ilyen eljárás lehet például a sejt-tömeg eldörzsölése egy porcelánmózsárban kvarchomokkal. Idő- és munkaigényes (15–30 perc egy minta feldolgozása), de fonalas gombok intracelluláris enzimjeinek mérésénél bevált. Manuális eszközök az ún. pottterek, amelyekben a feltárás két szorosan illeszkedő, érdesített üvegfelület közötti dörzsöléssel történik (3.4.1. ábra). Vékonyabb falú sejtek, elsősorban szövethomogenizátumok feltárására alkalmas.



3.4.1. ábra: Kézi homogenizálók, potterek (katalógusfotó)

A mikrobacejtek feltárására gyakran választanak mechanikai módszereket, mivel erre több, más iparágban bevált berendezést is fel lehet használni. A műveletek alapja, hogy a sejteket nagy nyirófeszültségnek teszik ki, amit fojtáson való átpréseléssel, erőteljes keveréssel vagy ultrahanggal hoznak létre. A legtöbb esetben az energiabevitel pazarlóan nagy, a mechanikai energia egy része hővé alakul, és ennek eltávolítására hűtést is alkalmaznak.

3.4.1. Ultrahangos kezelés

Az egyik leggyakrabban használt laboratóriumi módszer. A sejtek károsodását a kavitációs hatások okozzák. Az ultrahang gyorsan váltakozó nyomáscsökkenést és nyomásnövekedést hoz létre a folyadékban. A nyomáscsökkenés hatására a folyadék felforr, apró gőzbuborékok keletkeznek, majd a nyomás növekedésével összeroppannak, eltűnnek. Az összeroppanó buborékok lokálisan igen nagy energiasűrűséget hoznak létre, és ezek a „mikrorobbanások” kilyuggatják a sejtek burkát.

Az ultrahangos roncsolók általában alacsony frekvencián, 15–25 kHz-en működnek, a bevitt teljesítmény változtatását legtöbbször az amplitúdó szabályozásával érik el. A berendezés elektromágneses hullámokat gerjeszt, és ezeket alakítja át mechanikai rezgésekké. Tipikus felépítése is ennek megfelelő: oszcillátorból, erősítőből és hullámátalakítóból áll. A sejtuszupenzióba merülő kúpos vagy bunkós végű, rozsdamentes acélból készült rúd viszi át a rezgéseket (3.4.1.1. ábra).



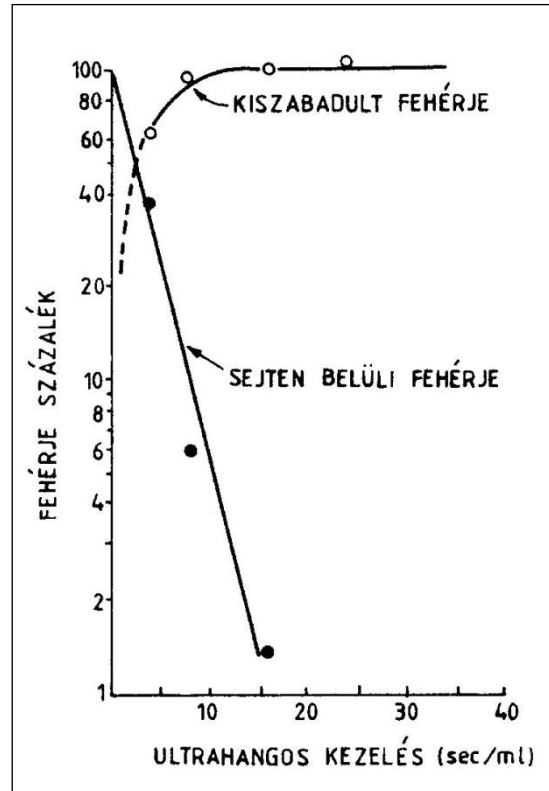
3.4.1.1. ábra: Laboratóriumi ultrahangos sejtfeltáró berendezés (katalógusfotó)

Két laboratóriumi ultrahangos sejtfeltáró berendezést videón mutatunk be.



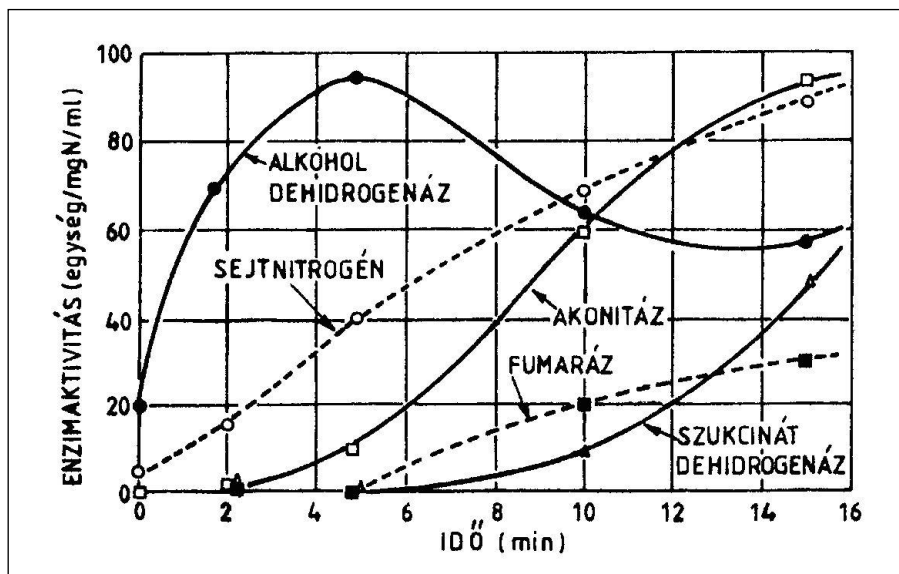
3.4.1.1. videó: Ultrahangos sejtfeltárók

A feltárás során a sejtuszpenziót tartalmazó edényt jéggel vagy cirkuláló hűtőközeggel hűtik. Bár az ultrahangos kezelés a folyadék áramoltatásával folytonos műveletben is alkalmazható, nagyobb léptékű alkalmazásra mégsem megfelelő, mivel a nagy teljesítménybevételnél nehéz a kielégítő hűtést megoldani. A módszer másik hátránya, hogy egyértelműen kimutatható enzimbomlást okoz. Ennek egyik oka a szabad gyökök képződésében keresendő. A bevitt energia növelésével a gyökképződés gyakorisága erősen növekszik, ez behatárolja az alkalmazható energiasűrűséget. Az ultrahangos feltárás jól leírható az elsőrendű reakciókinetikai modellel, a kísérleti adatok féllogaritmikus ábrázolásban egyenest adnak (3.4.1.2. ábra).



3.4.1.2. ábra: Fehérjekibocsátás *Bacillus*-sejtekből

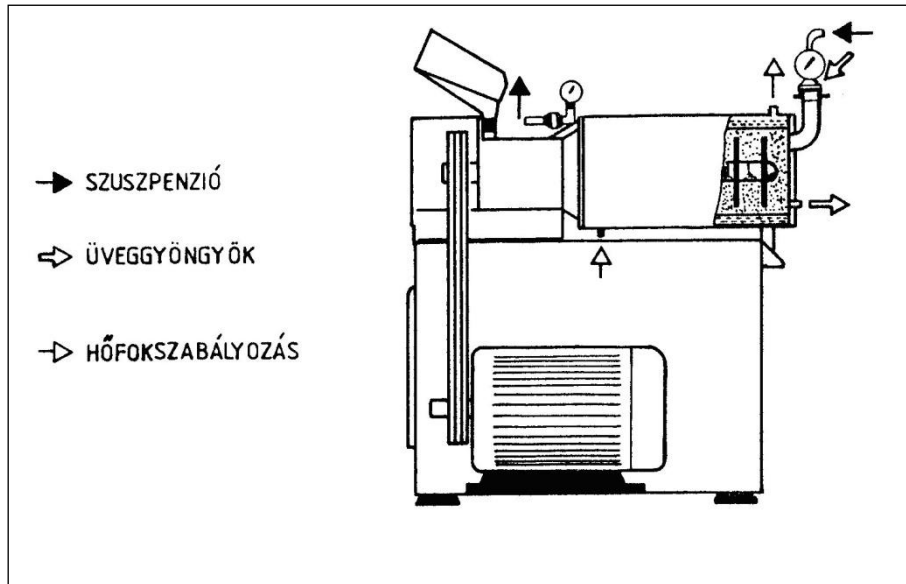
Ez azonban nem jelenti azt, hogy a különböző enzimek egyszerre és egyenletesen szabadulnak ki a sejtekből. Előbb a citoplazmaenzimek jelennek meg (alkohol-dehidrogenáz), majd a mitokondrium enzimek (citrátciklus: akonitáz, fumaráz, szukcinát-dehidrogenáz) és végül a membránba kötött enzimek (3.4.1.3. ábra).



3.4.1.3. ábra: Különböző enzimek kilépése élesztőből ultrahangos feltárás során

3.4.2. Gyöngymalmok

A gyöngymalmokat eredetileg a festékiparban használták nagyon finom pigmentporok őrlésére. Innen vették át a biomérnöki gyakorlatba, ahol szintén jól alkalmazhatónak bizonyult. Nevét az aprításra használt üveggyöngy töltetről kapta. Jellemző kialakítása egy vízszintes henger alakú őrlőtér, tele apró üveggyöngyökkel, amelyeket a vízszintes tengelyen lévő keverőtárcsák tartanak mozgásban (3.4.2.1., 3.4.2.2. ábra).



3.4.2.1. ábra: Gyöngymalom tipikus felépítése (vázlat)



3.4.2.2. ábra Asztali gyöngymalom (katalógusfotó)

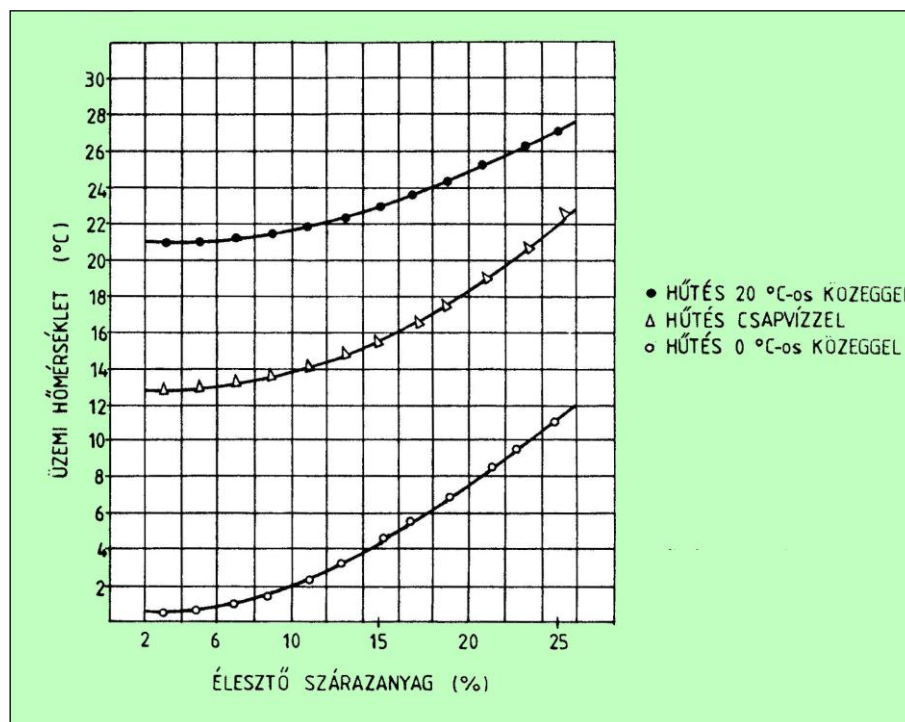
Több roncsolási mechanizmus működik egymás mellett, az egymáshoz dörzsölődő gyöngyök koptató, nyíró hatása fokozatosan elvékonyítja, majd eltünteti a sejtfalat. A feltárást számos technikai paraméter befolyásolja: a gyöngyök mérete, a feltöltés mértéke, a sejt koncentráció a szuszpenzióban, a keverőelem kialakítása, mérete és kerületi sebessége, a hőmérséklet, folytonos üzemben a betáplálás sebessége. Ehhez járul még, hogy ugyanaz a malom másképpen működik vízszintes és függőleges helyzetben. A felsorolt paraméterek nemcsak a feltárási mértékét befolyásolják, hanem a teljesítményfelvételt is.

A gyöngyök méretével kapcsolatban szerzett tapasztalatok nem egyértelműek. Az élesztők kezelésénél a 0,5–2,8 mm közötti tartományban a legkisebb méretű üvegszemcse-frakció bizonyult a

leghatásosabbnak. Más kísérletek szerint az optimum 0,25–0,5 mm között van, efölött és ezalatt romlik a feltáró hatás. További eredmények szerint az optimális átmérő függ attól, hogy citoplazma- vagy membránkötött enzimet akarunk kinyerni. Általánosítható megfigyelés, hogy minél kisebb a sejtek mérete, annál kisebb az optimális átmérő is. Így a baktériumok feltárásához kisebb frakciót célszerű használni, mint az élesztőkhöz. Másik oldalról szem előtt kell tartani, hogy folytonos üzemmódban az elvételnél az üvegszemcséket vissza kell tartani az őrlőtérben. Kis gyöngyátmérőnél a szeparátor nyílásai is kicsik, ami eltömődésveszéllyel és nagy áramlási ellenállással jár.

A kamrába töltött üvegyöngyök mennyisége mind a feltárásra, mind az energiafelvételre hatással van. A feltárás szempontjából a nagyobb mértékű töltés előnyös, az optimum 80–88% között észlelhető. A sejtuszpenzió ekkor szinte csak a hézagterefogatban helyezkedik el. A töltés mértékével viszont a teljesítményfelvétel is nő, ami a hőmérséklet növekedését eredményezi.

A keverő kerületi sebességének növelése a technológiailag kihasználható tartományban (10–20 m/s) fokozza a feltárás hatékonyságát, extrém nagy sebességek esetén viszont a fellépő ellentétes hatások miatt ez a növekedés lelassul, majd leáll.



3.4.2.3. ábra: A sejt koncentráció hatása az üzemi hőmérsékletre

A keverő kialakításának is jelentős szerepe van a művelet hatékonyságában. Hagyományos keverők, propeller vagy turbina itt nem alkalmazhatók. Csak olyan tárcsaszerű elemeket építhetünk be, amelyeknek nincs homloklülete. Ezek csak rovátkolt, hullámos oldalukkal, illetve peremükkel mozgatják a gyöngyöket. Ez viszont azt is jelenti, hogy a keverő csak közvetlen környezetében, 1-2 cm-es zónában hatékony. Emiatt a tengelyen sűrűn egymás mellett helyezkednek el a tárcsák. A keverő mérete, azaz hogy mennyire fedi le az őrlőkamra keresztmetszetét, eltérő hatást vált ki kis és nagy sebességeknél. A kis felület hátrányos a kis kerületi sebességeknél, de jobbnak bizonyult a nagyoknál. A sima keverőtárcsák helyett rovátkoltak alkalmazása elsősorban a sűrű sejtuszpenzióknál előnyös. A beszerezhető gyöngymalmok kerek keverőtárcsái excentrikusan helyezkednek el a tengelyen, úgy, hogy egy spirált alkotnak. Ez a kiképzés lehetővé teszi ellenáram létrehozását, vagyis a gyöngyök és a folyadék mozgási iránya ellentétes. A tárcsák merőleges helyzetének megváltoztatása, elferdítése javítja a feltárást, különösen kis fordulatszámoknál, de nagyobb teljesítményfelvétellel és hőmérsékletemelkedéssel jár.

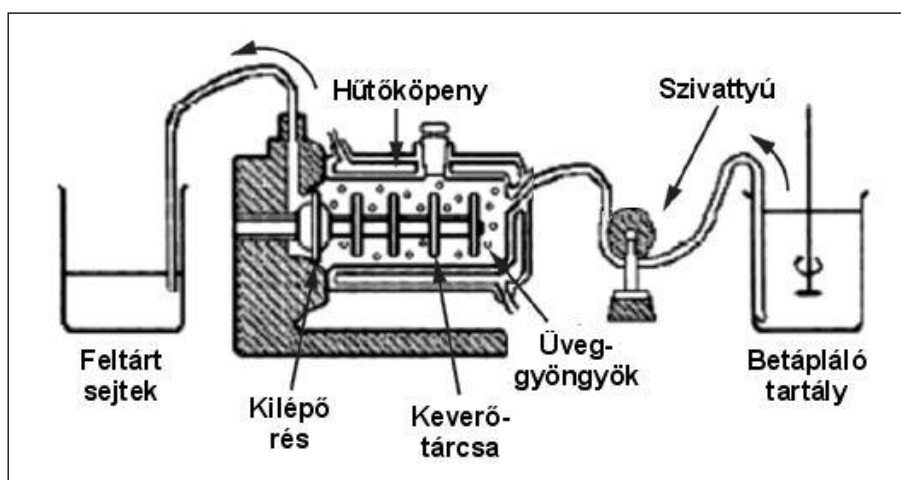
A vízszintes és függőleges helyzetben működtetett gyöngymalmok közül a feltárás hatásosságát tekintve a horizontális elrendezés kis mértékben hatékonyabb. A további műszaki paraméterek (tömítések, elvétel beépítése) szintén emellett szólnak.

A működési hőmérséklet változtatása a megengedhető 5–40 °C tartományban alig mérhető eltérést okoz a feltárásban. Sokkal fontosabb a termelő hő eltávolítása, és ezzel a hőmérséklet emelkedésének megakadályozása (3.4.2.3. ábra).

Kisebber készülékeknél hűtőköpeny alkalmazásával a hőfokszabályozás megfelelően megoldható (3.4.2.1. ábra), viszont a léptéknövelésnél ez az egyik legnehezebben leküzdhető probléma.

A sejtkoncentráció változtatásával szerzett tapasztalatok ellentmondásosak. Egyes esetekben a sejtszuspenzió koncentrációjának növelésével a feltárás is javult, máskor nem észleltek változást, vagy maximumos görbét kaptak. Jobban értelmezhető a jelenségek, ha figyelembe vesszük, hogy a koncentráció hatása sebességfüggő, csak kis sebességeknél észlelhető, nagyoknál elhanyagolhatóvá válik. Más értelmezés szerint a sejtszuspenzióknak nem a koncentrációja számít, hanem a reológiai tulajdonságai.

A gyöngymalmok igen nagy előnye, hogy folytonos üzembn is működtethetők (3.4.2.4. ábra). A készülék egyik végén betáplált lé a másik végén kivezethető, az üvegyöngyök visszatartásával.



3.4.2.4. ábra: Folytonos üzembn gyöngymalom (vázlat)

Ezzel jelentősen növelhető a feldolgozási teljesítmény. A berendezések alkalmazhatók átáramlásos, illetve recirkulációs üzemmódbn is. Folytonos üzembn értelmezhető a tartózkodási idő, és a térsebesség (hígítási sebesség) paraméter is.

A gyöngymalombn végbemenő feltárás is általában jól leírható az elsőrendű kinetikával

$$\ln \left[\frac{1}{1-R} \right] = kt \quad (16)$$

ahol k az elsőrendű reakció kinetikai konstansa, t pedig az idő, R itt is a feltárt sejtek részaránya az összes sejtől. (ld. a 6 egyenletet).

Recirkulációs üzemmódbn, amikor egy adott anyagmennyiséget keringetéssel többször is átvezetnek az őrlőkamrán, a kinetikai konstans az áramlási sebesség növelésével csökken. Feltehetően a gyorsabb áramlás megzavarja a gyöngyök kialakult rendezett mozgását és ezáltal csökken a feltárás hatékonysága. Folytonos kísérletekben viszont elsőrendű kapcsolatot lehet kimutatni a feltárás és az áramlási sebesség reciproka (tartózkodási idő) között. Nagyobb gyöngymalmoknál a reaktorkinetika összetettebb, a kaszkád reaktorokra kidolgozott modellek használatosak, a lépcsők száma megegyezik a keverőtárcsák számával. A modellt ki kell egészíteni a visszakeveredéssel is, ekkor ad jó egyezést a kísérleti eredményekkel. A visszakeveredés és a diszperzió csökkentik a feltárás hatékonyságát, különösen kis átfolyási sebességnél. A keverő sebességének növelése javítja a feltárási sebességet, de emellett fokozza a visszakeveredést is. A két ellentétes hatás nagyon nagy sebességeknél kiegyenlítheti egymást.

A gyöngymalmok teljes energiafelvétele a keverősebesség, a töltés mértéke és az átfolyási sebesség emelésével növekszik. Jelentősen befolyásolja a fogyasztást a keverő kialakítása is. Mérnöki szempontból a legérdekesebb paraméter valójában az egységnyi feltárt anyagmennyiségre jutó

energia. Ezt az értéket a felsoroltakon kívül számos további tényező befolyásolja, és így gyakran előfordul, hogy, hogy nem az összes energiafelvétel optimumánál van a fajlagos érték minimuma. A hatások nem mindig becsülhető az eddig felsoroltak alapján, pl. figyelembe kell venni az egységnyi kamratérfogatra eső keverőtárcsák számát.

A technikai paraméterek mellett újra meg kell említeni hogy a feltárás hatékonysága függ a mikroorganizmus fajtájától és a tenyésztési körülményektől. Érvényesülnek a méret szerinti különbségek, minél kisebb egy sejt, annál nehezebb feltárni. Így könnyebb elroncsolni a fonalas gombákat és penészeket, mint a nem túlságosan vastag falú *E coli*-t. Az élesztők valahol középen helyezkednek el, a csoporton belül is vannak különbségek, pl. a *Saccharomyces* fajokhoz viszonyítva pl. a *Candida utilis* lényegesen ellenállóbb.

A mikrobiológiai termékek jelentős része könnyen denaturálódik. Ezért a gyöngymalmok konkrét alkalmazásánál gondosan kell optimalálni a feltárás körülményeit, tekintettel a kinyerni kívánt anyag stabilitására. Enzimek esetében észlelhető mértékű inaktíválódás lép fel, még akkor is, ha a működési hőmérséklet 5 °C alatt tartják. Valószínűleg a nyírás, vagy más mechanikai hatások is denaturálódást okoznak.

A gyöngymalmok ipari léptékben is gyártott készülékek. A bemutatott katalógusoldalon (3.4.2.5. ábra) a legnagyobb méretű készülék őrlőtere 275 literes, ehhez 75 kilowattos motor tartozik, a készülék tömege csaknem 3 tonna.

		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	ka	82	82	95	390	550	1050	2150	2800

3.4.2.5. ábra: Gyöngymalmok méretsora (katalógus)

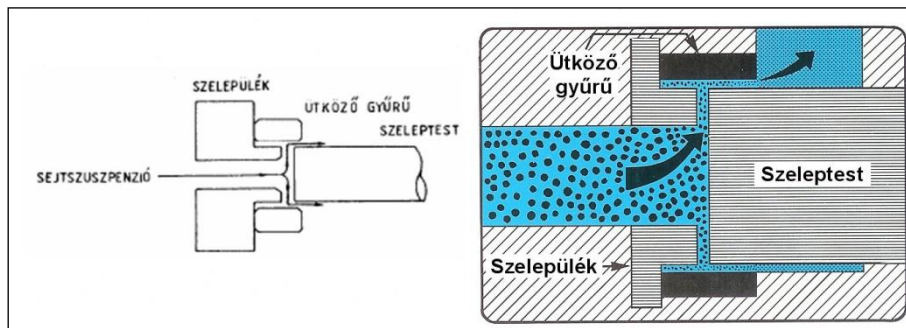
Felmerülhet a kérdés, hogy egy 275 literes készüléket hogyan lehet beépíteni egy fermentációs feldolgozási technológiába, ahol egy sarzs sokszor 100 m³-nyi fermentlevet jelent. A válaszhoz figyelembe kell venni, hogy a 100 m³ fermentléből leválasztott sejtömeg csak ~5 százalék (= 5 m³). Az őrlőtérben ~10 perces tartózkodási idő általában megfelelő feltárást biztosít, azaz óránként térfogatának hatszorosát képes feldolgozni. A gyöngyök közötti hézagterefogatot becsüljük 50%-nak, tehát egyszerre ~140 liter sejtuszpenzió tölthető be. Ez óránként 6*140 = 840 literes kapacitást jelent. Az 5000 liternyi biomasszát tehát ~ 6 óra alatt lehet feldolgozni, ami üzemi technológiákban elfogadható.

3.4.3. Nagynyomású homogenizátorok

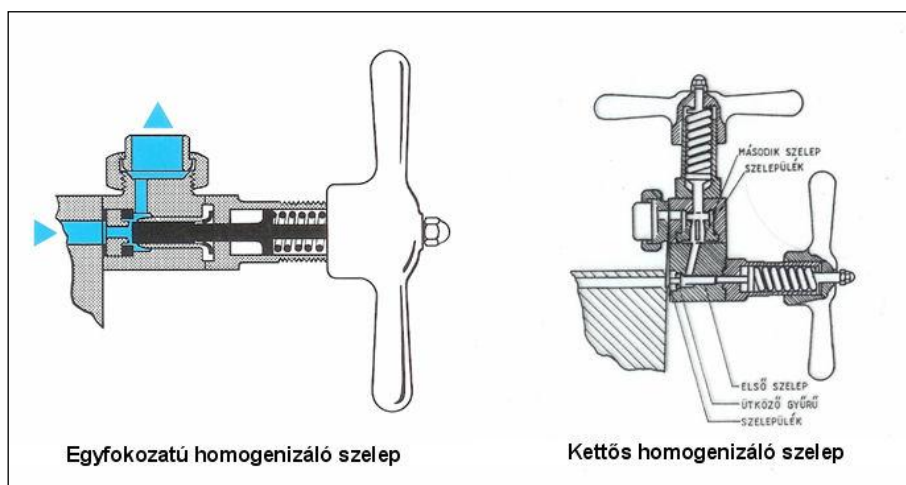
A nagynyomású homogenizálás a gyöngymalmok mellett a másik választható nagyléptékű mechanikai feltárási módszer. Nagynyomású homogenizátorokat használnak az ipar más területein is, ahol nagyon

finom emulziók létrehozására van szükség. Legnagyobb léptékben a tejipar használja a tejben lévő zsírcseppek (micellák) aprítására. A méretcsökkentéssel megakadályozható a zsír felülepedése, ezáltal (és az ultrapasztörözéssel) a tej hónapokon keresztül tárolhatóvá válik. A tejipari homogenizátorok különösebb átalakítás nélkül alkalmazhatók feltárási célokra.

A roncsoláshoz a sejtuszuspenziót nagy nyomással (200–600 bar) átviszik egy (vagy két sorbakapcsolt) szabályozható, szűk nyílású szelepen (3.4.3.1. és 3.4.3.2. ábra).



3.4.3.1. ábra: A homogenizáló szelep vázlatos felépítése



3.4.3.2. ábra: Egy- és kétfokozatú homogenizáló szelep hosszmetsete

A szeleptányért egy rugó szorítja beállítható erővel a szelepülékhez. A nyomás a rugóerő ellenében megemeli a szeleptuskót, és ekkor a vékony filmben áramló sejtuszuspenzió a nagy nyomáskülönbség hatására rendkívüli módon felgyorsul (2-300 m/s). Ennek megfelelően igen erős mechanikai hatások lépnek fel (nyírás, ütközés, kavitáció). Sokkal kevesebb műveleti paramétert kell szem előtt tartani, mint a gyöngymalmoknál. Legfontosabb a működési nyomás, a hőmérséklet és az átréselések száma. Emellett a szelep geometriai kialakításán is nagyon sok múlik.

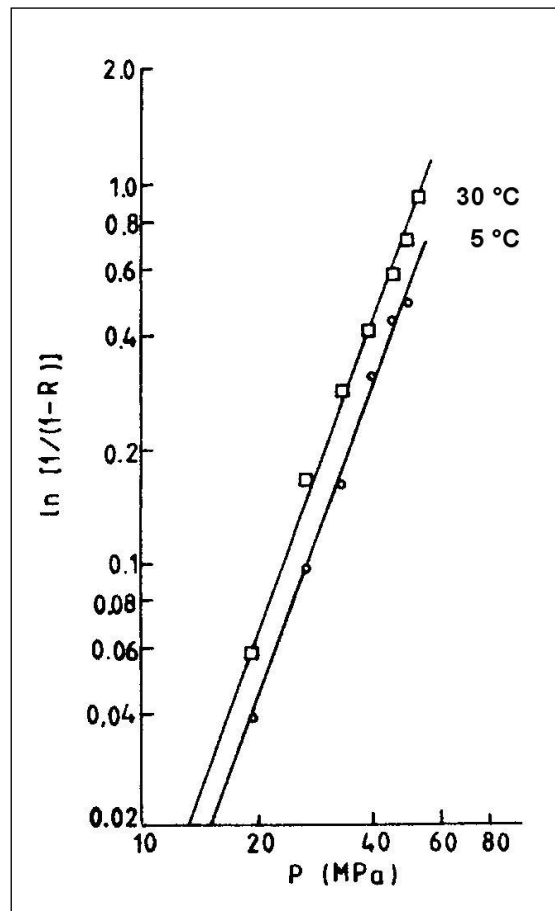
3.4.3.1. A működési paraméterek hatása

A nagynyomású homogenizátorokban a feltárást általában elsőrendű kinetikával írható le, de az idő helyett az átnyomatások számát használják (N_p = passzázsszám).

$$\ln \left[\frac{1}{1-R} \right] = k N_p P^a \quad (22)$$

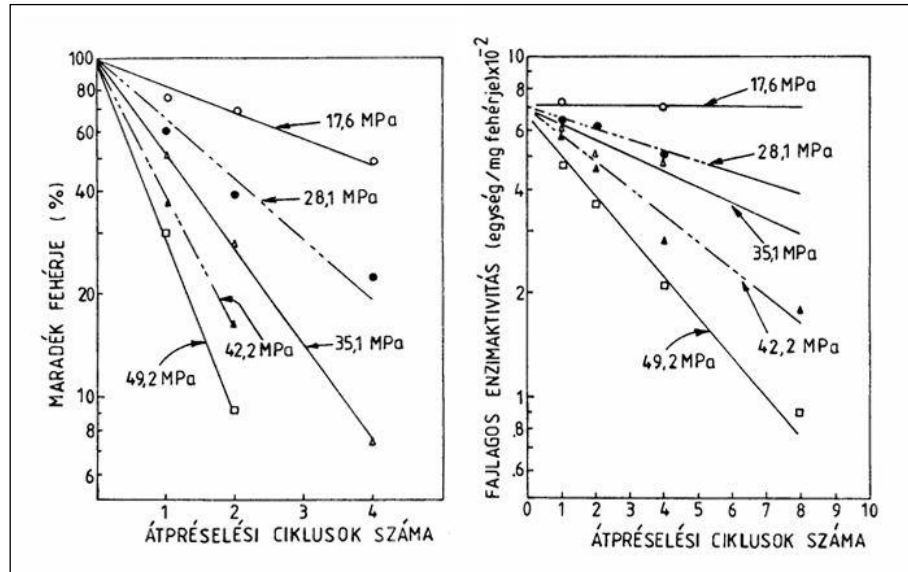
A „kinetikai konstans” a hőmérséklet és a nyomás függvénye. A nyomásfüggés kibontható egy hatványfüggvénnyel: P az üzemi nyomás, az (a) kitevő értéke pedig más és más a különféle mikroorganizmusokra, de egy mikrobánál is változhat. Pékélesztőnél pl. 2,2–2,9 között változik a tenyésztési körülményektől függően. Ha csak a nyomást változtatjuk, akkor log-log ábrázolásban a

hatványfüggvénynek megfelelően egyenest kapunk, amelynek paramétereiből (k) és (a) meghatározható (3.4.3.1.1. ábra). Mások az ún. homogenizálási faktort (Θ_H) használják a feltárási hatás jellemzésére: $\Theta_H = (N)(\Delta P)$



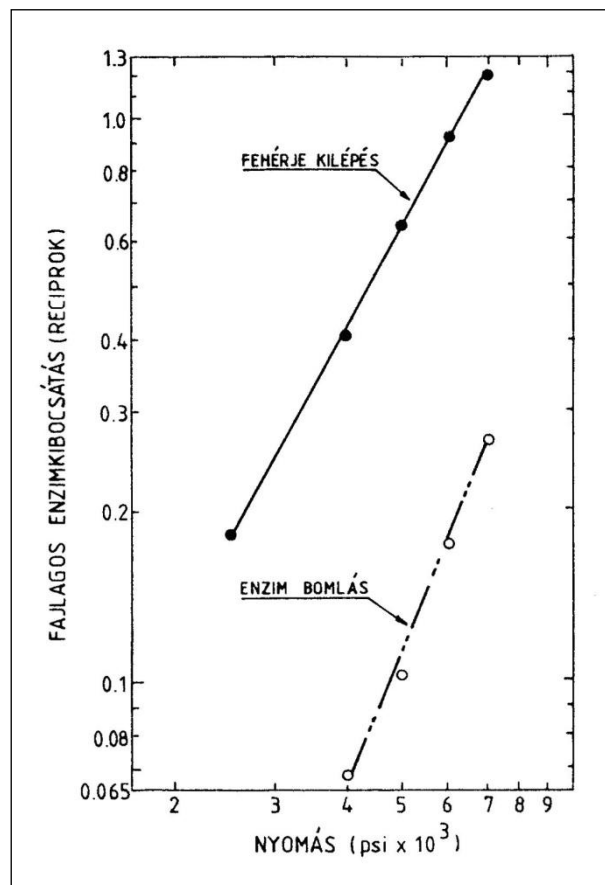
3.4.3.1.1. ábra: Pékélesztő feltárási hatásának nyomásfüggése

A sejtben maradó fehérje mennyisége az egyenlet szerint exponenciálisan csökken, azaz féllogaritmikus ábrázolásban lineáris (3.4.3.1.2. ábra).



3.4.3.1.2. ábra: Fehérjekinyerés nagynyomású homogenizátorral

A mechanikai hatások nemcsak a sejteket roncsolják, hanem a fehérjéket is képesek denaturálni. A feltárásnál a termékkhozataalt befolyásoló két ellentétes folyamat, a fehérjekibocsátás és a denaturáció egyaránt hatványfüggvény szerint függ a nyomástól. Közös diagramon mutatja be a 3.4.3.1.3. ábra.



3.4.3.1.3. ábra: A fehérjekibocsátás és az enzimbomlás függése a nyomáseséstől

A feltárás hatásossága széles tartományban független a feldolgozott sejtuszuspenzió koncentrációjától.

Azonos mikrobatörzs esetén is eltérő feltárást kaphatunk a tenyésztési különbségek (táptalaj, a tenyészet kora) miatt. A 3.4.3.1.1. táblázat adatai a közel azonos nyomáson (53–55 MPa), egy átvitelrel elért feltárási hatásfokot mutatják.

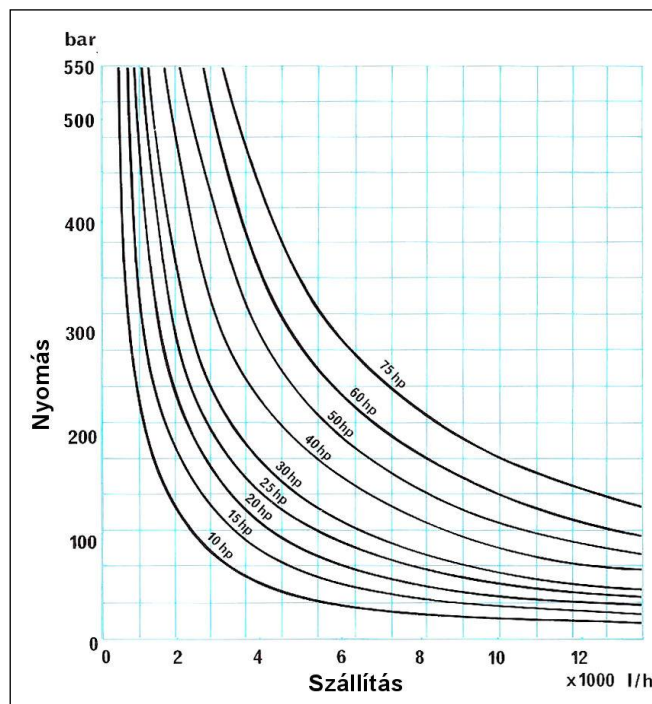
3.4.3.1.1. táblázat: Feltárási hatásfok különböző tenyészetek esetén

Organizmus	nyomás (MPa)	feltárás (%)
pékélesztő	53	62
pékélesztő	55	12
sörélesztő	55	61
<i>Candida lipolitica</i>	55	43
<i>Escherichia coli</i>	53	60
<i>Escherichia coli</i>	53	67

Az értékek 12–67% között változnak a különböző mikroorganizmusok és más faktorok függvényében. A tenyésztési körülmények jelentős különbségeket okozhatnak, mint az a pékélesztő és az *Escherichia coli* esetében mutatkozik. Az élesztőnél a nyomásfüggést leíró hatványkitevő is jelentősen változik (2,2–2,9).

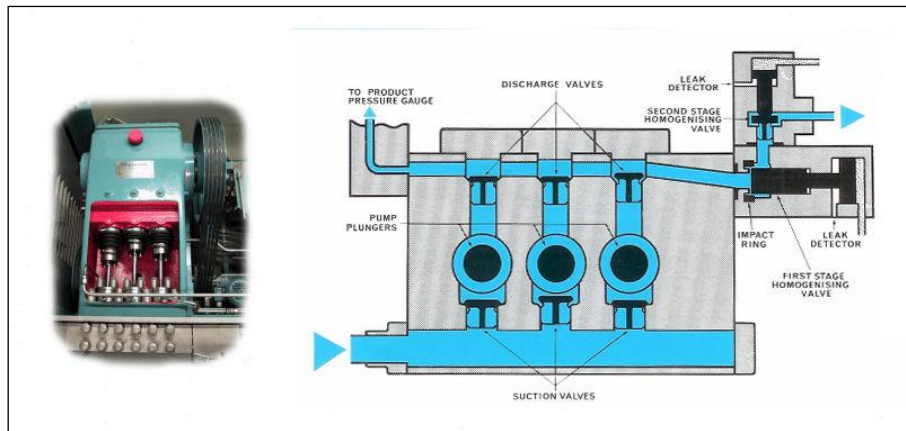
A 90%-os feltárás eléréséhez minimálisan két átnyomásra van szükség, még a legjobb mért hatásfok esetén is. Mivel a feltárás erősen függ a műveleti nyomástól, sokkal hatékonyabbnak tűnik a nyomás fokozása és kevesebb kezelési ciklus beiktatása. Ehhez nagyobb nyomásra tervezett homogenizáló szelepet és megfelelő szivattyút kell alkalmazni. Így el lehet érni a 176 MPa nyomást, ami egy lépésben közel teljes, ~100%-os feltárást eredményez. A mérések szerint a hatékonyság 70 MPa felett már nem emelkedik olyan meredeken, mint az alsó tartományban. Az exponenciális összefüggés érvényességének felső határa függ a szelep kialakításától.

A nyomás kérdése nem vizsgálható egyedül a feltárás szemszögéből. A nyomást szivattyúval hozzák létre, és a szivattyú térfogatárama fordított arányban áll a legyőzendő nyomással (3.4.3.1.4. ábra).



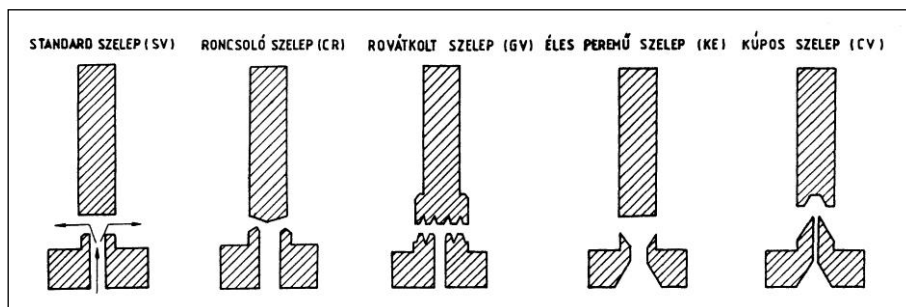
3.4.3.1.4. ábra: Nagynyomású szivattyúk jelleggörbéi

Ilyen nagy nyomásokat csak dugattyús szivattyúval lehet létrehozni. A dugattyús szivattyú által létrehozott nyomás, ezzel együtt az áramlási sebesség is szinuszcsoport szerint ingadozik. Ennek kiküszöbölésére, vagy legalább is csökkentésére általában háromhengeres dugattyús szivattyút alkalmaznak, az egyes hengerek 120 fokos fáziseltolással működnek (3.4.3.1.5. ábra).



3.4.3.1.5. ábra: Háromhengeres dugattyús szivattyú

A szelep belsejének kialakítása, geometriája természetesen befolyásolja a feltárás hatékonyságát is. Néhány szeleptuskó + szeleplék kialakítást mutat be a 3.4.3.1.6. ábra.



3.4.3.1.6. ábra: Homogenizáló szelepek kialakítása

Az egyes konstrukciók azonos kísérleti feltételek között felvett adatai azt mutatják, hogy a rovátkolt szelep (GV) igen gyenge hatású, a többi négy közel azonos, de a legjobb értékeket az éles peremű szelep (KE) esetében kapták.

3.4.3.2. A feltárás mechanizmusa

A feltárást a szűkítéssel homogenizátorokban csak kevés paraméter befolyásolja – ezek közül a legfontosabb a nyomás – a roncsolás mechanizmusa mégis nehezen értelmezhető. A kísérleti eredmények alapján több mechanizmust is valószínűsítettek, de a szelepen fellépő hidrodinamikai jelenségek túl összetettek ahhoz, hogy csak a mért adatokból egyértelmű következtetéseket vonjunk le. A homogenizáló szelepen az áramlás erős nyírást, mechanikai feszültséget, örvénylést és a folyadéksugár ütközése által létrehozott feszültséget hozhat létre. A folyadék nagyon vékony filmben áramlik, áramlása mégsem tisztán lamináris. Örvények lépnek fel, és a folyadék útja többször is éles szögben megtörik.

A különböző homogenizálókkal végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a kulcsparaméter a nyomás mellett a nyomásesés sebessége (dp/dt). Ezt bizonyítja az is, hogy ha szelep gyanánt egy acélkapillárist alkalmaznak, állandó nyomásesés (124 Mpa) mellett annál jobb volt a feltárás mértéke, minél rövidebbre vették a kapilláris hosszát.

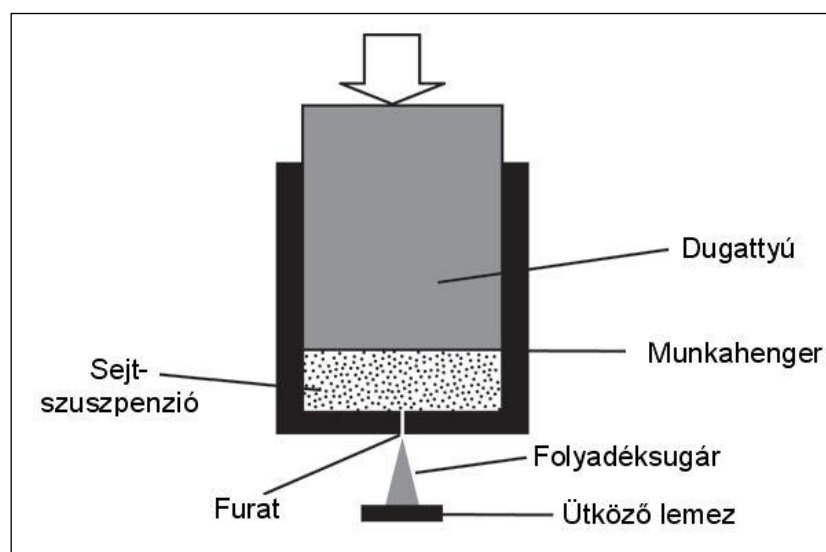
A sejtek roncsolódásának hidrodinamikai modelljében feltételezik, hogy a turbulens áramlásnál létrejövő kis örvények, amelyek mérete kisebb mint a sejt, a sejt-folyadék lüktetését okozzák, és ennek kinetikai energiája elegendő a sejt-fal szétszakításához. A méreteket azért fontos említeni, mert az

örvény nagyságánál kisebb sejtekre ez a mechanizmus nem hat. Ez az elmélet jól egyezik a kísérleti tapasztalatokkal, de csak akkor hozható összhangba a többszöri kezelés során észlelt elsőrendű kinetikával, ha a modellt egy időtényezővel is kiegészítik. A másik probléma, hogy az ismételt kezelésekkal elért teljes feltárást csak azzal a feltételezéssel lehet leírni, hogy a sejtek fala minden egyes passzázs során gyengül, vékonyodik. A hidrodinamikus jelenségek vizsgálatát nehezíti a dugattyús szivattyúk ciklikus nyomásingadozása, pulzálása is.

3.4.4. Szakaszos üzemű homogenizátorok

A szűkítésen való átpréselés megvalósítható szakaszos üzemben is. Nagy nyomásra itt is szükség van, de elhagyható a folyamatosan óriási nyomást létrehozó dugattyús szivattyú, helyette szakaszosan üzemelő hidraulikus rendszer alkalmazható. A készülék kapacitása a henger + dugattyú „lökettérfogatától” függ.

A mintát acélhengerben dugattyúval nyomják át a fojtáson, miközben a nyomást állandó értéken tartják (a legnagyobb leírt üzemi nyomás 210 Mpa). A kilépő nagy sebességű folyadéksugarat fémfelületnek ütköztetik (3.4.4.1. ábra).

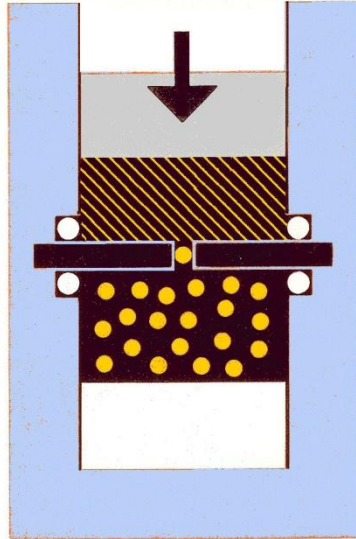


3.4.4. 1. ábra: Szakaszos üzemű homogenizátor (French press)

A művelet során a szelep és az anyag felmelegszik, ami denaturálódást okozhat. Ezt elkerülendő, hűtőrendszert kell beépíteni. A nyomás szabályozása manuálisan és automatikusan is megoldható. A legfejlettebb modellek (pl. Servall-Ribi Fractionator) az újratöltést is automatikusan hajtják végre. A módszer léptéknövelése a félüzemi léptéken túl a nagy nyomás és a szakaszos üzem miatt nehezen megoldható. A művelet és a készülék hasonlít a nagy nyomású homogenizátorokra, valószínűleg a feltárás mechanizmusa is azonos. A szűkítésen áthaladó folyadékban igen nagy sebességgradiens alakul ki, ez erőteljes nyírást is jelent, ami szétszakítja a sejteket.

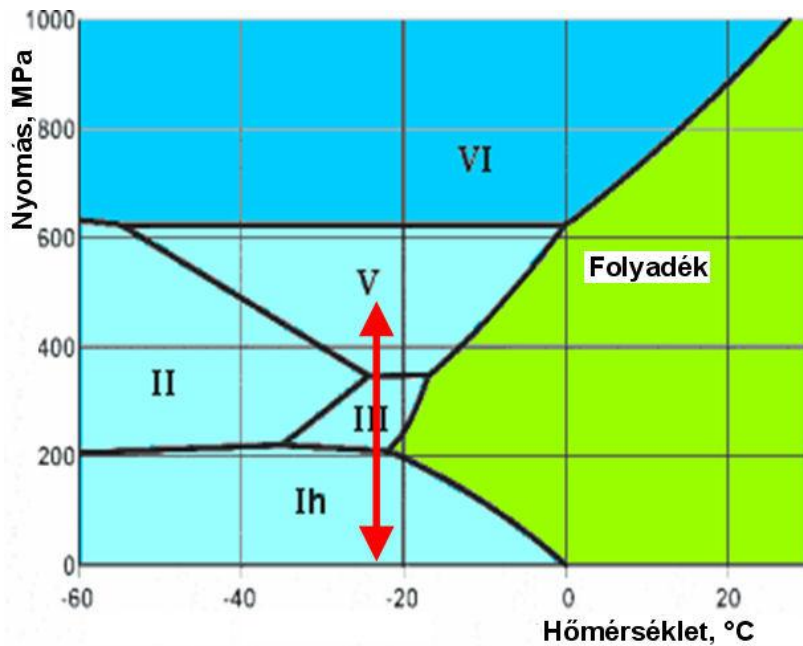
3.4.5. X-press

Csak látszólag azonos elvű készülék az X-press. A henger + dugattyú, a furaton való átpréselés nagy nyomással itt is megvan, de a folyamat itt szilárd fázisban, jéggé fagyasztott állapotban megy végbe. A hengerbe fagyasztott szuszpenziót a dugattyú extrém nagy nyomással kényszeríti át egy szűk furaton (3.4.5.1. ábra). A szilárd jég ilyen körülmények között plasztikusan viselkedik, és áthalad a résen.



3.4.5.1. ábra: Az X-press (vázlat)

A feltárás során több mechanizmus érvényesül egymás mellett. A jégkristályok roncsoló hatása és a szűkítésnél fellépő sebesség- és nyírógradiens mellett érdemes tanulmányozni a jég fázisátmeneteit a művelet során (3.4.5.2. ábra).



3.4.5.2. ábra: A víz-jég fázisdiagram

Az ábrán a római számokkal jelzett területek a jég különböző kristálymódosulatainak felelnek meg. A kiindulási pont az atmoszférikus nyomás, és -22 °C (vagy ez alatti hőmérséklet). A fagyott szuszpenzióban a jég az I-h (hexagonális) kristályformában van. Állandó hőmérsékleten a nyomás növelésével a diagramon fölfelé mozog a rendszer, a piros nyíl mentén. Ha a jég hármaspontja alatt (-22 °C , $211,5\text{ MPa}$) vagyunk, akkor körülbelül 2100 bar nyomásnál elérjük a jég I – jég III átmenetet. Ez térfogatsökkenéssel jár. Tovább növelve a nyomást a jég III – jég V átmenet következik, ami további zsugorodást okoz. A furaton való áthaladás után a nyomás pillanatszerűen csökken, visszaáll a légköri értékre, miközben ezek az átalakulások fordított sorrendben mennek végbe (lefelé mutató nyíl a fázisdiagramon). A jégkristályok térfogatsökkenése, majd növekedése jelenti a legerősebb feltáró hatást ennél a módszernél.

3.4.5.1. táblázat: A jég kristálymódosulatainak adatai

Jég kristályforma	Relatív sűrűség	Térfogatcsökkenés, %
Jég-I-h	0,92	
		19,3
Jég-III	1,14	
		7,3
Jég-V	1,23	

A fotón látható feltáró kamra lényegében egy fémtömb, amibe egy furatot mélyítettek, ebben mozog a dugattyú. A bemutatott henger csak kis része a berendezésnek, a nyomást egy jókora, mászás súlyú hidraulikus egység biztosítja.



3.4.5.3. ábra: Az X-Press feltárókamrája (katalógusfotó)

A fagyasztva préseléses eljárásnak több előnye van:

- nagyon hatékony, a mikroorganizmus típusától függetlenül egy kezelés teljes feltárást eredményez
- az alacsony hőfok miatt denaturálódástól nem kell tartani
- koncentrált sejtszuszpenziókat (akár kiperéselt szűrőlepenyt) is fel lehet dolgozni.

Hátránya, hogy a nagy nyomás és a szakaszos működés miatt nem léptéknövelhető. A 2000–6000 bar (200–600 MPa) nyomás miatt nem lehet nagy készüléket építeni, csak milliliteres mennyiségeket lehet feldolgozni. Minden egyes mintánál be kell állítani a -22 °C alatti hőfokot, ez nagyon lelassítja használatát.

3.4.6. Energiaszükséglet

A mechanikai sejtfeltárás a választott módszertől függetlenül energiaigényes művelet. Gyakorlati szempontból elsősorban az energia hasznosulását, a fajlagos értékeket célszerű vizsgálni. A különböző leírások összehasonlításánál nehézséget okoz, hogy az energiafelhasználást gyakran más mennyiségre vonatkoztatva adják meg. A legjobban használható összehasonlítási paraméter a bevitt egységnyi

energiára eső feltárt sejt-tömeg (szárazanyagban kifejezve). Ilyen összehasonlítható adatokat mutat be a 3.4.6.1. táblázat. Az adatok szerint a hatékonyság erősen függ a sejt-koncentrációtól, a keverő kialakításától, a térfogati viszonyoktól és az előbb leírtak szerint a mikroorganizmus típusától. A táblázat adatai összhangban vannak azzal a tapasztalattal, hogy a *Candida utilis* és a *Scenedesmus obliquus* esetében a hatékonyság rosszabb, mint a könnyebben feltárható *Saccharomyces cerevisiae*-nél.

3.4.6.1. táblázat: A gyöngymalmok energiafelhasználása

Organizmus	feltárás (%)	koncentráció (% sz.a./tf)	hatékonyság (mg/J)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80	6	0,51
	80	11	1,11
	80	16	1,11
	85	10-20	0,93
	95	17	1,26-1,39
	65	13,5	2,32
	42	13,5	1,25
	40	13,5	5,40
<i>S. carlbergiensis</i>	95	17	1,26-1,39
<i>C. utilis</i>	85-90	17	0,84-1,07

A nagynyomású homogenizátorokban az energiahasznosulást a százalékos feltárás/egységnyi energiabevitel alapján is vizsgálták. Ez a mutató pékélesztőre állandó maradt 8,5 és 17% sejt-koncentráció közötti tartományban, ami a feltárt sejt-tömegre számolva viszont lineáris növekedést jelent.

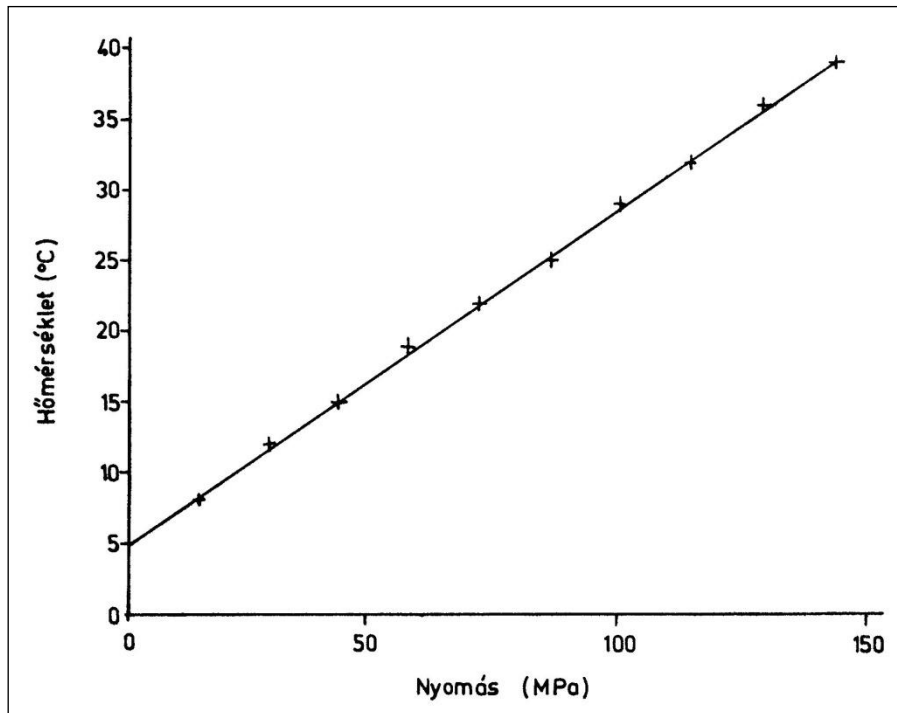
3.4.6.2. táblázat: A nagynyomású homogenizátorok energiafelhasználása

Organizmus	feltárás (%)	koncentráció (% sz.a./tf)	hatékonyság (mg/J)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90	17	1,65
	94	20	1,25
<i>Candida utilis</i>	90	20	1,26
	87	20	0,83

A homogenizátorok összehasonlítható adatai a 3.4.6.2. táblázatban láthatók. Itt is megmutatkozik, hogy a *C. utilis* feltárásának nagyobb az energiaigénye, mint a *S. cerevisiae*-nek.

A tapasztalatok azt mutatják, hogy az alacsony nyomáson többször végrehajtott ápréselés energetikailag is kedvezőtlenebb, mint az egyszeri, nagy nyomással végrehajtott kezelés.

Az energiahasznosítási szempontok mindkét készüléktípusnál az egy lépésben végrehajtott, intenzív feltárás irányába hatnak. Ennek viszont határt szab a termékek bomlása és denaturálódása. A bevitt energia jelentős része mindkét berendezésnél hővé alakul. A nagynyomású homogenizátoroknál ez gyakorlatilag pillanatszerűen hővé alakul a szelepből. A feltárt anyag hőmérséklete erősen emelkedik, legalábbis az áthaladás ideje alatt (3.4.6.1. ábra). A hőfejlődés a gyöngymalmoknál is jelentkezik, de időben és térben nem koncentrálódik a annyira.



3.4.6.1. ábra: A nagynyomású homogenizátor hőeffektusa

3.5. Nem-mechanikai módszerek

A megfelelő laboratóriumi sejtfeltárási módszer kiválasztásánál több tényezőt kell figyelembe venni, pl. a rendelkezésre álló sejtmennyiséget, a kinyerni kívánt komponens érzékenységet (hőmérsékletre, vegyi anyagokra, proteolitikus enzimekre), a feltárás kívánt mértékét, megengedhető időtartamát. Az esetek túlnyomó részében a lehető legkíméletesebb módszer alkalmazása kívánatos. Ha a vizsgálatok legalább távlati célja a kinyerendő termék nagyobb léptékű előállítása, célszerű már laboratóriumi szinten egy léptéknövelhető módszert választani.

A nem-mechanikai módszereket tovább csoportosíthatjuk fizikai, kémiai és biológiai feltárássra.

3.5.1. Fizikai módszerek

A fizikai módszereket, mint pl. a fagyasztás-felolvasztás ismételt ciklusokban, hőkezelés és szárítás számos esetben alkalmazták.

A fagyasztás-felolvasztás általában sok ciklus után is elég rossz hatásfokú, ráadásul meglehetősen időigényes. Az élelmiszeriparral és a törzsfenntartással szemben itt a lassú hűtés és felmelegítés hatásos. Az előbbi két esetben a sejtek épsége érdekében a gyors hűtéssel sok apró jégkristály kialakulását segítik elő, míg a lassú hűtés kevesebb, de nagyra növekvő jégkristályt eredményez, amelyek roncsolják a sejtes szerkezetet. A hosszadalmas folyamat során a kiszabaduló anyagok egy része el is bomlik, és fennáll a befertőződés veszélye is.

3.5.1.1. Szárítás, hőkezelés

A hőkezelés végbemehet vizes közegben, illetve szárítás közben, ahol a folyamat végén már száraz állapotban éri a hő a biomasszát. A fermentlé hőkezelése 60–100 fokon (hősokk), gyakran pH-állítással kombinálva sok esetben javítja a sejttömeg szűrhetőségét, és részleges vagy teljes sejtfeltárással járhat. A feltáródás mechanizmusa kettős. A magas hőmérséklet hatására egyes fehérjék denaturálódnak, és a citoplazmamembrán lipidjei félfolyékony állapotból olvadt állapotba kerülnek, kettős réteg helyett cseppeket, micellákat alkotnak. Példa: B₁₂ vitamin fermentlé feldolgozása, ahol melegítés és kalcium-hidroxid beadagolásának hatására az intracelluláris vitamin kilép a lébe.

A szárítás során (dobszáritó, porlasztva szárító) a sejtek magas hőmérsékletnek vannak kitéve, és ez veszélyezteti a komponensek biológiai aktivitását, pl. a fehérjék denaturálódását okozhatja. Bár az anyag hőmérséklete a víztartalom elfogytaig nem haladja meg a nedves hőmérő hőmérsékletét, ez is olyan változásokat idéz elő, hogy a szárított sejtanyagból csak rossz hatásokkal extrahálhatók a fehérjék. Emiatt az atmoszférikus nyomáson, 100–105 fokon szárítást ritkán alkalmaznak. Példa: szárított pékélesztő gyártása. A sejtek egy jelentős része a szárítás során elpusztul, de az erjesztőenzimek aktivitása megmarad, szén-dioxid termelésére képesek.

A szárítás nem minden esetben történik magas hőmérsékleten. A liofilizálás (fagyasztva szárítás) legalább is a folyamat elején, fagyponthoz alatti hőmérsékleten megy végbe. A fagyasztott és mélyhűtött sejtömegekre nagyvákuumot adnak. A jég szublimál, felületéről folyamatosan vízmolekulák lépnek ki egyenesen a gőzfázisba. A vákuum megnöveli a molekulák szabad úthosszát, így azok nagyobb valószínűséggel távoznak el a vákuumszivattyú felé a rendszerből. A könnyen eltávolítható nedvesség elfogytaival a kötöttebb vizet a hőmérséklet fokozatos emelésével hajtják ki, de a vég hőmérséklet sem haladja meg a 20-30 fokot. A liofilezés törzselértékelési módszer is, az így tartósított sejtek évekig, évtizedekig megőrzik genetikai tulajdonságaikat és szaporodóképességüket. A különbség az eltartó és a feltároló liofilezés között a védőközegek alkalmazásában és hőmérsékletprofilban van. Védőközegeként hidrophil anyagokat, cukrokat, fehérjéket adnak a sejtekhez, amelyek beburkolják és tartósítják azokat. Védőanyagok nélkül a sejtmembrán a fagyasztva maratótechnikaéhoz hasonlóan a felszínre kerül, és sok apró rész keletkezik rajta. Pufferben felvéve a nyílásokon keresztül a sejt beltartalma kioldódik.

3.5.1.2. Oldószeres feltárások

A szárítási eljárások közé besorolható be az oldószeres szárítás is. Ehhez vízzel elegyedő, alacsony forráspontú oldószert használnak, jellemzően acetont. A sejtömeget leszűrjük (például Büchner-tölcséren), és még a szűrőn, szívás közben acetonnal többször mossuk. A víz oldószerkelet formájában kimosódik a sejtek közül, a maradék oldószer pedig az átszívott levegőbe elpárolog. (A párolgás hőelvonása olyan erős lehet, hogy a tölcser kívülről deresedhet a labor levegőjéből ráfagyott párából.) Az így kapott porszerű, szárazon pergő preparátumot nevezik acetonpornak (jellemzően élesztőből készítenek ilyen, 3.5.1.2.1. ábra).



3.5.1.2.1. ábra: Acetonpor élesztőből

Könnyen kezelhető, bemérhető, homogén, napokig, hetekig tárolható anyag, sokkal kényelmesebben lehet vele dolgozni, mint a romlékony, autolizáló, kenődő élesztő sejtömegeggyel. Az acetontól a sejtek szerkezete még nem károsodik. Hatékony feltárást akkor lehet elérni, ha a szárítás után erősen apoláros oldószerral kioldjuk a lipideket, azaz eltávolítjuk a citoplazmamembránt. Erre a célra laboratóriumban étert szoktak alkalmazni. Veszélyessége ellenére azért jó választás, mert alacsony forráspontja miatt könnyen, gyorsan és maradéktalanul eltávolítható a preparátumból. Az

éteres kezelés után újra vizes közegben dolgozhatunk, pufferek alkalmazásával oldhatjuk ki a szükséges komponenseket.

Felmerülhet a kérdés, hogy miért nem lehet egyből éteres kezeléssel kezdeni, miért van szükség az acetonnal. A éter nem elegyedik vízzel, így a sejtek között és a felületükön lévő víz távol tartja az oldószert, nem lehet a lipideket kioldani. Az acetonnal vízmentesített sejteket viszont már nedvesíti az apoláris folyadék.

Oldószereket alkalmaznak az autolízis elősegítésére is. Élesztő sejtömeghez kis mennyiségű (2-3%) toluolt adva néhány nap alatt teljes bomlást érhetünk el. Ez valójában enzimes folyamat, amelynek során a lipidmembránok felbomlásával kiszabaduló enzimek bontják le a sejt anyagait.

3.5.1.3. A sejtben belüli nyomás növelése

Kíméletes feltárási módszer az ozmotikus sokk. A sejteket nagy ozmózisnyomású oldattal (1 M glicerin, 1 M glükóz) hagyják kiegyenlítődni, majd desztillált vízbe viszik át a szuszpenziót. Legegy-szerűbben úgy valósítható meg, hogy a sejteket a tömény oldatból lecentrifugáljuk, a felülúszót dekantáljuk, és a leülepedett réteget nagy mennyiségű vízzel vesszük fel. A sejtekbe behatoló víz erősen megnöveli a belső nyomást, amely szétszakíthatja a sejtfalet. Ez a módszer csak a leggyengébb falú sejtekre hatásos (ld. a bevezetőt). Nagyon hasznos viszont kombinációban, enzimes kezelés vagy falszintézis gátlás után, esetleg az autolízis hatékonyságának javítására.

Szintén kíméletes módszer a feltáráshoz a dekompreszió alkalmazása. Ez a gázok oldhatóságának nyomásfüggésén alapszik, amit a Henry-törvénnyel írhatunk le. Eszerint a permanens gázok oldhatósága lineárisan növekszik a parciális nyomással. Ha tehát egy bombában (3.5.1.3.1. ábra) a sejtsuszpenzió fölött a gáz nyomását megnöveljük (10–20 Mpa), akkor az egyensúly beállta után az oldott gáz koncentrációja a folyadékban, és a sejtekben is 100-200-szorosára növekszik.



3.5.1.3.1. ábra: Dekompresziós bombák (katalógusfotó)

A nyomást hirtelen csökkentve az oldott gáz buborékokat alkotva szabadul fel a folyadékból. A sejtek belsejében keletkező buborékok valóságban szétpukkasztják a sejtfalet. A módszer kíméletes, mert az alkalmazott inert gázok (pl. N_2O) nem lépnek reakcióba a biológiai anyagokkal. A gázok oldhatósága hőfejlődéssel jár, de ha gázpalackból vesszük a gázt, felmelegedés nem észlelhető. A kiterjedés viszont éppen hőelvonással jár, tehát ebben a szakaszban nem éri károsodás a termékeket.

3.5.2. Kémiai módszerek

A sejtek kémiai kezelése két célt szolgálhat: egyes sejtalkotórészek extrakcióját vagy a sejt lízisét. A lúgos kezelés kioldja a legtöbb sejtalkotót, de általában a sejtfa szerkezete megmarad. Teljes hidrolízist lehet elérni pl. 6 n sósavval, 6–12 óra alatt, de ekkor a fehérjék is aminosavakra bomlanak. Tömény élesztőszuszpenziók savas kezelése reflux alatt igen jó feltárást eredményez, de elvesz a vitaminok, fehérjék és színyanyagok egy része.

Más vegyi anyagok, pl. butanol vagy karbamid szintén hatásosak, de a keletkező masszából nehéz elválasztani a kívánt terméket, és toxicitási problémák is felléphetnek.

Átmenet a biológiai és kémiai módszerek között a detergensok és az antibiotikumok alkalmazása. Ezek szelektíven a citoplazmamembránt károsítják, ezáltal kismólsúlyú anyagok kiáramlását és ezzel a sejt pusztulását idézik elő. A szintetikus detergensok (kationos és anionos egyaránt) széles skálája alkalmazható a membránstruktúra felbontására, viszont számos molekulánál, pl. fehérjéknél denaturálódást okozhatnak. A kórházi fertőtlenítőszer nagy része ilyen elven működő kationos detergens. Hasonlóképpen viselkednek a természetes detergensok (pl. epesavak) is.

Az antibiotikumok közül a membránfunkciót károsító anyagok két csoportba sorolhatók. A peptid típusú antibiotikumok (polimixin B, tirocidin C, gramicidin S) detergens jellegű ciklopeptidek, amelyek a baktériumok biológiai membránjaiba beépülve tönkreteszik azt. A polién típusú antibiotikumok (amfotericin B, nisztatin, candicidin) szintén detergens jellegű vegyületek, amelyek viszont csak a gombák membránját károsítják. Ez a szelektivitás annak köszönhető, hogy a membrán szteroid típusú vegyületeivel lépnek kölcsönhatásba, és a prokarióták membránja nem tartalmaz ilyeneket. Hatásukat viszonylag lassan fejtik ki.

Az antibiotikumok egy másik csoportja is lizálja a sejteket, de a hatásmechanizmus egészen más. A falszintézist gátló antibiotikumokat (pl. penicillint, cikloserint, bacitracint) a növekedés késői szakaszában adagolják a tenyészethez a lízis kiváltására. A kezelés akkor hatékony, ha az osztódás még nem fejeződött be, mivel a falhiányos sejtek legkönnyebben a következő osztódásnál bomlanak fel.

3.5.3. Enzimes módszerek

Sokat tanulmányozott módszer a sejtfa enzimes bontása. Számos enzimet azonosítottak, amelyek a sejtfa jellemző anyagait, kémiai kötéseit bontják (pl. lizozim, mannanáz, celluláz, kitináz, csigaenzim, *Trichoderma*-enzimek).

3.5.3.1. táblázat: Sejtfaakat bontó specifikus enzimek

Organizmus	Enzim
Baktériumok	lizozim
Élesztők	mannanáz (Yeast Lyase, <i>Cytophaga sp.</i>)
Penészek	kitináz, celluláz
Algák, növényi sejtek	celluláz

Az enzimes lízisnek csak egyik előfeltétele a megfelelő enzim kiválasztása, meg kell találni az optimális alkalmazási módot is. Sok mikroorganizmus csak a növekedés egy bizonyos szakaszában, vagy csak különleges tenyésztési körülmények között (pl. Mg-hiány) érzékeny az enzimekre. A bontásra látszólag érzéketlen fajok között is vannak olyanok, amelyek besugárzás, nagy sókoncentráció vagy biológiai faktorok jelenlétében érzékennyé válnak. Több enzim kombinációjával általában jobb eredményt lehet elérni mint egyfajta enzimmal. Az enzimes kezelés előnye, hogy specifikusan csak néhány kötésre irányul, más anyagok nem bomlanak el, és a fiziológiához hasonló körülmények között megy végbe. A lítikus hatású enzimek viszont jelenleg drágák, és az ismertek közül csak kevés van kereskedelmi forgalomban.

Nagy léptékben is gyártanak egy *Cytophaga sp.* által termelt, élesztősejtfaat bontó enzimet (Yeast Lyase). Szabad és szénhidráthoz kötött formában egyaránt aktív, mindkét formában alkalmazható.

A legtöbb mikroba képes a sejtfal polimereit bontó enzimeket is szintetizálni, mivel a növekedés során szükség van a sejtfal „tágítására” is. Bizonyos környezeti feltételek megváltozása átállíthatja a sejt anyagcseréjét, megindíthatja ezeknek a falbontó enzimeknek, vagy más autolitikus enzimeknek a túlermelését. Indítólökésként szolgálhat a hőmérséklet, a pH, az ionerősség megváltozása, vagy ezek kombinációja. Az autolízishez általában hosszabb idő szükséges (2–20 óra), és a hatékonysága is meglehetősen kicsi. Ráadásul számottevő termékvesztéssel, denaturálódással kell számolni, mivel a kiszabaduló enzimek a hosszú inkubációs idő alatt elbontják a rendelkezésre álló szubsztrátokat (pl. a proteázok a többi fehérjéket).

Az enzim sejtlebontás tipikus termékei a különféle élesztőautolizátumok, plazmolizátumok és hidrolizátumok. Az élesztő autolízise 12–24 óra alatt végbemegy 45–50 °C-on. Kis mennyiségű nátrium-klorid, etil-acetát, toluol vagy kloroform hozzáadása meggyorsítja a folyamatot. Az elbontatlan sejtfalakat eltávolítva tiszta extraktum kapható.

3.5.4. Biológiai módszerek

Ide sorolhatók a genetikai módszerek (falhiányos mutánsok, fágok, programozott lízisű törzsek). Ezek nagy része csak laboratóriumi eljárás, de a nagyléptékű tenyésztésnek nincs elvi akadály. Sajnos ezek a módszerek gyakran együtt járnak a fehérjék károsodásával, denaturálódásával, ezért nem mindig alkalmasak enzimek előállítására vagy élelmiszeripari célokra, ahol a fehérjék biológiai működése lényeges.

Kevésbé vizsgált terület a fágfertőzéssel létrehozott enzim bontás. A lízis két irányból indulhat: kívülről és belülről. A fertőzés során a fág által hordozott enzim hidrolizálja a gazdasejt falát, hogy a nukleinsav bejuthasson a sejtbe. Ha a fertőzés erős, a sejt felbomolhat, mielőtt a fágok belépnének a sejtbe (lízis kívülről). Más esetekben a fág reprodukciója során a sejtben képződik egy olyan enzim, amely lízist okoz, és ezáltal lehetővé teszi az új fággeneráció kiszabadulását (lízis belülről). Mivel a fág átállítja a sejt anyagcseréjét, a kiszabaduló sejtanyag összetétele más lehet, mint amit egészséges tenyészetből más feltárási módszerrel kaphatunk.

A programozott sejtlyízis nagy léptékű megvalósítására is folynak erőfeszítések. Létezik már pl. olyan *Saccharomyces cerevisiae* törzs, amely autolízist szenved, ha a hőmérsékletet 27 °C-ról 37 °C-ra emelik. A hőmérsékletváltozás önmagában nem elegendő, megfelelő sejt koncentráció és fiziológiai állapot is szükséges a lízis kiváltásához.

3.6. Összefoglalás

Áttekintve a sejtfeltárási módszereket, megállapíthatjuk, hogy nincs egy „legjobb” művelet, sokféle mechanikai, fizikai, kémiai és biológiai módszerből kell kiválasztani az adott esetre legmegfelelőbbet. Nagy részük csak laboratóriumi használatra alkalmas, de néhányat továbbfejlesztettek félüzemi, sőt üzemi szintre is. A megfelelő feltárási módszer kiválasztásánál több tényezőt kell figyelembe venni:

- az adott mikroorganizmus érzékenységét az egyes feltárási módszerekre (ez elsősorban a sejtfal szerkezetétől függ)
- a kinyerni kívánt termék stabilitását a feltárási körülményei között
- a feltárási után keletkező homogenizátum további feldolgozási lehetőségeit
- a módszer sebességét és időigényét
- a módszer egyszerűségét, megbízhatóságát, reprodukálhatóságát és nem utolsósorban költségeit
- a feldolgozandó sejtek mennyiségét és az elérendő kihozatait.

Mivel igen sok genetikai és környezeti tényező határozza meg a mikrobasejtek szilárdságát, ellenállóképességét, és a műveleti paraméterek is széles körben változtathatók, ezért a feltárási művelet elméleti alapon nem tervezhető. Az általános (heurisztikus) irányelvek és a kísérleti eredmények együttesen alapozhatják meg egy új feltárási lépés optimalizálását.

3.6.1. táblázat: Különböző típusú mikroorganizmusok relatív érzékenysége

	ultrahang	gyöngymalom	homogenizátor	X-press
állati sejtek	7	7	7	7
Gram-negatív baktériumok	6	5	6	6
Gram-pozitív pálcák	5	4	5	4
élesztők	3,5	3	4	2,5
Gram-pozitív kokuszok	3,5	2	3	2,5
spórák	2	1	2	1
micélium	1	6	1	5

A különböző típusú mikroorganizmusok érzékenységét rangsorolja négy feltárási módszerrel szemben a 3.6.1. táblázat. A sorrend mind a négy metodika esetében hasonló. Feltűnő kivétel viszont, hogy az igen ellenálló micéliumok milyen érzékenyek a gyöngymalmokkal vagy fagyasztva préseléssel végrehajtott kezelésre.

A sejtfa szerkezetének és a szerkezetet befolyásoló tenyésztési körülményeknek az ismerete nem csak a megfelelő feltárási technika kiválasztását segíti elő, hanem a feltárási lépést megkönnyítő fermentációs technológia kialakítását is.

Két mechanikai módszer, a gyöngymalom és a nagynyomású homogenizáló félüzemi, üzemi szinten is alkalmazhatónak bizonyult. A készülékek ára (beruházás) és az energiaszükséglet (működési költségek) egyaránt nagy. A bevitt energia túlnyomó része ráadásul hővé alakul, amit erőteljes hűtéssel kell eltávolítani, hogy a kiszabaduló komponensek hő okozta denaturációját vagy inaktiválódását megakadályozzuk.

Az enzim bontást még nem alkalmazták félüzemi méretekben, de mégis ígéretes, mint egyszerű és kíméletes módszer. Az alapvető probléma az enzim ára. A módszer elterjedésére akkor lehet számítani, ha az olcsó enzimek előállítás vagy a többszöri felhasználhatóság megoldódik. A feltárási egyszerűsítésének másik, genetikai útja a vékonyabb falú vagy bizonyos körülmények hatására autolizáló törzsek létrehozása.

3.7. Ajánlott irodalom

- Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F.: *Biochemical Engineering* 13. fejezet. AP, NY. (1973)
- Bartnicki-Garcia, S.: *Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi*. Annu. Rev. Microbiol. 22, 87–108 (1968)
- Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, W.S.: *Downstream processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons, (1988)
- Demchick, P.H., Koch, A.L.: [The permeability of the wall fabric of Escherichia coli and Bacillus subtilis](#). Appl Environ Microbiol 46 (4): 941–3. (1983).
- Dunnill, P. and Lilly, M.D.: *Protein extraction and recovery from microbial cells*. In: Tannenbaum S. R. and Wang, D.I.C. (eds): Single-Cell Protein II. pp 179–207. MIT Press, Cambridge, USA (1975)
- Edebo, L., Magnusson, K.E.: *Disintegration of Cells and Protein Recovery*. Pure and Applied Chem. 36, 325 (1973)
- Edebo, L.: *Disintegration of cells*. In: Perlman, D. (ed): Fermentation Advances. AP, NY, (1969)
- Hughes, D.E., Wimpenny, W.T., Lloyd, D.: *The disintegration of micro-organisms*. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W.: Methods in Microbiology, Vol. 5B. AP, NY, (1971)
- Kelly, W.J., and Muske, K.R.: *Optimal operation of high-pressure homogenization for intracellular product recovery*. Bioprocess Biosyst Eng 27, 25–37. (2004)
- Kula, M.-R. and Horst S.: *Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cells*, Biotechnology Progress, 3, No.1. (1987).
- Kula. M.R., Schütte, H.: *Purification of proteins and the disruption of microbial cells*. Napjaink biotechnológiája 19. OMFB/FBI/OMIKK (1989)
- Lilly, M.D., Dunnill, P.: *Isolation of intracellular enzymes from microorganisms - the development of a continuous process*. In: Perlman, D. (ed): Fermentation Advances. AP, NY, (1969)
- Luther, H.: *Characterisation of the mechanical disintegration of micro-organism cells with the aid of conductivity measurement*. Die Nahrung, 24, 265-272 (1980)
- Márffy, F., Kula, M.R.: *Enzyme Yields from Cells of Brewer's Yeast Disrupted in a Horizontal Disintegrator*. Biotechn. Bioeng. 16, 623 (1974)
- Moo-Young, M. (ed): *Comprehensive biotechnology*, 2. kötet, Pergamon, Oxford (1985)

- Pécs, M., Nyeste, L.: *A mikrobajetek feltárása*. Folia Biotechnologica 37, pp 1-48 (1989)
- Reed, G., Pepler, H.J.: *Yeast Technology*, pp 355–366 AVI, Westport (1973)
- Rehm, H.J. et al: *Biotechnology. Vol. 3.: Bioprocessing. III. Product recovery and purification*. VCH, Weinheim, (1995)
- Robyt, J.F. and White, B.J.: *Biochemical techniques. Theory and practice*. Brooks/Cole Publishing Co. Monterey, (1987)
- Subramanian, G.: *Bioseparation and Bioprocessing*, Wiley-VCH, (1998)
- Tannenbaum, S.R.: *Factors in the processing of single-cell protein*. In: Mateles, R.I., Tannenbaum S.R. (eds): *Single-Cell Protein* pp 343–352. MIT press Cambridge, USA (1975)
- Wimpenny, J.W.T.: *Breakage of Micro-organisms*. Process Biochem. 41, (7) (1967)

4. KONCENTRÁLÓ MŰVELETEK

Bevezetés

Ha egy fermentlé feldolgozása során eljutunk odáig, hogy a termék homogén oldatban van, azaz túl vagyunk a sejtválasztáson és az esetleges sejteltávolításon, akkor az általános séma szerint koncentráló műveletekkel érdemes folytatni. Segítségükkel eltávolíthatjuk a vizet, és ezzel együtt megszabadulunk jó néhány szennyezőanyagtól is. Célszerűen más fázisba visszük át a terméket, illetve membránműveletekkel választjuk el a kisebb molekuláktól. A Bevezetés fejezetben írottaknak megfelelően a koncentráló műveletek között tárgyaljuk az extrakciót, az adszorpciót, a csapadékképzést és a membránműveleteket.

4.1. Extrakció

Az extrakció (kioldás, kivonatalás) szétválasztó, két- vagy többfázisú anyagátviteli művelet, megoszláson alapuló elválasztási módszer. A kiinduló anyag (oldat, elegy, keverék) adott összetevőjét (összetevőit) nyerjük ki szelektív módon, oldószer segítségével. Az elválasztás elve a molekulák eltérő oldhatóságán (azaz polaritásán) alapul. A víz, mint nagyon poláris oldószer, a poláris/ionos anyagokat oldja jól, a kevésbé poláris szerves oldószerek viszont az apoláris jellegű vegyületeket. Megfelelő polaritású oldószerek kiválasztásával adott polaritású komponensek szelektíven extrahálhatók.

A szétválasztás után a kinyerendő komponens már könnyebben elválasztható az oldószertől (pl. oldószer lehajtása bepárlással), amely ezután újra hasznosítható a művelet során.

Az extrakció műveletét a vegyipar szinte minden területén alkalmazzák, de ebben a fejezetben csak a biotechnológia területén használatos ismereteket tárgyaljuk. A Vegyipari műveletek tantárgy tartalmazza az extrakció kvantitatív leírását, az anyagforgalmat, a berendezéseket, azok méretezését. Itt az anyagi minőség hatásait, és néhány speciális extrakciós technikát tárgyalunk. Előbb néhány rövid fogalom meghatározás:

Az extrakciós műveletek csoportosítása:

1. *Folyadék-folyadék (F-F) extrakció (angolul: liquid-liquid extraction, LLE)*: mind a kiindulási anyag, mind az oldószer folyadékfázisú (szolvens extrakció).

2. *Szilárd-folyadék (S-F) extrakció (angolul: solid-liquid extraction, SLE)*: a kiindulási anyag összetett szilárd anyag, ennek oldható komponenseit vonjuk ki folyékony extrahálószerrel (diffúziós extrakció; pl. cukorgyártás, teafőzés).

3. *Szuperkritikus extrakció (SCE)*: a kiindulási anyag szilárd (esetleg folyadékelegy), az oldószer fluid állapotban lévő, nagynyomású gáz (például a kávé koffeinmentesítése).

A fermentlevek feldolgozásánál tipikusan a vizes fázisú levet extraháljuk szerves oldószerral, ezért csak a folyadék-folyadék extrakcióval foglalkozunk. Ez esetben két, egymással nem elegyedő folyadék között egy egyensúlyi megoszlási folyamatban az adott oldott anyag megoszlik a két fázis között. Az egyensúly beállításának sebessége az érintkező felület nagyságának a növelésével növelhető, ezért a gyakorlatban a két fázist nagyon finom eloszlásban diszpergálják egymásba (pl. heves és intenzív rázással, befúvatással, turbulens keveréssel). Az egyensúly beállása után a fázisoknak elegendő időt kell hagyni a sűrűség különbség szerinti szételegyedésre, illetve ha ez a gravitáció hatására nem, vagy csak igen lassan megy végbe, centrifugálással választjuk szét az oldószereket.

A két fázis között megoszló anyagra az ún. megoszlási hányados (k) jellemző:

$$k = \frac{c_x}{c_y}$$

ahol c_x – az anyag koncentrációja az extraktumban
 c_y – az anyag koncentrációja a raffinátumban

A megoszlási hányados (k) két adott, egymással nem elegyedő oldószer esetén, adott hőmérsékleten az extrahált anyagra nézve jellemző állandó. Ez az állandóság csak ideális esetben – egyáltalán nem elegyedő híg oldatok esetében – áll fenn. A gyakorlatban általában $k \neq$ konstans, és a koncentráció viszonyokat a kísérleti úton felvett egyensúlyi görbék segítségével, grafikus vagy numerikus módszerrel lehet meghatározni.

A folyadék-folyadék extrakció a szilárd-folyadék extrakcióhoz hasonlóan lehet *szakaszos*, és *folyamatos* is. A folyamatos extraktorokat általában ellenáramban működtetik.

4.1.2. Szakaszos extrakció

Szakaszos extrakció esetén általában a megoszlási egyensúly (egyszer vagy többször) beáll, és a folyadékfázisok összekeverése és a szétválasztása térben vagy időben elkülönítve történik. A folyamatot legegyszerűbben az anyagmérleg felállításával írhatjuk le.

$$W_o \cdot c_{x,be} + W_v \cdot c_{y,be} = W_o \cdot c_x + W_v \cdot c_y$$

ahol: W_o – a szerves (organikus) fázis mennyisége
 W_v – a vizes fázis mennyisége
 $c_{x,be}$ – az extrahált anyag koncentrációja a bevitt szerves fázisban
 $c_{y,be}$ – az extrahált anyag koncentrációja a bevitt vizes fázisban
 c_x, c_y – az extrahált anyag koncentrációja az egyensúly beállta után

Ha tiszta oldószerrel végezzük a műveletet, akkor $c_{x,be} = 0$. Ekkor az utolsó taggal végigosztva az

$$\frac{c_{y,be}}{c_y} - 1 = \frac{W_o}{W_v} k = E = \text{extrakciós faktor}$$

alakot kapjuk. A fázisarány szorozva a megoszlási hányadossal adja az extrakciós faktort, amelynek segítségével a paraméterek könnyen kifejezhetők:

$$c_x = \frac{k \cdot c_{y,be}}{E + 1} \text{ és } c_y = \frac{c_{y,be}}{E + 1};$$

Az extrakció hatékonyságát pedig a

$$P = \frac{W_o \cdot c_x}{W_v \cdot c_{y,be}} = \frac{E}{1 + E} = \text{kinyert hányad}$$

kiszámításával jellemezhetjük.

4.1.3. Folyamatos extrakciós berendezések

A folyamatos betáplálású, ellenáramú extraktorokban a változó koncentrációk miatt nem áll be egyensúlyi állapot, az állandósult állapotban a készülékben az anyagátadás hajtóereje (az egyensúlyi és az aktuális koncentráció közti koncentráció különbség) is állandósul.

Az ipari folyamatos extraktorokat szerkezetük és működésük alapján a következő csoportokba sorolhatjuk:

– *oszlopszerű berendezések*

- külső mechanikai energia nélkül működő (gravitációs) oszlopok
- forgóelemes oszlopok
- alternáló mozgású elemekkel ellátott berendezések
- pulzáló vagy folyadékklüktetési extraktorok

– *centrifugális extraktorok*: a centrifugális elven működő készülékek között vannak olyanok, amelyek csak a fázisok szétválasztását végzik a sűrűségkülönbség alapján, de léteznek olyan komplex berendezések is, amelyek a folyadékaromákat áthaladásuk során többszörösen összekeverik és szétválasztják.

– *keverő-ülepítő extraktorok* (mixer-settler): több szakaszos extraktor összekapcsolásával (kaskád) jön létre. Minél több lépcsőt tartalmaz, annál jobban közelíti az ideális ellenáramú folytonos berendezést.

4.1.4. Az extrakciót befolyásoló tényezők

Az anyagi minőség felől közelítve az extrakció irányítására két elvi lehetőség van: vagy az oldószer, vagy az oldott anyag tulajdonságait változtatjuk meg. Kezdjük előbb az oldószerrel.

4.1.4.1. Az oldószer polaritása

A polaritás beállításának legegyszerűbb módja a rendelkezésre álló oldószerrel közül a megfelelő polaritású kiválasztása, esetleg több oldószerből való kikeverése. Oldószert elméletileg az oldhatósági (solubility) paraméter alapján választhatunk:

$$\ln K = \frac{\bar{V}_y \cdot (\delta_A - \delta_y)^2 - \bar{V}_x \cdot (\delta_A - \delta_x)^2}{RT}$$

ahol: V_i – a parciális moláris térfogatok,

δ_i – az oldhatósági paraméterek (ezek a molekulákat alkotó atomcsoportok paramétereiből számíthatók).

A fenti elméleti megközelítés szerint szinte minden vízzel nem elegyedő szerves folyadék alkalmas lehetne extrakcióra. Ez azonban nem így van, a gyakorlati szempontok alaposan megrostálják a számításba vehető anyagok listáját:

- ár és hozzáférhetőség
- szelektivitás, jó oldóképesség
- elegyedés/oldhatóság a másik fázisban kicsi legyen
- a sűrűségkülönbség a fázisok között nagy legyen (a szétválaszthatóság miatt)
- fizikai jellemzők (μ , forr. pont, felületi feszültség)
- veszélyesség (tűz-, és robbanásveszély, toxicitás)
- regenerálhatóság (az oldószer visszanyerése - az oldószerkeletyknél problémás lehet)
- az oldószer kémiaiilag stabil legyen, a többi komponenssel ne reagáljon, a szerkezeti anyagokat ne támadja meg
- viszkozitás, gőznyomás, fagyáspont értéke kicsi legyen, a könnyebb kezelhetőség és tárolás szempontjából.

Az oldószer kiválasztásához segítséget nyújthat a klasszikus polaritási sor, amelyben a leggyakoribb oldószer/oldószercsoportok csökkenő polaritás szerint szerepelnek (4.1.4.1.1. táblázat).

4.1.4.1.1. táblázat: Oldószerek polaritási sora

Víz	
Metanol	vízzel elegyedő oldószerek
Etanol	
Aceton	
Acetonitril	elegyedési határ
Észterek	oxigéntartalmú oldószerek
Éterek	
Szénhidrogének	erősen apoláris oldószerek
Halogénezett szénhidrogének	

A műveletnek a technológiában elfoglalt helye szerint választhatunk „erős” (= erősen apoláris), vagy „gyenge” (= kevésbé apoláris) oldószert. Eszerint megkülönböztetjük a totális és szelektív extrakciót.

Totálextrakció: erősen apoláris oldószerral (pl.: diklór-metán) minden apoláros anyagot, még a sejtek lipidjeit is kivonjuk a fermentléből.

Szelektív/differenciál extrakció: pontosan beállított polaritású oldószerral/oldószer-keverékkel egy komponens kioldására törekszünk a többi közül (szteroidok, alkaloidok).

Példaként vizsgáljunk meg egy szteroidfeldolgozási technológiát, amelyben mindkettőt végrehajtják. A feladat a szitoszterin \rightarrow 9α OH-androsztén-dion konverzió fermentlevének feldolgozása. A fermentlében a konverzió végén együtt van:

- ~ 12 g/l 9α OH-AD (termék)
- ~ 1-4 g/l szitoszterin (megmaradt szubsztrát)
- ~ 1-3 g/l egyéb szteroid melléktermék.

A feldolgozás lépései:

1. Totál-extrakció diklór-metánnal (mindent kiold, csúnya emulzió keletkezik, a sok felületaktív anyag miatt nehéz szétválasztani)
2. Az oldószeres fázis elválasztása és bepárlása (az oldószer lehajtása vákuumban, viaszos, zsíros szilárd anyag marad vissza)
3. Szelektív extrakció diizopropil-éterrel (a 9α OH-AD-t oldja, a maradék szitoszterint nem)
4. A maradék szelektív extrakciója metanollal (a szitoszterint oldja, a 9α OH-AD-t nem).

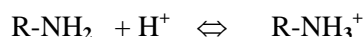
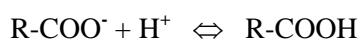
Hasonlóképpen a kétféle célú extrakció kombinációját láthatjuk a Kabay-féle eljárásban is az ópium alkaloidok kinyerésére és szétválasztására.

4.1.4.2. A kémiai tulajdonságok megváltoztatása

Amint látható, az oldószer megválasztásánál sok korlátozó tényezőt kell figyelembe venni, ezek nagyon leszűkítik a számba jöhető anyagok körét. A megoszlás befolyásolásának, irányításának lehetőségeit viszont szélesíti az, hogy a kémiai környezet megváltoztatásával a kioldandó termék oldhatóságát meg tudjuk változtatni, a megoszlási hányadost értékét növelni.

A pH megváltoztatása

Gyenge savak és gyenge bázisok esetében a pH megfelelő beállításával a disszociáció mértéke változtatható. Ezek a vegyületek a „gyenge” jelzöt azzal érdemelték ki, hogy disszociációjuk nem teljes, a disszociált és nem-disszociált forma egymás mellett, egyensúlyban létezik.

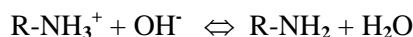


Az ionizált, töltéssel rendelkező forma értelemszerűen a vizes közegben oldódik jobban, a nem-ionos forma viszont inkább az apoláris, szerves oldószerekben. A két állapot közötti egyensúlyt a disszociációs állandóval írhatjuk le, gyenge savak esetén például:

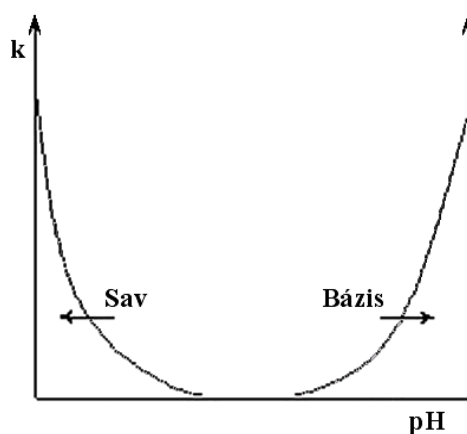
$$K_d = \frac{[R-COO^-][H^+]}{[R-COOH]}$$

Erős sav (H^+ ionok) hozzáadásával a gyenge sav disszociációja visszaszorítható, ezzel a nem-ionos forma kerül túlsúlyba, azaz a gyenge sav megoszlási hányadosa javul.

Gyenge bázisok esetében a jelenség tükörképe mutatkozik, erős bázis (OH^- ionok) hozzáadásával növelhető a megoszlási hányados.



Tehát, ha egy gyenge savat szerves fázisba szeretnénk vinni, akkor lefelé; míg, ha gyenge bázist, akkor felfelé kell tolni a pH-t. Minél távolabb kerül a pH az extrahálandó vegyület pK_d értékétől, annál hatékonyabb extrakcióra számíthatunk. Szerves fázisból vizesbe pedig mindkettőt semleges-közeli pH-jú oldattal (pufferrel) lehet átoldani.



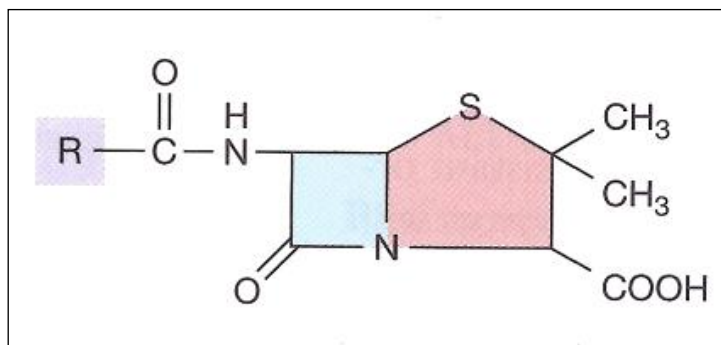
4.1.4.2.1. ábra: A pH hatása a megoszlási hányadosra

A megfelelő pH-n végrehajtott extrakcióval számos antibiotikum nyerhető ki a fermentléből. Az extrakciós pH beállításához irányadó pK_d értékeket a 4.1.4.2.1. táblázat foglalja össze.

4.1.4.2.1. táblázat: Néhány extrakcióval kinyert antibiotikum pK_d értéke

	pKd		
	Cefalosporin C	3,9	5,3
linkomicin (bázis)	6,65		
monensin (sav)	7,6		
novobiocin	1,8		
rifamicin B	2,1	6,7	
penicillamin	1,8		
penicillin K	2,77		
penicillin F	3,51		

Vizsgáljuk meg technológiai szempontból a **penicillin** extrakcióját! Ez egy bomlékony, gyenge sav típusú molekula, amely savas közegben gyorsan elbomlik.



4.1.4.2.2. ábra: A penicillinmolekula szerkezete

A feltételek ellentmondásosak, penicillin tartalmú levet az extrakcióhoz meg kellene savanyítani, de ettől a termék elbomlik. A bomlás minimalizálására két technológiai megoldást alkalmaznak:

- Hűtés: a bomlásnak, mint minden kémiai reakciónak a sebessége exponenciálisan függ az abszolút hőmérséklettől (Arrhenius-egyenlet), így hűtéssel (+4 °C) a bomlási sebesség jelentősen csökkenthető. A hűtés a megoszlási hányadost is befolyásolja, de csak minimális mértékben.
- A kontaktidő lerövidítése. Ezt a gyakorlatban úgy valósítják meg, hogy nem az egész, ~száz m³-nyi levet savanyítják meg, majd keverik össze az oldószerrel, hanem egy kisméretű, folyamatos kevert tartályban (CSTR) történik a savanyítás és az oldószer hozzákeverése, majd ezt azonnal követi a fázisok szétválasztása. A sav-bázis egyensúly és a megoszlási egyensúly beállításának ideje másodpercekben mérhető, így elegendő ilyen rövid érintkezési (= tartózkodási) időt beállítani. E rövid idő alatt pedig csak kis mértékű penicillin-bomlás következik be. A három betáplált anyag (fermentlé, oldószer, sav) összekeverése után az elegy szinte azonnal szeparátor centrifugára vihető, amely elválasztja a savas vizes oldatot a penicillint tartalmazó oldószerrel (amilacetát, néha halogénezett oldószer).

Ionpároképzés

Az ionos, sószerű molekuláknál az ellenion lecserélése megváltoztathatja a (k) megoszlási hányadost. Egy adott célmolekula oldhatósága erősen függ attól, hogy milyen polaritású ellenionnal képez sót. Szemléletes példa a kvaterner butil-amin megoszlása kloroform-víz rendszerben. Kloridionnal az oldhatóság a két fázisban szinte azonos. Ugyanez a kation acetátionnal sokkal jobban oldódik a kloroformban, a megoszlási hányados két nagyságrenddel nagyobb lett (4.1.4.2.2. táblázat)

4.1.4.2.2. táblázat: A tetrabutyl-ammónium sók megoszlása kloroform-víz rendszerben

	k (CHCl ₃ /H ₂ O)
(Bu) ₄ N ⁺ Cl ⁻	1,3
(Bu) ₄ N ⁺ acetát ⁻	132

A kloridion felületi töltéssűrűsége nagy, sok vízmolekulából összeálló hidrátburkot vonz maga köré. Az acetátionnal viszont a töltés „szétkenődik”, delokalizálódik a két oxigénatomon, a töltéssűrűség kicsi, a hidrátburok is jóval kisebb. Ráadásul ott van még egy metilcsoport is, ami erősíti az anion apoláris oldhatóságát. Ezekkel a hatásokkal értelmezhető a megoszlási hányados nagymértvű eltérése. Az acetát mellett használhatók még más szerves savak anionjai is:

- acetát
- butirát
- kolát (a kólsav anionja, ez egy szteránvázas karbonsav, az epesavak egyike)
- dodekanoát
- linoleát
- perfluoro-oktanoát
- tetrafenil borid (ez az egyetlen vegyület, amely nem karbonsav).

Az anionos típusú termékeknél az apoláris kationok javíthatják az extrahálhatóságot. A használt kationok között lényegesen kisebb a választék, kémiaiilag mindegyik kvaternerizált (tetra-alkil) amin, mint például $(\text{Bu})_4\text{N}^+$; $(\text{C}_{16})(\text{Bu})_3\text{N}^+$.

Reaktív extrakció

Elve hasonló az ionpárképzéshez, de a céltermék molekula és partnere között nem egyszerű sóképzés játszódik le, hanem a termék magával a kivonó oldószerrel lép valamilyen reverzibilis kémiai kölcsönhatásba (pl.: komplexképződés). A megoszlás nagyságrendekkel nagyobb mértékű, mint egy nem-reaktív extraháló oldószerrel. Tipikus komplexképzők:

- foszfo-vegyületek (trioktil-foszfinoxid, tributil-foszfát, di-2-etilhexilfoszfát)
- szulfoxidok
- alifás aminok.

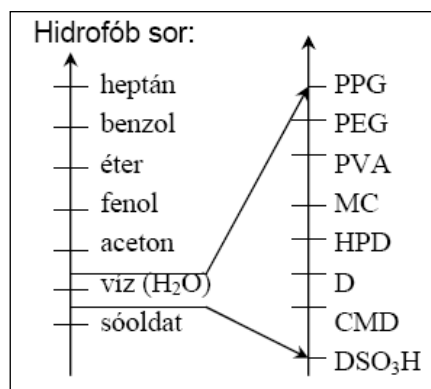
4.1.5. Speciális extrakciós módszerek

Az extrakció alapesetében egy vizes fázisban és egy szerves oldószer fázisban jön létre a megoszlás. A lehetőségeket tágítva több, rendhagyó fáziskombinációt dolgoztak ki, amelyek különösen alkalmasak a biológiai ipar érzékeny molekuláinak kivonására.

4.1.5.1. Vizes kétfázisú extrakció

Eddig az extraháló fázist szerves oldószernek neveztük, pedig az is lehet vizes alapú elegy. Ez nagyon szokatlan állítás, hiszen az általános vegyészeti gyakorlatban a vizes fázisok elegyednek egymással, nem válnak szét. Itt mégis ez a helyzet. Hogyan lehetséges ez?

A jelenség megértéséhez vegyük elő megint a polaritási sort:



4.1.5.1.1. ábra: Oldószerek és oldatok polaritási sora

(a rövidítések feloldása: PPG – poli-propilén-glikol, PEG – poli-etilén-glikol, PVA – poli-vinilalkohol, HPD – hidroxipropil-dextrán, D – dextrán, CMD – karboximetil-dextrán, DSO₃H – dextrán-szulfonsav).

Ha vízben jelentős mennyiségű (10-20%) polimert oldunk fel, akkor a létrejövő oldat polaritása jelentősen megváltozik a vízhez képest. Az oldott polimer polaritásától függően az oldat polaritása csökkenhet is (pl.: PPG), és növekedhet is (pl.: dextránszulfonsav). Ha két erősen eltérő polaritású oldatot hozunk össze, az két fázist alkot. A két fázis között pedig létrejön a megoszlás jelensége, ezt céltan kihasználva pedig megvalósíthatjuk az extrakció műveletét.

A polárisabb fázis lehet polimer oldat helyett tömény sóoldat is, a sók is növelik az oldószer polaritását. A leggyakoribb fázisképző párok: PEG – K_2HPO_4 , vagy a PEG – dextrán rendszer (a dextrán drágább, de a tömény sóoldat a fehérjék egy részét kicsapja). A többi poláris fázisképző anyag még többre kerül.

A polimereknél a polaritás, a sóknál az ionok hidratáltsága jellemzi a fázis polaritását. Az ionok hatásának összehasonlítására a klasszikus [Hofmeister-féle sorozat](#) alkalmas (ld. a [4.4.1. fejezetben](#)). Eszerint az anionoknál a többértékű ionok, a kationoknál pedig az alkáli ionok a leghatékonyabbak. Ennek megfelelően a leggyakrabban alkalmazott fázisképző sók: K_3PO_4 ; $MgSO_4$; $(NH_4)_2SO_4$; Na_2SO_4 ; $HCOONa$; K-Na-tartarát.

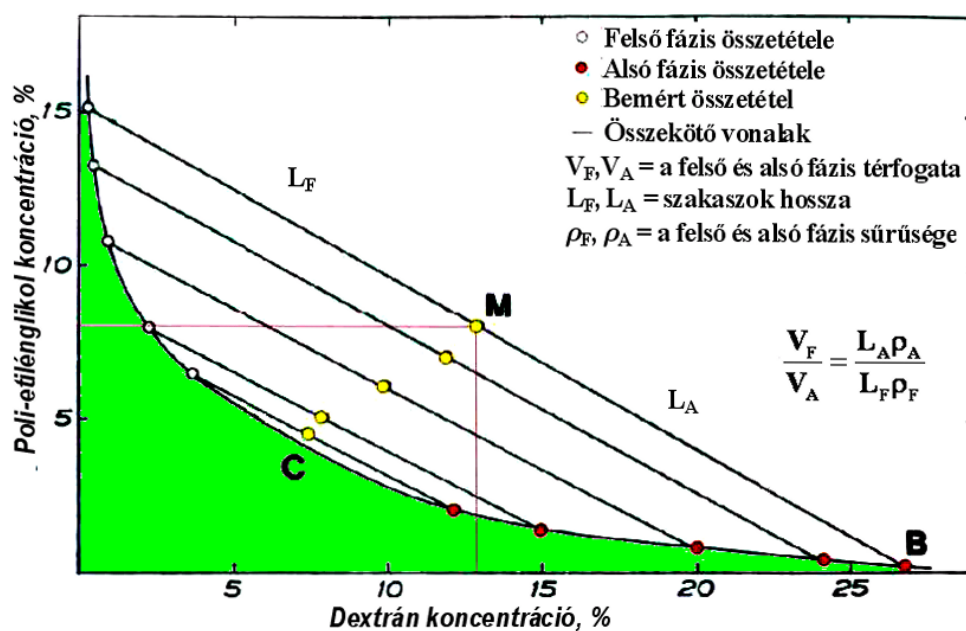
A vizes kétfázisú extrakció menetét laboratóriumi léptékben videón mutatjuk be.



4.1.5.1. videó: Vizes kétfázisú extrakció

A fázisokat poli-etilénlikolból és dextránból képezzük. A két fázis szétválását és az extrakciós hatást jód oldattal, illetve fenolftalein indikátorral szemléltetjük. Mindkét anyag az apolárisabb, felső fázisban dúsul fel.

A vizes kétfázisú rendszer egyensúlyi viszonyait a fázisdiagrammal lehet kvantitatívan jellemezni (4.1.5.1.2. ábra).



4.1.5.1.2. ábra: Vizes kétfázisú rendszer fázisdiagramja

A fázisdiagramon a zölddel jelölt terület egyfázisú, homogén folyadék. A C vonal fölötti összetételek eredményeznek két fázist. A diagram számértékei mutatják, hogy ehhez nagy anyagmennyiségek (5–25%) szükségesek. Az egyenes vonalak az egyensúlyban lévő felső és alsó fázisösszetételeket kötik össze. A vonalak nem feltétlenül párhuzamosak! A fázisdiagramon a mérlegszabály érvényes, az egyensúlyi vonalakat a bemért összetétel (M) olyan arányban osztja ketté, ahogyan a két fázis mennyisége aránylik egymáshoz.

Az extrakció hatékonyságát a fázisképzőkön kívül több paraméter is befolyásolja:

- pH: a nem-ionos polimerekre nincs hatással, viszont befolyásolja a fehérjék töltését és ezzel megoszlásukat.
- Ionok anyagi minősége: minden ion maga is megoszlík a két fázis között, így a beállított polaritáson túl az anyagi minőségnek is van szerepe.
- hőmérséklet: a rendszer egyik eleme sem érzékeny a hőfokra, a műveletet termosztálás nélkül, szobahőmérsékleten szokták végezni.

A kis molekulájú fermentációs termékek extrakciója általában nem jár bomlással, de a fehérjék nagy részét a szerves oldószerek kicsapják, denaturálják. A vizes kétfázisú extrakció viszont alkalmas a fehérjék, enzimek, sejtalkotók kíméletes extrakciójára. A polimer oldat makromolekulái védőközeget jelentenek a fehérjéknek, lassabban bomlanak, denaturálódnak, mint puffer oldatokban.

A vizes kétfázisú extrakció tipikus alkalmazása az intracelluláris enzimek (fehérjék) kinyerése feltárt sejtömegeből. A feltárt lé sok és sokféle fehérjét tartalmaz, ennek hatékony közbelső elválasztási lépése lehet az extrakció. Az elválasztás hatékonyságát affinkölcsönhatás beépítésével nagymértékben lehet fokozni (ld. később → affinextrakció).

A fázisok elválasztása után a fehérjéket el kell különíteni a fázisképző polimerektől illetve a sóktól. Erre a célra – hígítás után – ultraszűrést, vagy kromatográfias lépéseket alkalmaznak.

A művelet végrehajtása is több szakaszból áll, ezek időigénye lényegesen meghaladja a megoszlási egyensúly beállításának idejét. A műveleti sorrend:

- polimerek oldása (lassú),
- fázisok kialakulása (gyors),
- megoszlási egyensúly beállása (keveréssel, ~5-15 perc),
- fázisok szétválasztása (centrifugálással, lassú).

Ezek közül az első és utolsó (oldás, szétválasztás) lépés sebessége határozza meg az egész művelet időigényét.

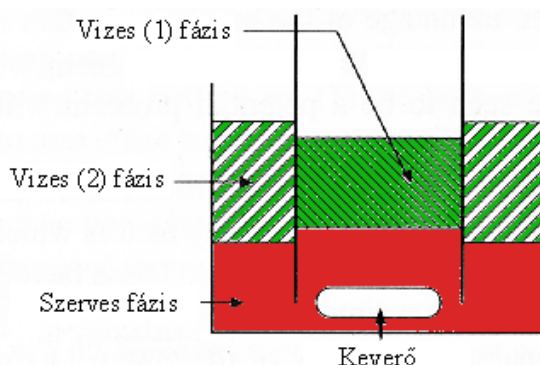
Minden ipari alkalmazásra szánt műveletnél alapkérdés a léptéknövelhetőség. A vizes kétfázisú extrakciónál mind a berendezés, mind a működtetés korlátlanul növelhető lenne, viszont a nagy volumenű alkalmazásnak határt szab a fázisképző polimerek magas ára. A polimerek sajnos nem, vagy csak nagy nehézségekkel regenerálhatók. A legnagyobb leírt eljárás 200 liternyi feltárt sejtet dolgozott fel egy menetben.

4.1.5.2. Szuperkritikus extrakció

A szuperkritikus jelző arra utal, hogy az extrakciós oldószer a kritikus hőmérséklet és a hozzá tartozó nyomás fölé vitt, fluid állapotban lévő gáz. Fluid állapotú oldószerekkel végzett extrakció alkalmazható a biológiai anyagok izolálásánál is, de csak behatárolt területen. Egyrészt elsősorban szilárd-folyadék extrakcióra használatos, másrészt a szükséges nagy nyomású berendezések miatt ipari léptékben nem alkalmazzák. A BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszékén Simándi Béla tanár úr csoportja magas tudományos szinten foglalkozik ezzel a művelettel, ennek oktatása is az ő feladatuk, így ezzel ebben a tananyagban nem foglalkozunk részletesen.

4.1.5.3. Folyadék emulziós membránok (FEM, LEM)

A művelet elnevezése egyáltalán nem utal extrakcióra, az emulzió kolloidikai fogalom, a membrán kifejezés pedig a membránműveletekre utal. A FEM rendszerek három folyadékfázisból állnak, ahol két azonos jellegű (polaritású) fázist egy eltérő polaritású választ el egymástól (v/o/v rendszerek: vizes/organikus/vizes fázisok, illetve o/v/o rendszerek). A három fázis között két megoszlási egyensúly alakulhat ki, tehát a FEM kétszeres folyadék-folyadék extrakciónak tekinthető. Működési elvét jól szemlélteti az 4.1.5.3.1. ábra.



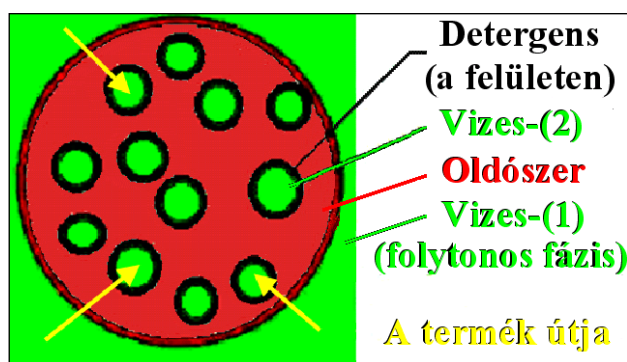
4.1.5.3.1. ábra: FEM rendszer működési elve

A Vizes-(1) fázis (nyers vagy előkezelt fermentlé) tartalmazza a kinyerendő terméket, amelynek molekulái átoldódnak a szerves fázisba, majd innen a Vizes-(2) fázisba. A két vizes fázisnak különböznie kell egymástól, hiszen enélkül a céltermék nem lépne át a második vizes oldatba. Ez a különbség leggyakrabban az eltérő pH-ban mutatkozik.

Vegyük elő ismét a penicillin példáját. Savas közegben a penicillinmolekula disszociációja visszaszorul, átoldódik a szerves oldószerbe. Ha a másik vizes fázis semlegeshez közeli pH-jú, alkáli ionokat tartalmazó puffer, akkor a penicillin ebbe átlépve disszociál és alkáli só képez, megoszlása a szerves fázisból tovább viszi a vizes-(2)-be.

A kétszeres extrakció a hatóanyag koncentrációja mellett tisztítást is eredményez. A jól extrahálható apoláros szerves szennyezések átmennek az oldószerbe, de nem tudnak tovább lépni a vizes-(2) fázisba. Ezzel megszabadulhatunk az olyan olajos jellegű szennyezésektől, mint a például a habgátló olaj. Csak a gyenge sav típusú molekulák követik a penicillint. Ilyen például a fermentlébe prekursor-ként adagolt fenilecetsav, amely kis mennyiségben megmaradhat a vágás utáni lében is. Gyenge savként a kétszeres extrakció során együtt mozog penicillinnel, és megjelenik a vizes-(2) fázisban is.

Az elv ismeretében már érthető, hogy miért szerepel a membrán szó a művelet elnevezésében. Tágabb értelemben a membrán két fázist elválasztó közeg, amelyen keresztül szelektív anyagtranszport lehetséges a két fázis között. A FEM-nél a közbelső oldószeren keresztül egyes anyagok áthaladnak, mások nem, tehát membránként működik.



4.1.5.3.2. ábra: v/o/v típusú emulzió

A következő jogos kérdés az lehet, hogy miért nevezik emulziósnak a műveletet?

Az előző ábrán bemutatott elvi modellnél a fázisok érintkezési felülete kicsi, a molekulák vándorlási úthossza nagy, így a művelet sebessége kicsi. Ezen segíthetünk, ha az elrendezés mérettartományát a kolloid tartományba csökkentjük le, és v/o/v (máskor o/v/o) emulziókat képezünk (4.1.5.3.2. ábra). A zölddel jelölt, külső, folytonos fázis a fermentlé (vizes-1), pirossal a szerves oldószer cseppeit jelöltük, míg a vizes-2 fázis legbelül, a legkisebb, zöld cseppek formájában látható. A termék útját a fázisok között a sárga nyilak jelölik.

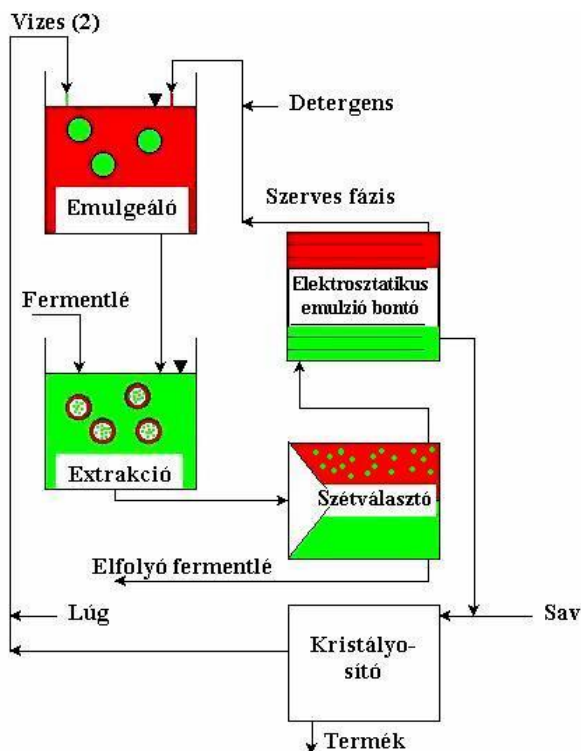
Az eltérő geometria ellenére ez is FEM-rendszer, az anyagtranszport alapelve azonos.

E finom emulzió létrehozásához és stabilizálásához felületaktív anyagok bevitelére is szükséges, mivel izotróp stabil emulziót csak a folyadékok közti felületi feszültség csökkentésével lehet elérni. Ez

jelentős különbség a FEM-technikák és a folyadék-folyadék extrakció között, ahol nem cél az emulzió stabilizálása. Azt, hogy milyen típusú emulzió keletkezik, a felületaktív anyag **HLB** (hidrofil-lipofil balance) értéke dönti el. Ha az anyag HLB-értéke húsz alatt van, akkor víz-olaj-víz rendszer keletkezik, ha ennél nagyobb, akkor olaj-víz-olaj rendszer jön létre. A fermentlevek feldolgozása v/o/v rendszerben megy végbe, így erre koncentrálnunk. De meg kell említeni, hogy a biológiai iparban van szerepe az o/v/o rendszereknek is, a nem-vizes közegben lejátszódó enzimes reakciók kivitelezésében.

További különbséget tehetünk a termék mozgásának iránya szerint. Az esetek nagy többségében az ábrázolt kívülről befelé irány a jellemző. Fordított irányultság csak speciális esetekben fordul elő, például formulázott gyógyszerhatóanyag kioldódása a készítményből a szervezetbe.

A FEM mikroszintű vizsgálata után tekintsük át, hogy ipari méretekben hogyan valósítható meg a kettős extrakció (4.1.5.3.3. ábra).



4.1.5.3.3. ábra: Ipari FEM-rendszer

A víz-oldószer-víz emulzió kialakítása két lépésben történik:

- Először elkészítjük a belső fázis és az olaj emulzióját úgy, hogy a szerves fázishoz lassan adagoljuk a vizes oldatot, miközben intenzíven keverjük a rendszert (8000–10 000 rpm). A keverés eredményeként a szerves fázisban vízcseppek keletkeznek
- A kétfázisú emulziót ezután diszpergáljuk a külső folytonos vizes fázisban, ami lehet a (szűrt, tisztított) fermentlé is.

A vizes-2 fázis nagyon kis méretű cseppjeinek kialakításához és stabilizálásához detergensekre van szükség (pl.: kvaterner aminok). A vizes-2 fázis cseppjeinek átmérője általában 20–40 μm , a szerves fázisé 200–2000 μm .

Lényeges, hogy a cseppek átmérője ebbe a mérettartományba essen, mivel ha a vizes csepp túl kicsi, akkor egy kétfázisú csepp túl sok ilyen kis cseppet tartalmazhat, ami gyengíti a membránt és nagy eséllyel tönkre is teheti. A túl nagy cseppek viszont kis fajlagos felületet eredményeznek. A létrejövő cseppek mérete több tényezőtől függ:

- a keverési sebességtől (turbulencia, nyírósebesség)
- az anyagi minőségtől (viszkozitás, felületi feszültség)
- a felületaktív anyagoktól (HLB-érték, koncentráció)
- egyéb fizikai paraméterektől.

E tényezők hatását elméletileg nehéz leírni, inkább kísérleti úton vizsgálhatók.

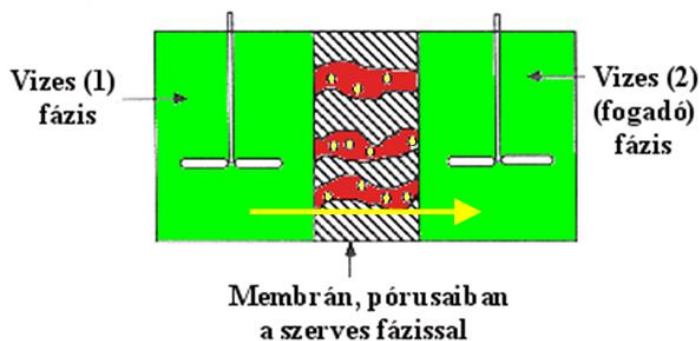
A keverés intenzitása a második emulzióképzésnél is kulcsfontosságú a megfelelő méretű cseppek kialakítása szempontjából.

- A kettős emulzió létrehozásával végbemennek az extrakciós folyamatok, a termék átmegy a vizes-2 fázisba. Az extrakció után a szétválasztás két lépésben történik:
- Normál gravitációs ülepítő. A szerves oldószer viszonylag nagy cseppei a gravitáció hatására elválnak, és külön réteget alkotnak. Ez a könnyen elvezethető folyadék tartalmazza még a vizes-2 fázis apró cseppeit, és benne a kioldott hatóanyagot. A másik, a vizes-1 fázis már nem tartalmaz terméket, az „üres” fermentlé kilép a technológiából és ártalmatlanításra kerül.
- Emulzióbontás. A gondot az jelenti, hogy előbb létre kellett hozni egy nagyon stabil, detergensszel stabilizált emulziót, majd ezt ebben a fázisban meg kell bontani. Ez nagy gyorsulású centrifugálással sem oldható meg hatékonyan, ezért inkább elektrosztatikus elven működő emulzióbontót alkalmaznak. A készülék nagy feszültségekkel dolgozik, de mozgó alkatrésze nincs. Hatására elkülönül a szerves és a vizes-2 fázis. Ez utóbbi tartalmazza a célterméket, amit további tisztításra vihetünk, vagy sóképzéssel ki is kristályosíthatjuk.
- Mind a szerves oldószer, mind a „kiürített” vizes fázis regenerálás után újra felhasználható.

Immobilizált folyadékmembránok

Ennél a megoldásnál a membránként szolgáló oldószer fázist egy vékony, szilárd hordozórétegbe impregnálva találjuk meg. A szilárd réteg lehet egy porózus (makropózusos) vékony lap (flat sheet) vagy üreges szál ([hollow fiber](#)). Ezekre a porózus anyagokra alkalmazhatnánk a membrán megnevezést is, de ez ebben az esetben félrevezető lenne. Az áthaladó anyagáram szelektivitását ugyanis nem a pórusok mérete, hanem a bennük lévő oldószer polaritása határozza meg.

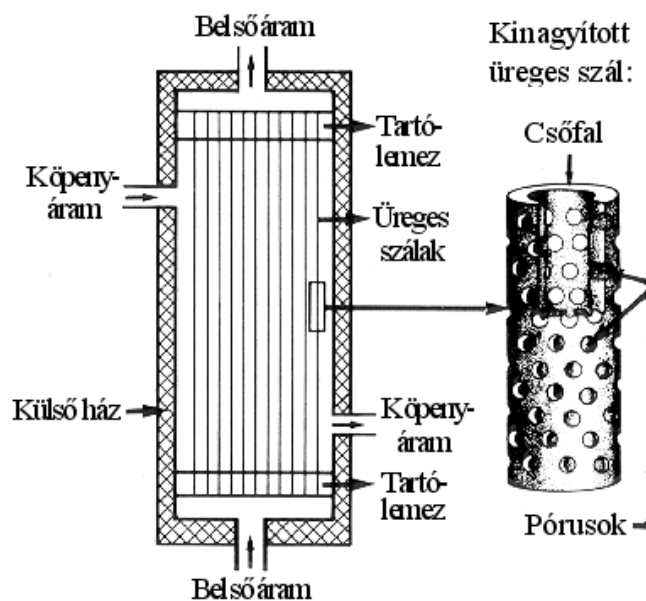
A kinyerendő molekulának át kell diffundálnia a pórusban lévő oldószerdugón. Mivel itt nincs szükség emulzióra, pontosabban a pórusokban rögzített apró oldószerdugók helyettesítik az emulgeált cseppeket, elmarad az emulzió létrehozásával, majd megbontásával járó összes probléma, és felületaktív anyagokra sincs szükség.



4.1.5.3.4. ábra: Immobilizált folyadékmembrán

A vizes-1 fázis áramlik a fal egyik oldalán, a másikon pedig a vizes-2 fázis. Másrészt a pórusok méretéből eredő kis diffúziós keresztmetszet lassítja az egész folyamatot.

Ugyanez az elv alkalmazható sík hordozók helyett ún. hollow fiber (= üreges szál, cső kialakítású membrán) modulban is. A modulban sok ilyen vékony cső fut párhuzamosan, felépítése leginkább a csőköteges hőcserélőre emlékeztet. A szálak belsejében áramlik a folyadék, melyből ki akarjuk nyerni a célmolekulát (vizes-1) és a szálak közti térben a fogadó fázis (vizes-2).



4.1.5.3.5. ábra: Üregesszál modul

A csövecskék nagy száma miatt az összes felület is nagy lesz, ez megnöveli a diffúziós keresztmetszetet is, ami felgyorsítja az anyagtranszportot.

A vizes fázisok folyamatos áramoltatásával a művelet folyamatosá tehető.

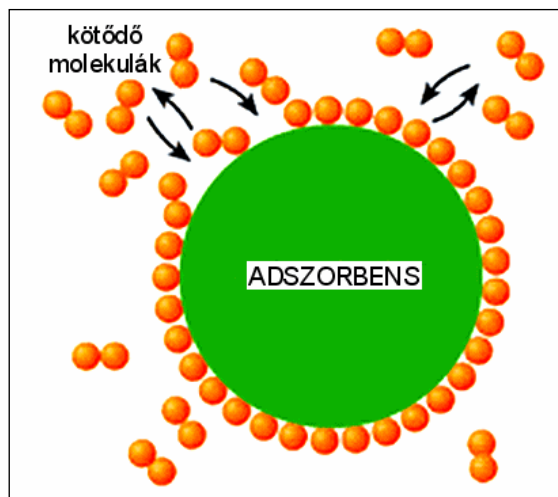
4.1.6. Ajánlott irodalom az extrakció fejezethez

Schügerl, K.: *Solvent Extraction in Biotechnology*, Springer Verlag (1994)

4.2. Adszorpció

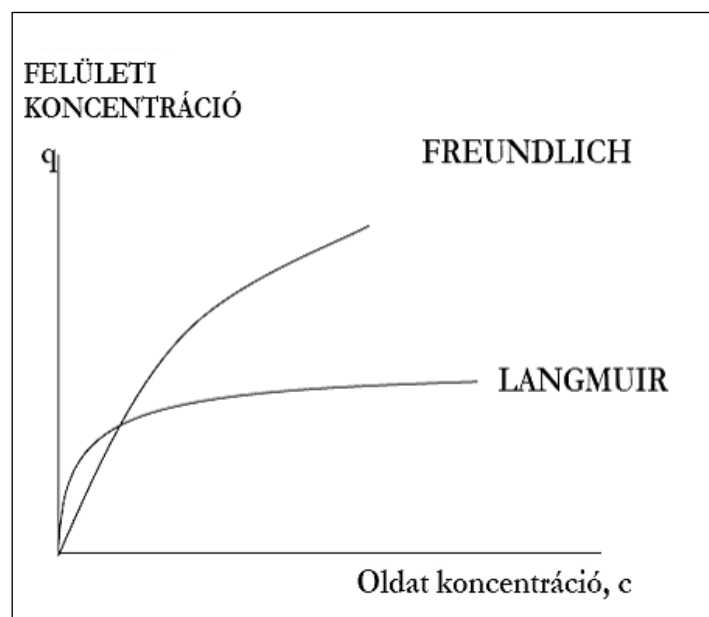
A koncentráció műveleteknél a víz eltávolításának bevált módja, hogy a célterméket átvisszük egy másik fázisba. Az extrakciónál ez a másik fázis a szerves oldószer, az adszorpciónál viszont a felületi kötött fázis. Az adszorpció felületi megkötés, valamely szilárd anyag (adszorbens) a felületén reverzibilisen (azaz nem-kovalensen) molekulákat köt meg. Ez a kötődés szelektív jellegű, egyes molekulák jobban kötődnek, mások kevésbé. Felmerülhet a kérdés, hogy indokolt-e ezt a térrészt külön fázisnak nevezni, hiszen nem különül el olyan láthatóan és egyértelműen, mint az egyéb fázisok. A fázis értelmezése jogos, mert a kötött részecskék energiaállapota más, mint szabad állapotban (az adszorpciós és deszorpciós hő jól értelmezhető és mérhető mennyiség), és a felületi kötött fázis összetétele, a komponensek koncentrációja eltér a vele érintkező folyadék vagy gázfázis összetételétől. Tágabban megfogalmazva a kötött részecskék kémiai potenciálja eltér az oldatban lévőktől. A kötött és a vele érintkező szabad fázis egymással dinamikus egyensúlyban van, ezt az adszorpciós izotermákkal jellemezhetjük.

Az adszorbens felülete véges, így véges számú molekulát képes megkötni. Telítés esetén elvileg monomolekuláris borítottság alakul ki. A valóságban az adszorbens felülete nem ideális, nem minden ponton köti egyformán a részecskéket. A tökéletlenségek, illetve a méretproblémák (a kötődő molekula nagyobb lehet, mint a szorbens pórusátmérője) miatt nem minden kötőhely használható ki – ez csökkenti a kötőkapacitást. Másrészt erős kölcsönhatás esetén nem csak egyszeres borítás alakulhat ki, hanem vastagabb rétegben is felhalmozódhatnak az anyagok – ez növeli a kötőképességet.



4.2.1. ábra: Adszorpció

Egy adott anyag adszorpcióját a kísérletesen meghatározott egyensúlyi görbével adhatjuk meg. Ez az izoterma egy komponensnek a szabad és kötött fázisban kialakuló egyensúlyi koncentrációit jeleníti meg. A mért telítési jellegű (felső határértékhez tartó) görbét többféle függvénnyel közelítették (4.2.2. ábra).



4.2.2. ábra: Freundlich- és Langmuir-izotermák

A két leggyakrabban alkalmazott modell a Freundlich- és a Langmuir-egyenlet. Freundlich hatványfüggvénnyel (a kitevője egynél kisebb) közelítette az adatokat, Langmuir viszont hiperbolikus alakot használt.

$$q = K \cdot c^n$$

$$q = q_{\max} \frac{c}{K + c}$$

ahol: q – koncentráció a felületi kötött fázisban
 C – koncentráció a fluid fázis főtömegében

K , n , q_{\max} – konstansok.

A mérési adatokra mindkét modell illeszthető, a Langmuir-közelítésnek annyi az előnye, hogy a konstansoknak tényleges fizikai jelentése van. A q_{\max} az adott adszorbens maximális kötőkapacitása, K pedig az adszorpció-deszorpció folyamat egyensúlyi állandója. Érdemes megjegyezni, hogy a Langmuir-egyenlet formailag teljesen megegyezik az enzimkinetikában használatos Michaelis–Menten-összefüggéssel, illetve a mikrobanövekedés szubsztrátfüggését leíró Monod-féle egyenlettel. Ez azt is jelenti, hogy a hiperbolikus függvény linearizálására használt ábrázolások (Lineweaver–Burk, Eadie–Hofstee, Hanes–Langmuir) az adszorpció izoterma linearizálására, a konstansok meghatározására is alkalmazhatók. Az egyensúlyi állandót a következő „reakcióra” írhatjuk fel:



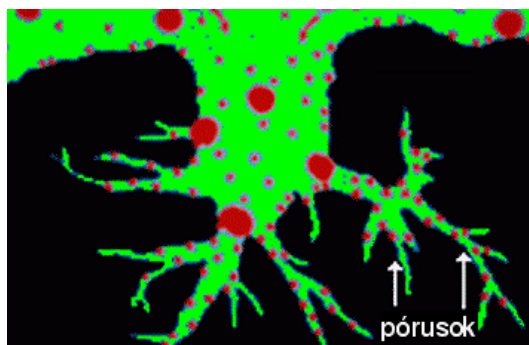
Az egyensúlyi állandót a következőképpen írhatjuk föl:

$$K_{\text{egyensúlyi}} = \frac{\text{szabad molekulák koncentrációja} \times \text{üres kötőhelyek "koncentrációja"}}{\text{fedett kötőhelyek "koncentrációja"}}$$

A kötőhelyek koncentrációja szokatlan egységekben adható meg, például mmól/kg adszorbens, vagy darab/ágytérfogat, de ha a számlálóban és a nevezőben ugyanazt az egységet használjuk, akkor az kiesik, és nem okoz problémát. A kötőhelyek koncentrációját mérni is nagyon nehézkes, sokszor lehetetlen. Ilyenkor az anyagmérlegből indulunk ki, feltételezve, hogy a bemért anyagmennyiségből levonva az oldatból visszamérhető szabad anyagmennyiséget a különbség adja a megkötött frakciót. Ezt az adszorbens mennyiségére vonatkoztatva kapjuk a fedett kötőhelyek koncentrációját (q). A q - c függvényt kimérve a Langmuir-modell illesztésével megkaphatjuk az egyensúlyi állandót és a maximális kötőkapacitást = az összes kötőhely koncentrációját.

Az ipari gyakorlatban az adszorpció folyamatok ritkán követik az elméleti viselkedést, legjobban az ásványi sók ioncserés megkötése közelíti meg az ideálist. A leggyakoribb problémák:

- Komponens interakció (ugyanazért a kötőhelyért többféle, eltérő kötési erősségű molekula/ion is verseng, leszorítják egymást).
- Sztérikus gátlások (nagyobb kötődő molekulánál előfordul, hogy nemcsak egy kötőhelyet foglalnak el, hanem a szomszédos kötőhelyeken is akadályozzák más részecskék belépését).
- size-exclusion (= méretkizárási) hatások: a legtöbb adszorbens pórusai nem egyformák, és a legkisebb méretű pórusokba az egyébként kötődő makromolekulák nem tudnak behatolni – így a kötőhelyek egy része hozzáférhetetlen. Sőt ezek a porózus anyagok nem csak adszorbensként, hanem gélkromatográfias töltésként is viselkednek, ami nagyon megzavarja az elválasztást (4.2.3. ábra.).



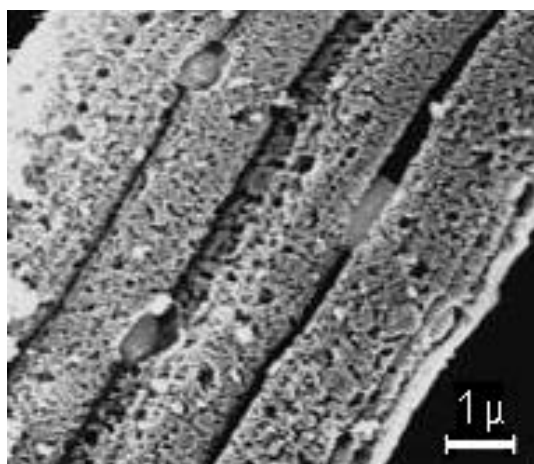
4.2.3. ábra: Méretkizárási porózus adszorbensnél

4.2.1. Ipari adszorbensek

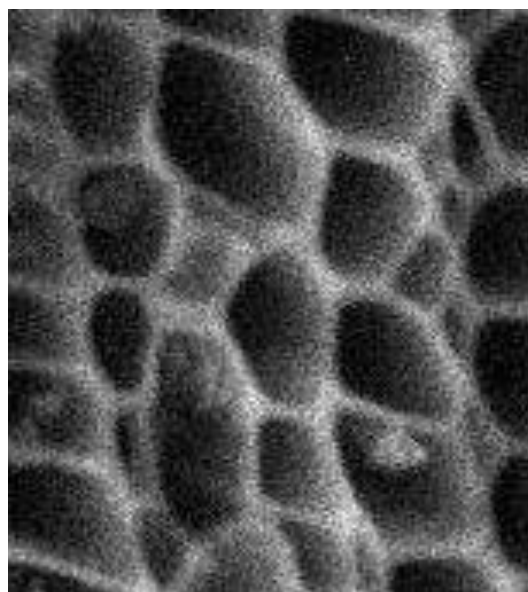
A biológiai iparban gyakrabban használatos adszorbensek a következők:

- aktív szén,
- ioncserélők
- szintetikus gyanták
- speciális anyagok.

Az aktív szén, amelyet sok iparágban, sőt gyógyszerként is használnak, elsősorban a szennyező anyagok (azaz nem a céltermék) megkötésére alkalmas. Gyártása növényi anyagok száraz lepárlásával történik. A fás szerkezetű növényi melléktermékeket (fahulladék, csonthéj) levegőtől elzárva, több száz fokon hevítik. A szerves anyagok elbomlanak és elpárolognak (kátrány és gázvíz frakció) és csak az elszenesedett cellulózból és hemicellulózból álló kiürült sejtfaalak maradnak meg. Ettől olyan nagy az aktív szén fajlagos felülete. Őrlés nélkül az anyagon még felismerhető a fa eredeti szerkezete (4.2.1.1. ábra).



4.2.1.1. ábra: A fa szerkezete még felismerhető az aktív szénen

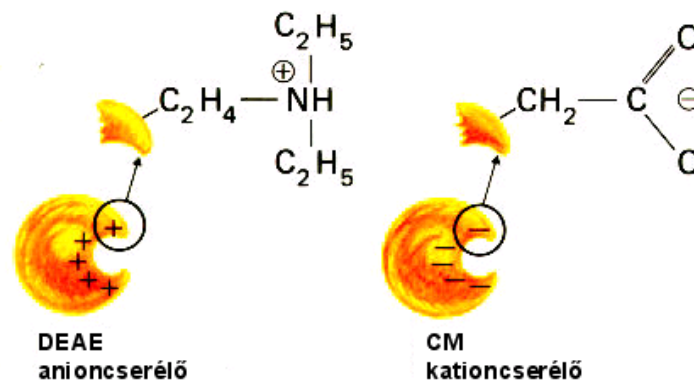


4.2.1.2. ábra: Az aktív szenet elszenesedett növényi sejtfaalak alkotják

A legjobb minőségű, orvosi célra is használható aktív szenet csonthéjas gyümölcsök héjának (kókuszdió, nálunk: konzervgyári hulladékmag) elszenesítésével állítják elő. Az így kapott szén minőségét tovább lehet javítani vízgőzös kezeléssel (sztripelés). A forró vízgőz további „rásült”

anyagokat távolít el a felületről, ezzel növeli a kötőkapacitást. Az egyes aktív szén gyártmányok az alapanyag, a technológia és az utólagos tisztítás mértéke szerint nagyon sokféle lehetnek. Az egyik legnagyobb ipari aktív szén gyártó cég, a NORIT katalógusában több mint száz különféle termék szerepel. Az aktív szenes kezelés után nagyon nehéz a kötött anyag visszanyerése, ezért is használják inkább derítésre, a szennyező anyagok eltávolítására. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy maga az aktív szén is nehezen regenerálható. Megtisztításához ugyanúgy fel kell hevíteni, mint a gyártásnál. Ez drága, energiaigényes eljárás, ezért a derítőszenet általában csak egyszer használják, majd ártalmatlanításként kazánban elégetik.

Az ioncserélők csoportja tovább osztható mesterséges és természetes eredetű anyagokra. Mindkettőnek közös jellemzője, hogy a felületén ionizálható csoportokat tartalmaz, amelyek az oldatban lévő ellenionokat ionpár formájában megkötik. A szintetikus ioncserélő gyanták általában polisztirol alapú polimerek, amelynek felületére savas vagy bázikus csoportokat kötnek. A kationcserélőknél jellemzően szulfonsav- vagy karbonsav csoportot, az anioncserélőknél pedig valamilyen alkilezett aminocsoportot (4.2.1.3. ábra).



4.2.1.3. ábra: Ionizálható csoportok ioncserélő gyantán

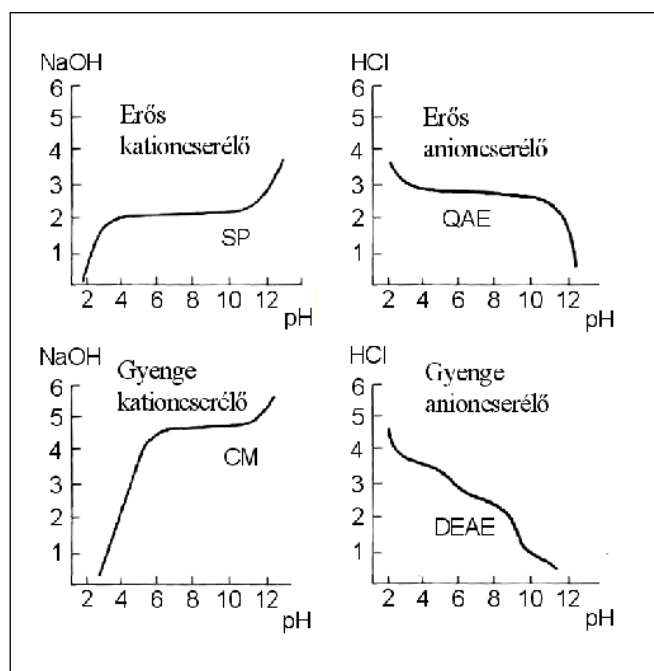
A leggyakoribb ionizálható csoportok szerkezetét, nevét és rövidítését foglalja össze a 4.2.1.4. ábra.

Formula	Name	Abbreviation
<i>Strong anion</i>		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Triethylaminoethyl	TAM-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	Triethylaminoethyl	TEAE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Diethyl-2-hydroxypropylaminoethyl	QAE-
<i>Weak anion</i>		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	Aminoethyl	AE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Diethylaminoethyl	DEAE-
<i>Strong cation</i>		
$-\text{SO}_3-$	Sulpho	S-
$-\text{CH}_2\text{SO}_3-$	Sulphomethyl	SM-
$-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3-$	Sulphopropyl	SP-
<i>Weak cation</i>		
$-\text{COO}-$	Carboxy	C-
$-\text{CH}_2\text{COO}-$	Carboxymethyl	CM-

4.2.1.4. ábra: A leggyakoribb ioncserélő gyantatípusok

Az ionizálható csoportok nem minden pH-értéknél viselkednek ionosan. Ahogyan az extrakciónál a 4.1.4.2. fejezetben tárgyaltuk, erősen savas, illetve lúgos közegben a savas és bázikus csoportok disszociációja visszaszorul, elvesztik ionos karakterüket. Ugyanígy az ioncserélők csoportjai is elvesz-

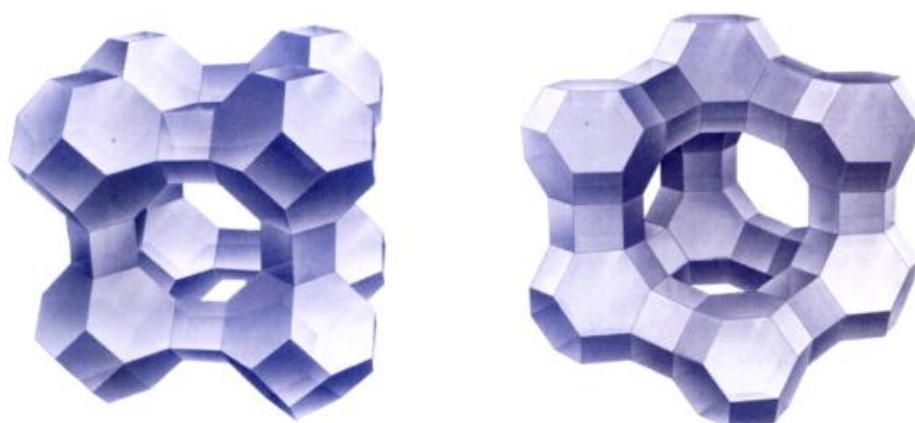
tik töltésüket, nem képesek az ellenionok megkötésére. A kationcserélők az erősen savas, az anioncserélők az erősen lúgos közegben nem alkalmasak adszorpcióra. Az egyes ioncserélők viselkedését különböző pH-értékeken a titrálási görbével jellemezhetjük (4.2.1.5. ábra).



4.2.1.5. ábra: Titrálási görbék

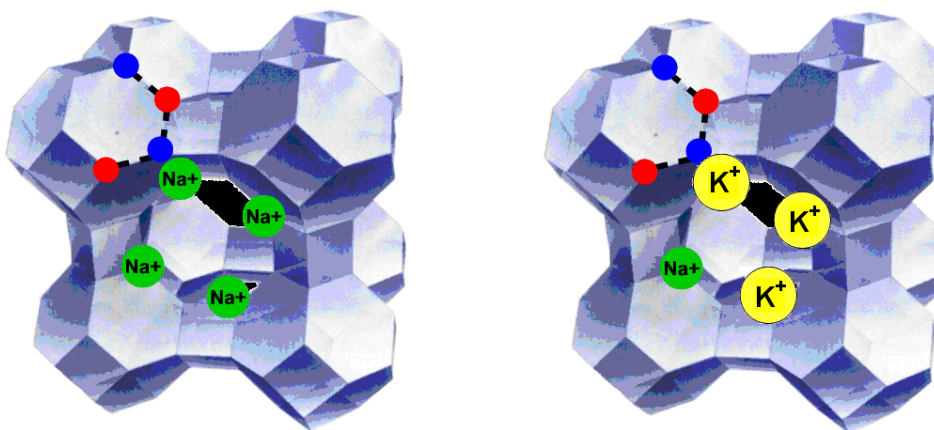
Az optimális alkalmazási tartomány a görbék közel vízszintes szakaszán, a platón található. A savas, illetve lúgos kezelést használják fel a gyanták regenerálására. A pH-állítás hatására a gyantáról minden kötött anyag leválik, az ioncserélő megtisztul és újabb használatra kész.

A természetes anyagok között jelentős ioncserélő kapacitása van az agyagásványoknak. Jelentős a szerepük a talajok ionháztartásában, a talajvízből megkötik, visszatartják a kationokat, ezzel a növények ásványianyag-háztartására pozitív hatásuk van. Az ipari adszorbensek között a legérdekesebbek a zeolitok. Ezek jellegzetes kristályrácsot alkotnak (4.2.1.6. ábra), amelyen belül nagyon szabályos és állandó méretű pórusok találhatók (molekulasziták).



4.2.1.6. ábra: A zeolitok szerkezete

Külön érdekessége a zeolitoknak, hogy a pórusméret változik aszerint, hogy milyen kationok kötődnek a rács egyes pontjain. A bal oldalt látható zeolit-A pórusmérete Na^+ ionok kötése esetén 0,4 nm. Ha ezek a nagyobb méretű K^+ ionokra cserélődnek ki, a pórusok átmérője leszűkül 0,3 nm-re (4.2.1.7. ábra).



4.2.1.7. ábra: Ionok hatása a zeolitok pórusméretére

A kalciumionok mérete hasonló a káliuméhoz, de két töltése miatt csak kettő kötődik meg egy pórusban, így kevésbé szűkíti le azt, az átmérő 0,5 nm körüli érték.

A szintetikus gyanta adszorbensek legtöbbször ugyanolyan sztírol-divinilbenzol kopolimerek, mint az ioncserélő gyanták alapváza, de nincsenek rajtuk ionizálható csoportok. Az apoláris polimer felületén kötődnek meg az apoláris molekulák (például szteroidok), majd a gyantagyöngyök kiülepítésével és dekantálással a megkötött hasznos anyag kinyerhető. A működési elv hasonlít az extrakcióhoz, csak az apoláris szerves oldószer cseppjei helyett az apoláris gyanta szilárd szemcséi veszik fel a termék molekulát, és nem a cseppek belsejében kötődnek meg (abszorpció), hanem a polimer felületén (adszorpció).

Az adszorpció speciális esetének tekinthető az affinkromatográfia, amely neve ellenére adszorpciós művelet. Ezzel részletesebben az 5.1. fejezetben foglalkozunk.

4.2.2. Az adszorpció művelete

Az adszorpció műveletét többféleképpen is végrehajthatjuk. Adszorpció alatt a megkötés folyamatát értjük, miközben tudjuk, hogy ezt mindig követi az elúció, az anyagok leoldása, lemosása a felületről. Ez a második lépés időben – néha térben is – elkülönül a megkötéstől.

4.2.2.1. Szakaszos (batch) adszorpció

A legegyszerűbb, laboratóriumban és az iparban egyaránt könnyen végrehajtható művelet. Kevert tartályreaktorba összemérjük a folyadékot és az adszorbentet, és az egyensúly beállásáig kevertetjük. A szakaszos műveletet szilárd-folyadék elválasztás követi (szűrés, centrifugálás). Az egyensúlyi görbe és az anyagmérleg ismeretében a szakaszos extrakcióhoz hasonló módon írhatjuk le a folyamatot.

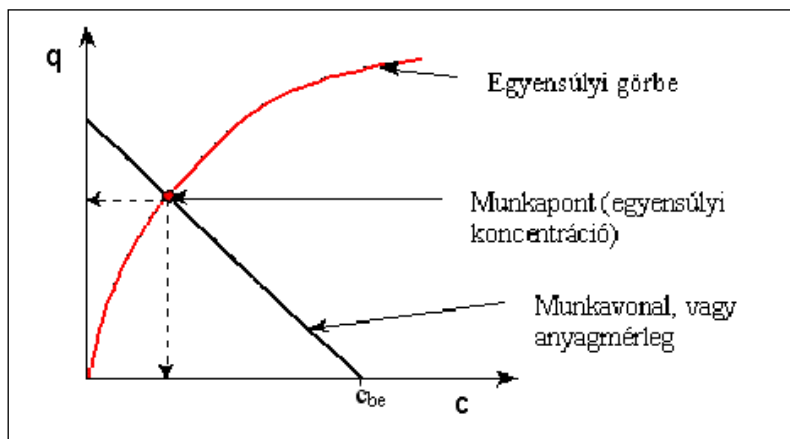
$$Qq_{be} + Wc_{be} = Qq + Wc$$

ahol: Q – adszorbens mennyisége
 W – a folyadék mennyisége
 q – a kötött anyag koncentrációja az adszorbensre vonatkoztatva
 c – a szabad anyag koncentrációja a folyadékban

Átrendezve:

$$q = q_{be} + \frac{Q}{W}(c_{be} - c)$$

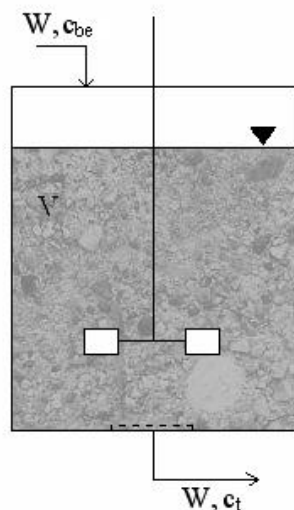
A q_{be} értéke nulla, ha „üres” adszorbenst használunk a megkötéshez. A felírt q - c függvény egy negatív meredekségű egyenes, a meredekség a két fázis egymáshoz viszonyított aránya. Ezt az egyenest az egyensúlyi diagramon ábrázolva az adszorpció munkavonalának nevezzük, amely az egyensúlyi görbén kimetszi a munkapontot (4.2.2.1.1. ábra). A munkapont koordinátái pedig megadják a kialakuló egyensúlyi koncentrációkat. A szerkesztésnél a c_{be} pontból kiindulva a Q/W meredekséggel metsszük ki a munkapontot.



4.2.2.1.1. ábra: Az adszorpció munkavonala

4.2.2.2. Adszorpció folytonos kevert reaktorban

A folytonos jelző nem írja le tökéletesen a működést, mivel csak a folyadékfázis áramlik át folyamatosan a reaktoron, a lebegő szilárd adszorbenst egy szűrő visszatartja a készülékben (4.2.2.2.1. ábra).



4.2.2.2.1. ábra: Folytonos reaktor szűrővel

Ez az összeállítás végig tranziens állapotban működik, hiszen az állandósult állapot csak akkor áll be, amikor az adszorbens már telítődött. A tranziens analitikus leírása differenciális formában a folyadékfázisra felírt mérlegegyenletről indul ki:

$$\text{Változás} = \text{Bevitel} - \text{Kivitel} - \text{Adszorpció}$$

$$\varepsilon V \frac{dc}{dt} = Wc_{be} - Wc_t - (1 - \varepsilon)V \frac{dq}{dt}$$

ahol: ε – a folyadék részaránya a reaktor töltetéből
 $1-\varepsilon$ – az adszorbens részaránya a reaktor töltetéből
 V – a reaktor töltőtérfogata
 c – koncentráció a folyadékban
 q – a megkötött anyag koncentrációja az adszorbensre vonatkoztatva.

A tranziens szakaszban nem élhetünk a $dc/dt=0$ egyszerűsítéssel. A dq/dt sebességet viszont kifejezhetjük, figyelembe véve, hogy a tömegátadás az adszorbens felületére diffúziós folyamat, melynek hajtóereje a pillanatnyi és az egyensúlyi koncentráció közötti különbség.

$$\varepsilon V \frac{dc}{dt} = W(c_{be} - c_t) - (1 - \varepsilon) V k A (c_{\text{egyensúlyi}} - c_t)$$

ahol: k – a tömegátviteli tényező
 A – a két fázis határfelülete

Ez a forma már integrálható, de ne menjünk végig a részleteken, hasznosítsuk a Folyamatirányítás tárgyban tanultakat. Először vizsgáljuk meg a két szélsőséges esetet:

- Az adszorpció nagyon gyenge, gyakorlatilag nulla.
- A kötődés erős és gyors, a bekerülő molekulák pillanatszerűen, teljes mértékben megkötődnek a felületen.

A valóságos folyamatok valahol e két szélsőség között helyezkednek el.

Az első esetben a reaktor úgy viselkedik, mintha az adszorbens ott sem lenne. Az ideálisan kevert folyamatos tartályreaktor elsőrendű tárolóként viselkedik, a betáplálás koncentrációjának váltása nulláról c_{be} -re pedig az egységugrás zavarásnak felel meg. A Folyamatirányítás tárgyban erre az esetre a formulát vezették le:

$$\hat{y} = \hat{y}_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{T}} \right)$$

ahol: \hat{y} – eltérés változó
 t – idő
 T – a rendszer időállandója (tehetetlensége)

Jelen esetben az idő helyét a betáplált térfogat (W) veszi át (állandó térfogatáramú betáplálásnál e két változó lineáris kapcsolatban van egymással). A tehetetlenséget pedig a reaktor térfogatával jellemezzük (V). Így a fenti összefüggés átírható a

$$c = c_{be} \left(1 - e^{-\frac{W}{V}} \right)$$

formába. Ez az animációban a pirossal jelölt görbe. Néhány térfogatcsere ($W/V =$ a térfogatcsere szám) után a kifolyó koncentráció gyakorlatilag azonos lesz a belépővel.



4.2.2.2.1. animáció: Tranziensek folytonos reaktorban

A másik szélsőséges esetben az adszorpció olyan erős és gyors, hogy a reaktorban gyakorlatilag nincsenek szabad molekulák, mindegyik azonnal megkötődik. Így a koncentráció a tartályban nulla, és mindaddig ennyi is marad, amíg az utolsó kötőhely is be nem telt. Ekkor a rendszer megint úgy viselkedik, mintha nem lenne benne adszorbens, hiszen nincs már kötőkapacitás. Ugyanazt a görbét kapjuk, mint az előzőekben, csak az origóhoz képest eltolva (az ábrán zölddel jelölve). A Folyamatirányításban ezt a tulajdonságot holtidőnek nevezik, az összefüggésbe az idő helyett ($t-t_{holt}$) paramétert helyettesítik be.

A valós adszorpciós folyamatok viselkedése valahol a két szélsőség között van. A gyakorlatban S-alakú, inflexiós görbéket kapunk (kék színnel jelölve). A Folyamatirányítás apparátusával holtidős, többértékű tároló válaszfüggvényeként értelmezhető.

Ez esetben a megkötés után nem szükséges fázisszétválasztási lépést beiktatni, mert a szűrő visszatartja a szilárd fázist. Az elúció ugyanebben a reaktorban megvalósítható, a leoldás után a szűrő továbbra is bent tartja a szemcsés anyagot. Külön szilárd-folyadék elválasztás csak a használt adszorbens eltávolításánál szükséges.

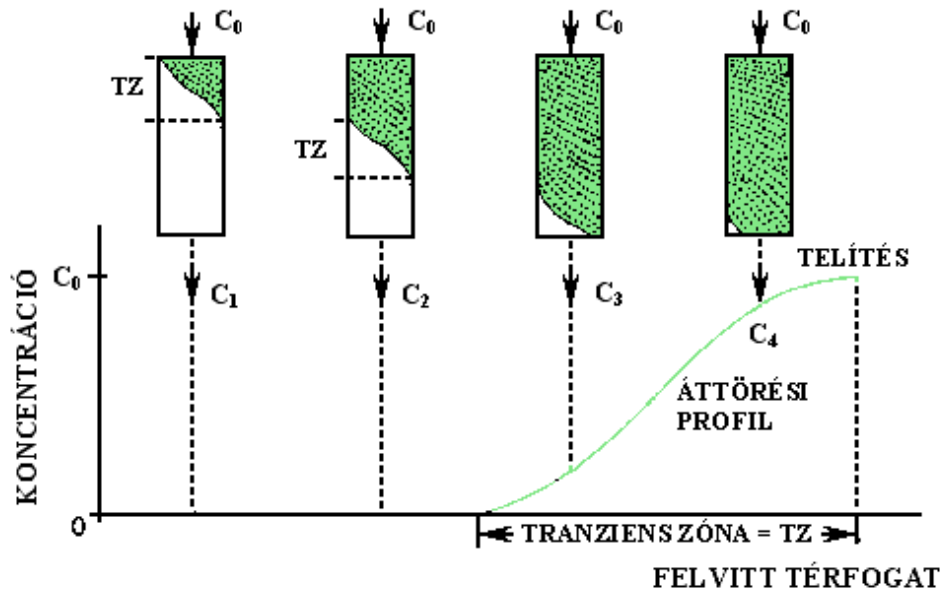
Adszorpció töltött oszlopban

A harmadik, ipari léptékben is gyakran alkalmazott forma a töltött oszlopban végrehajtott adszorpció. Az oszlopban átengedett folyadék keverés nélkül is jól érintkezik az adszorbenssel.



4.2.2.3.1. ábra: Adszorpció töltött oszlopban

Ahogy a folyadék az oszlopban főlülről lefelé halad, fokozatosan telítődnek a kötőhelyek. Az oszlopban a „még üres” és a „már telített” szakasz között van egy átmeneti zóna, ahol a töltet részlegesen telített. Ennek kialakulásánál ugyanazok a mechanizmusok működnek, mint amelyek a kromatográfias csúcsok kialakulásában, a sávkiszélesedésben játszanak szerepet: axiális diffúzió, egyenlőtlen áramlás stb. (Analitika tárgya, kromatográfia témakör). Az átmeneti zónában a koncentrációprofil szigmoid alakú, inflexiós görbe. Ez térben, az oszlop hossz tengelye mentén alakul ki, de ha a kilépő oldat koncentrációját regisztráljuk, akkor időbeli változásként is észlelhetjük (áttörési görbe, 4.2.2.3.2. ábra).



4.2.2.3.2. ábra: Az áttörési profil kialakulása

Azt a pontot, amikor a megkötenő anyag először megjelenik az oszlop végén az elfolyóban, áttörési pontnak vagy röviden áttörésnek nevezzük. Amikor a kilépő koncentráció azonosá válik a betáplálással, akkor az oszlop minden kötőhelye fedett, a kötőkapacitást teljesen kihasználtuk. Ezt nevezzük telítési pontnak. A koncentrációk dinamikus változását az oszlopban és a kilépő folyadékban a következő animáció mutatja be.



4.2.2.3.1. animáció: A koncentrációk alakulása adszorpciós oszlopon

Az oszlop telítése során általában nem célszerű a százszázalékos telítésig elmenni. Addigra már jelentős mennyiségű anyag „átszökött” az oszlopon, ami a termék megkötése esetén anyagvesztés, szennyezések esetén pedig átengedett szennyezést jelent, ami rontja a termék minőségét. Az, hogy az áttörési profil melyik pontján, milyen kimenő koncentrációnál érdemes leállítani a rátáplálást, egy összetett gazdasági optimum-számítás eredménye. Az mindenesetre belátható, hogy minél „laposabb” a görbe, minél szélesebb az átmenti zóna, annál nagyobbak az anyagvesztések, illetve szennyezések. Hogyan lehetne a tranziens zónát szűkíteni? Megint a kromatográfiánál tanultakat (Analitika tantárgy) felhasználva megállapíthatjuk, hogy az áramlási sebesség a kulcsparaméter mind a kromatográfiai csúcsok, mind az adszorpciós áttörési profil kiszélesedésében. Az optimális áramlási sebességet a háromféle mechanizmust is figyelembe vevő van Deemter-egyenlettel számíthatjuk ki.

A szükséges oszlophossz számítására többféle közelítő módszert is leírtak. A legegyszerűbb egy Δz infinitezimális magasságú oszlopszeletre felírt anyagmérlegről indul ki, de a további lépésekben ehhez is az egyensúlyi görbéből származtatott függvények grafikus, illetve numerikus integrálására van szükség.

Az oszlopban végrehajtott adszorpció és az oszlopkromatográfia között sok hasonlóság van (oszloptölteten átáramló oldat, amelyből egyes komponensek a tölteten megkötnének, majd leválnak; ugyanabban az összeállításban mindkét művelet megvalósítható), de a két művelet elve és célja NEM AZONOS!

Az eddig bemutatott megvalósítási módok (szakaszos, folytonos, oszlop) sorrendje egyben a növekvő léptékek sorrendje is. A legnagyobb méretekben adszorpciós oszlopokat alkalmaznak, és nem is egyesével, hanem tucatszám, telepekbe építve. Megfelelő csövezéssel rugalmasan megvalósítható az elkülönített, illetve együttes működés, párhuzamos vagy soros kapcsolással (4.2.2.3.3. ábra).



4.2.2.3.3. ábra: Adszorpciós oszlopok telepe

4.2.3. Az adszorpció és az extrakció összehasonlítása

Az előző két alfejezetben tárgyalt két koncentráló művelet, az adszorpció és az extrakció sok tekintetben hasonlít egymáshoz. Fázisváltó műveletek, a kívánt anyagot egy másik fázisba viszik át, a „kiürült” vizes fázis egyszerű fizikai művelettel elválasztható. Egyensúlyi műveletek, az egyensúlyi görbéhez kapcsolódó grafikus méretezési eljárások is nagyon hasonlóak. A mégis létező eltéréseket a következő táblázatban foglaljuk össze:

	EXTRAKCIÓ	ADSZORPCIÓ
Kapacitás	Nagy	Kicsi
Szelektivitás	Mérsékelt	Nagy
Egyensúly	Közel lineáris, a komponensek függetlenek (a megoszlási hányados közel állandó).	Nem lineáris (telítési jellegű), kölcsönhatás van (a felületi kötőhelyek véges számúak)
Műveletileg	Folytonosítható	Periodikus (adszorpció-deszorpció váltakozik)
Problémák	Emulzióképződés, denaturálódás.	Az adszorbens kezelése, inhomogenitása, összenyomhatósága.

A kapacitásbeli különbséget úgy értelmezhetjük, hogy az extraháló oldószer teljes térfogatában képes a terméket felvenni, nagy koncentrációk érhetők el, aminek csak az oldhatóság szab határt. Az adszorbens saját tömegének csak elenyészően kis hányadát képes megkötni a felületén.

Szelektivitás alatt azt értjük, hogy az extrakció csak egyetlen fizikai tulajdonság (polaritás – apolaritás) alapján választ el anyagokat, az adszorpció viszont a megfelelő töltet kiválasztásával poláris, apoláris, ionos és biológiailag aktív anyagokat is képes szelektíven megkötni.

Az egyensúlyok jellegét részletesen tárgyaltuk a korábbiakban.

Műveletileg a folyadék-folyadék extrakciónál a folyadékáramok bevezetése, érintkeztetése és szétválasztása folyamatosan végezhető, állandósult állapot hozható létre. Az adszorpciónál a terméket

megkötő szilárd fázis nem áramoltatható, bevitele és elvétele nehézkes. Ezért általában a töltetet tartják helyben, és a vele érintkező folyadékot cserélik le eluensre. Ez viszont periodikus működést eredményez, nincs állandósult állapot, nem folytonosítható.

4.3. Membránműveletek

A koncentráció műveletek között a membránműveletek kerülnek sorra. Az eddig tárgyalt műveleteknél a kiválasztott anyagok egy másik fázisba kerültek. A membrános elválasztásoknál nincs másik fázis, hanem a membrán által szétválasztott két térrészben alakul ki koncentrációkülönbség.

4.3.1. Bevezetés

Mindenkinek vannak elképzelései a membránok mibenlétéről, az eddigi tanulmányok során szó esett a „félleg áteresztő membránokról” (ozmotikus jelenségek), membránegyensúlyokról (fizikai kémia), sejtmembránról (biokémia, mikrobiológia). A membránok mibenlétére, illetve a segítségükkel végrehajtott membránműveletekre nehéz általános érvényű, pontos definíciót adni. A szakterület nemzetközi tudományos társasága (European Society of Membrane Science and Technology) is egy hosszú és körülményes meghatározást fogadott el. Leegyszerűsítve a membrán közbelső fázis két fluidum közti anyagátadás során, amelyen szelektív anyagtranszport folyik. Ezt a szelektivitást használhatjuk ki az elválasztási műveletekben, mivel a transzport az egyes komponensekre nézve eltérő sebességű.

A fizikai kémiai összefüggések felidézése előtt a szemléletesség kedvéért végezzünk el egy gondolat kísérletet. Válasszunk ki egy folyadékteret, amelyet egy félleg áteresztő hártya (membrán) választ ketté.

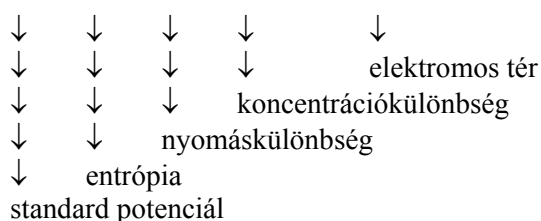


4.3.1.1. animáció: Anyagtranszportok membránon

Állítsuk be a koncentrációkat a két térben úgy, hogy a bal oldalon fiziológiás nátrium-klorid oldat (kb. 1/6 mólos) legyen. A jobboldalon a Na^+ -ion koncentráció legyen ugyanakkora, de az anionokat cseréljük ki fehérjére (válasszunk olyan fehérjét, amely az adott (semleges) pH-n anionként viselkedik). A membrán a fehérjékre nézve legyen áthatolhatatlan, viszont az ásványi ionok számára tökéletesen átjárható. Mi történik, ha magára hagyjuk a rendszert? A két oldal között elektromos potenciálkülönbség nincs, ozmotikus nyomáskülönbség nincs (az oldatban lévő ionok száma azonos), viszont az anionokra nézve koncentrációkülönbség áll fenn. A fehérjeanionok nem tudnak vándorolni, viszont a kloridionok mozgása megindul a membránon át a jobb oldali térbe. Ez az eltolódás felborítja az előbb felsorolt egyensúlyokat. A jobb oldali tér az anionok szaporodásától negatívvá válik, ez azután a pozitív nátriumionok migrációját is megindítja. A jobb oldalon felszaporodó részecskék megbontják az ozmotikus egyensúlyt is, ami nyomásnövekedésben, illetve kellő ellennyomás hiányában a vízmolekulák jobbra áramlásában jelentkeznek. A kialakuló új egyensúlyi állapotban tehát nincs egyensúlyban sem a koncentráció, sem az elektromos potenciál, sem az ozmózisnyomás – csak ezek eredője, a kémiai potenciál.

Ezek a bonyolult egyensúlyi jelenségek nemcsak elméleti érdekességük, hasonló kölcsönhatásban áll környezetével minden élő sejt, a tápoldatban élő mikroorganizmus éppúgy, mint a sejtközötti folyadékkal érintkező szöveti sejt. A tárgyalt membrános elválasztásoknál általában elegendő egy vagy két tagot figyelembe venni. A dialízisnél tisztán a koncentrációkülönbség hatására távoznak a makromolekulák mellől a kis mólsúlyú anyagok. Az elektrodialízisnél az elektromos tér a meghatározó, míg a további műveletekre az a jellemző, hogy az alkalmazott technológiai nyomás az ozmózisnyomás ellen dolgozik, és az így létrejövő nyomáskülönbség hatására átáramló folyadék viszi magával a kisebb molekulaméretű anyagokat.

$$\mu_i = \mu_{i0} + S_i T + V_i p + RT \ln a_i + z_i F \varphi + \dots$$



- ahol: μ_{i0} – kémiai potenciál a standard állapotban
 S_i – parciális moláris entrópia
 V_i – parciális moláris térfogat
 R – gázállandó
 z_i – töltésszám, érték
 F – Faraday-állandó
 T – abszolút hőmérséklet
 p – nyomás
 a_i – aktivitás
 φ – elektromos térerősség

4.3.2. A membránműveletek csoportosítása, jellemzése

A fluidumok halmazállapota, a folyamat hajtóereje és a permeáló részecskék mérete szerint sokféle membránművelet különböztethető meg (4.3.2.1. táblázat). Szinte mindegyik önálló szakterületté lett, ezért nem is foglalkozunk valamennyivel, csak a biológiai iparokban alkalmazott műveletekkel (reverz ozmózis, ultraszűrés, mikroszűrés, dialízis és elektrodialízis).

4.3.2.1. táblázat: A membrános elválasztások csoportosítása

	Belépő fluidum	Kilépő fluidum	Hajtóerő	Átlép	Visszamarad
Gázpermeáció	gáz	gáz	koncentráció v. parciális nyomás	gáz	gáz
Pervaporáció	oldat	gáz	koncentráció v. parciális nyomás	gáz	gáz
Dialízis	oldat	oldat	Koncentrációkülönbség	kis molekulájú anyagok	nagy molekulájú anyagok
Elektrodialízis	oldat	oldat	elektromos tér	ionok	víz
Reverz ozmózis	oldat	oldat	nyomás	oldószer	sók stb.
Ultraszűrés	oldat	oldat	nyomás	kis molekulájú anyagok	nagy molekulájú anyagok
Mikroszűrés	szuszpenzió	szuszpenzió	nyomás	minden oldott anyag	kolloid részecskék
Szűrés	szuszpenzió	szuszpenzió	nyomás	kolloid részecskék	makrorészecskék

4.3.2.1. Gázpermeáció

A gázpermeációs membránokon a különböző gáz-halmazállapotú anyagok molekulái eltérő sebességgel hatolnak át. Ennek következtében egyes komponensek feldúsíthatók a gázelegyenben (pl. a nehezebb nemesgázok). Biotechnológiai alkalmazása alig van.

4.3.2.2. Pervaporáció

A pervaporáció esetében a membránnal érintkező folyadék komponensei anyagi minőségüktől függő mértékben oldódnak be a membrán anyagába, és a túloldalon gáz, pontosabban gőz formájában jelennek meg. A folyamat addig tart, amíg a gáztérben (rendszerint vákuum) a gőznyomás el nem éri az adott komponens aktuális hőmérsékleten kialakuló egyensúlyi gőznyomását. Ha az átlépő gőzöket folyamatosan áramoltatott vivőgázzal vagy vákuumszivattyúval eltávolítjuk, a művelet folyamatossá tehető.

Biotechnológiai alkalmazása: etanol fermentációnál. A szesziparban az élesztők csak bizonyos alkohol-koncentrációig képesek az erjesztésre. Ennek elérésénél a folyamat leáll, pedig a tenyészet még képes lenne további fermentációra. Ha a fermentorhoz egy pervaporációs membránmodult kapcsolunk, annak apoláris membránjában az etanol jobban oldódik, mint a víz, és így a vákuum-oldalon nagyobb etanol koncentrációjú gőzelegyet kapunk. Ezt kondenzáltatva egyrészt folyamatosan eltávolíthatjuk az etanolt a rendszerből, tehát az élesztő több cukrot konvertál alkohollá, másrészt a cefrénél töményebb alkoholt kapunk, ami megtakarítást hoz a desztillációnál is.

Analitikai alkalmazása: közvetlen mintavételezést tesz lehetővé a fermentorból. A fermentlébe merülő kis felületű szonda membránján áthatoló apoláris anyagok (oxigén, szén-dioxid, etanol, más alkoholok, fenil-ecetsav) közvetlenül egy kis felbontású tömegspektrométer vákuumterébe vezethetők, és a megfelelő tömegszámnál kapott ionsúcs nagysága alapján mennyiségileg meghatározhatók.

4.3.2.3. Dialízis

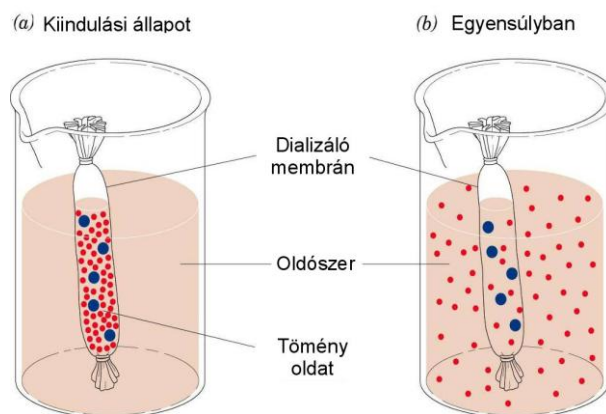
A dialízis hajtóereje a koncentrációkülönbség, mechanizmusa a diffúzió. A dializáló membránok megfelelnek a klasszikus féligáteresztő hártjának, a kis molekulákat átengedik, a nagyokat visszatartják.

A dialízis a fehérjék kis molekulatömegű szennyezéseinek (pl. só, koenzim, szubsztrát stb.) eltávolítására alkalmas egyszerű módszer. A dializálandó fehérjét speciális membránból készült zacskóba töltjük, lezárjuk és nagy térfogatú desztillált vizet vagy híg puffert tartalmazó edénybe helyezük. A fehérjék számára a dializálóhártya átjárhatatlan, a szennyezések viszont könnyen átjutnak, és a koncentráció-gradiensnek megfelelő irányban eltávoznak a fehérje mellől. Meggyorsíthatjuk a folyamatot, ha a dializáló edény tartalmát kevertetjük.

A dializáló membrán celofánból vagy más cellulóz alapú anyagból készül. Különböző méretekben és formában (sík fólia, cső). Bonyolultabb, kis molekulatömegű szerves anyagok (pl. nukleotidok) dialízise előtt győződjünk meg arról, hogy az általunk használni kívánt dializáló hártya anyaga átjárható-e az eltávolítandó anyagok számára. Előfordul ugyanis, hogy a töltéssel rendelkező molekulákat a membrán anyaga megköti, ezzel lassítja, vagy megakadályozza eltávolításukat.

A dialízis hatásosságát a dializáló oldat térfogatának növelésével és intenzív kevertetésével növelhetjük. A gyakorlatban általában a minta térfogatának százszorosát célszerű használni. Meggyorsíthatjuk a tisztítást a dializáló oldat többszöri cseréjével, növelve a koncentráció-gradienst, és ezzel az anyagtranszport sebességét. A dialízis legalább 6-8 órát vesz igénybe, de tömény sók eltávolítását (pl. ammónium-szulfát, karbamid stb.) legalább 1 napig végezzük.

Laboratóriumi alkalmazás: a folyadékot dializáló hüvelybe (csőszerű, mint a kolbászbél) töltjük, két végén lezárjuk és egy mérőhengerbe lógatjuk (4.3.2.3.1. ábra).



4.3.2.3.1. ábra: A dialízis elve

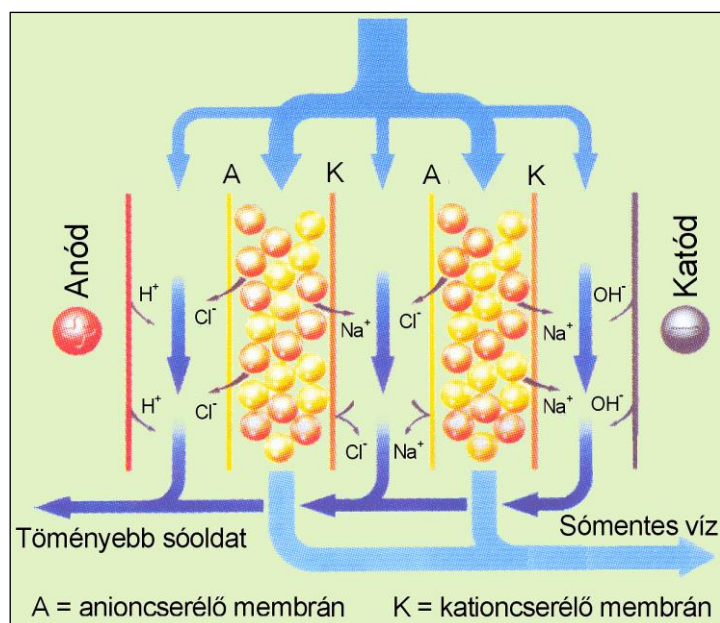
Orvosi alkalmazásban a dialízis = „művese-kezelés”: a páciens vérének egy membránkapillárisokból álló dializáló modulon vezetnek keresztül, itt a vérből eltávoznak azok a kis molekulájú káros anyagcseretermékek, amelyeket a beteg vese nem tud kiválasztani (pl. karbamid).

4.3.2.4. Elektrodialízis

Az elektrodialízis olyan művelet, mellyel két, membránnal elválasztott oldat között elektromos tér hatására ionáramlás jön létre. Az elektrodialízis ionos oldatok koncentráció-viszonyainak megváltoztatására alkalmas.

A készülékben felváltva helyeznek el anion- és kationcserélő membránokat. A membránok között sóoldatot vezetnek keresztül, miközben a készülékre egyenfeszültséget kapcsolnak. Az elektromos erőter hatására az anionok az anód, a kationok a katód felé mozognak.

Mozgásuk közben az anionok csak az anioncserélő, a kationok pedig csak a kationcserélő membránon képesek áthatolni, a velük azonos töltésű membránokon viszont az elektromos taszítás miatt nem. A folyamat eredményeképpen minden második membránközben a bevezetett oldat ionokban elszegényedik, míg a köztes folyadék sótartalma növekszik. Az elektrodialízis működési elve a 4.3.2.4.1. ábrán látható.



4.3.2.4.1. ábra: Az elektrodialízis elve

A membránon kötött ionizálható csoportok nagy koncentrációjának (1-2 mekv./cm³ membrán) köszönhető, hogy a membránok viszonylag jó vezetők (~10 Ω/cm²).

A membránokat különböző szintetikus anyagokkal erősítik meg, a jobb mechanikai szilárdság elérése érdekében. Az elektrodializáló cellákban a membránok vastagsága általában 0,15–0,6 mm, a közöttük levő „rés” vastagsága 0,5–2 mm. Így egy cellapár vastagsága 1,3–5,2 mm, átlagosan 3,2 mm körül van (egy egységet száztól több százig terjedő cellapár alkot).

A membránok legfontosabb elektrokémiai jellemzői a következők:

- elektromos ellenállás
- iontranszportszám
- víztranszport (elektroozmózis)
- ellenirányú diffúzió.

Az elektromos ellenállás általában 3–20 Ω/cm² (0,5 M NaCl-oldattal egyensúlyban), és a hőmérséklet emelésével csökken.

Az iontranszportszám definíció szerint az elektromos áramnak az a hányada, melyet a membránon keresztül ellenionok szállítanak. Ha a membránban a rögzített töltések száma sokkal nagyobb, mint az oldat ionkoncentrációja, akkor a mozgó ionok többsége ellenion, az azonos töltésű ionok nem tudnak behatolni a membránba. A kereskedelmi forgalomban levő membránok iontranszportszáma általában 0,85–0,95 közötti.

Az elektroozmózis jelensége, hogy az ionokkal együtt víz is vándorol a membránokon keresztül. Ennek mértéke 100–200 cm³/szállított ekvivalens ion, kationszelektív membránokra valamivel kisebb, mint az anionszelektívekre. Viszonylag koncentrált oldatok elektrodialízisének az elektroozmózis komoly méreteket ölthet, a folyamat hatékonyságát csökkentve. Általában az alacsony víztartalmú, sok fix töltést tartalmazó membránok víztranszportja kisebb, mint a magasabb víztartalmú, kevesebb fix töltést tartalmazóké. Megjegyezzük, hogy az elektroozmózis nem minden esetben káros, egyik felhasználási területe kolloid oldatok töményítése.

Az ellenirányú diffúzió az ionok vándorlása az elektrodialízis során létrejött koncentráció-gradiens hatására. Ez a vándorlás az elektromos transzport ellenében megy végbe, így az elektrodialízis hatékonyságát rontja. Hatása minél szelektívebb membránok alkalmazásával védhető ki.

Alkalmazások:

1. Nagytisztaságú víz előállításához előkezelésként alkalmazható az elektrodialízis. Az így előkezelt vizet azután szűréssel, aktív szenes derítéssel és ioncserével tovább tisztítják.

2. Brakkvizek sótalanítása ivóvíz előállítása céljából ma az elektrodialízis elsődleges felhasználási területe. Brakkvíznek nevezik azokat a vizeket, melyeknek sótartalma lényegesen kisebb a tengervíznél, de nagyobb az édesvizekéénél.

Ha a legjellemzőbb példát tekintjük (0,005 n sótartalmú víz előállítása 0,05 n brakkvízből), 1 V/cellapár feszültséget feltételezve az 1 m³ ivóvíz előállításához felhasznált energia 1,3–1,8 kW. A világ több száz telepe között olyan is akad, melynek teljesítménye eléri a 10 000 m³/nap-ot.

3. Só előállítása tengervízből szintén gyakran alkalmazott ipari léptékű technológia. Az így előállított só mennyisége több mint egymillió tonna évente.

4. Tejipari alkalmazások

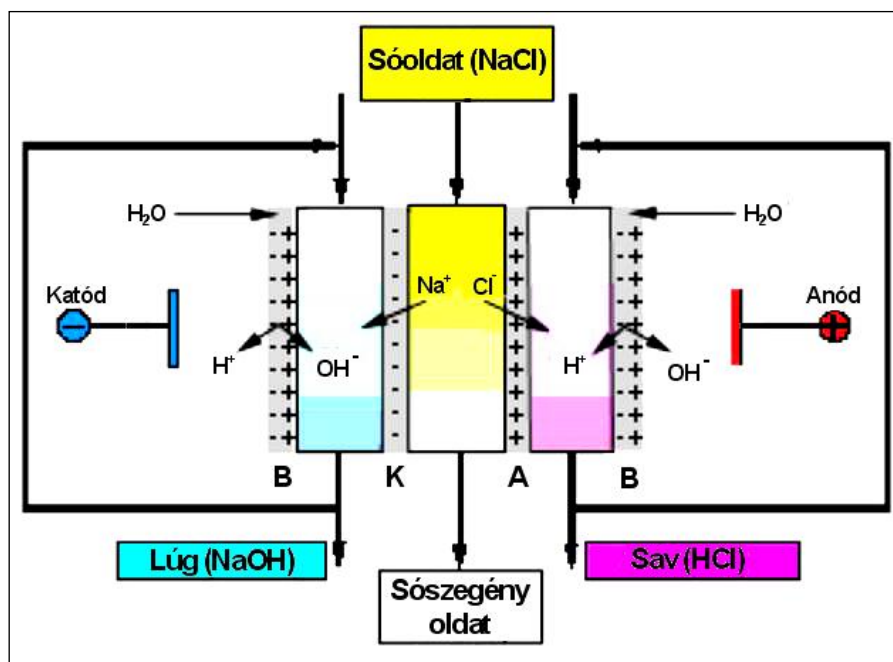
A sajtgyártásnál visszamaradó, még hasznos fehérjéket tartalmazó savó felhasználását magas iontartalma korlátozza. Az ionok eltávolításának egyik módszere az elektrodialízis. Előnyei az ioncserével szemben, hogy a fehérjék denaturálódása kisebb mértékű, és könnyen megvalósítható a folyamatos üzemmódban.

5. Fermentációs alkalmazások

A fermentációs technológiáknál a végtermékgátlás kiküszöbölésére, a bioszintézis folyamatos fenntartására használják az elektrodialízist. Szerves savak (pl. ecetsav) fermentációjánál a terméket elektrodialízissel eltávolítják a fermentálóból, míg a fel nem használt nem-ionos szubsztrátokat (pl. glükóz) visszavezetik a fermentorba.

4.3.2.5. Bipoláris elektrodialízis

Az elektrodialízis egy továbbfejlesztett változata a bipoláris elektrodialízis. Ennél az eljárásnál kettős rétegű, kation- és anioncserélő réteget egymás mellett tartalmazó membránokat (az ábrán B-vel jelölve) is alkalmaznak. Ezek a membránok megfelelő térerősség esetén katalizálják a vízmolekulák disszociációját, két oldalukon hidrogén- és hidroxil-ionokat adnak le. Ezek a sókból elválasztott ionokkal savat, illetve bázist képeznek. A membránok megfelelő elrendezése esetén a bipoláris elektrodialízissel a sók szétbonthatók az alkotó savra és bázisra.

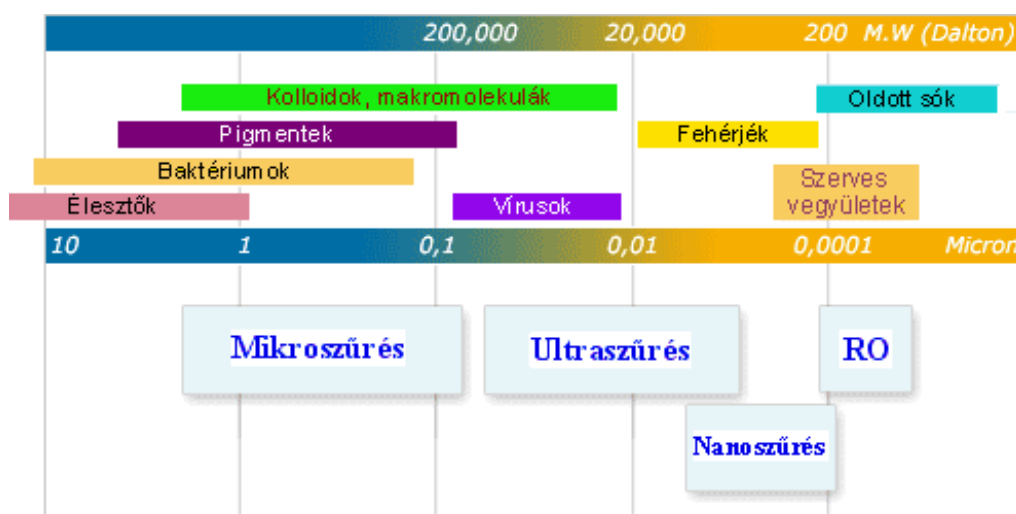


4.3.2.5.1. ábra: A bipoláris elektrodialízis elve

A savak felszabadítása sókból gyakori feladat a biológiai iparokban is. A szerves savak (citromsav, tejsav, almasav, borkősav, borostyánkősav, glükonsav) fermentációs előállításánál ezt jellemzően kalcium-hidroxidos lecsapással, majd kénsavas feltárással oldják meg. Ennél az eljárásnál melléktermékként sztöchiometrikus mennyiségű gipsz keletkezik, amelynek elhelyezése komoly problémákat okoz. Ezt küszöböli ki a bipoláris elektrodialízis, a csapadék leválasztása majd feloldása kikerülhető, igaz, hogy jelentős elektromos energia felhasználásával.

4.3.2.6. Nyomással végrehajtott membránszűrések

A membránműveletek a membránok pórusmérete és az elválasztandó részecskék (molekulák) mérete szerint is csoportosíthatók. A határok az egyes művelettípusok között nem élesek, átfedések vannak, ahogy ezt a 4.3.2.6.1. ábra szemlélteti.



4.3.2.6.1. ábra: A membránműveletek mérettartománya

Növekvő sorrendben áttekintve, a legkisebb méretek tartományában (ionok, ásványi sók) működik a fordított (reverz) ozmózis, aztán a makromolekulák elválasztására alkalmas ultra szűrés és végül a le-

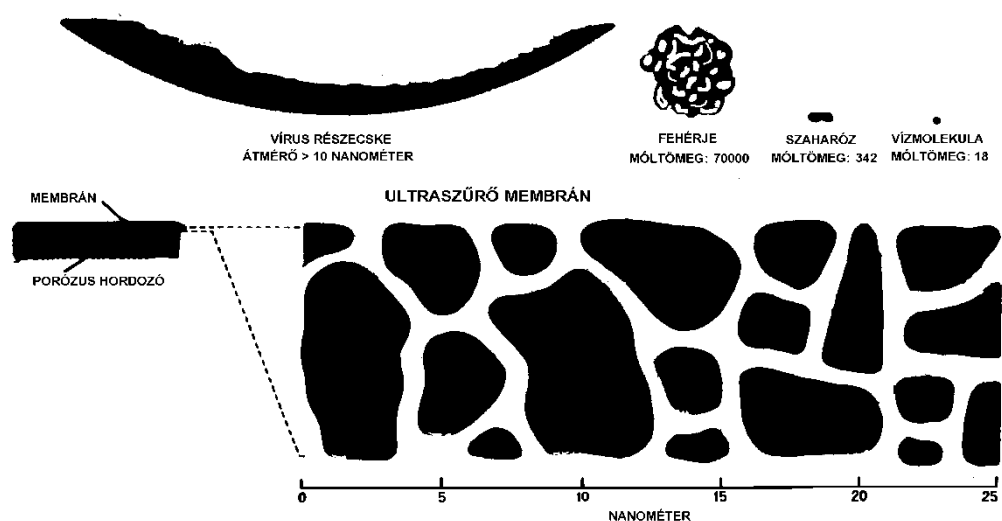
begő szilárd részecskéket visszatartó mikroszűrés. Az egyes műveletek jellemző elválasztását szemlélteti a következő animáció.



4.3.2.6.1. animáció: A membránszűrések összehasonlítása

A nanoszűrés területe nincs pontosan meghatározva, határai bizonytalanok, a fordított ozmózis és az ultraszűrés között helyezkedik el. Az ásványi sóknál nagyobb, de kicsinek számító szerves molekulák elválasztására szolgál.

Egy ultraszűrő membrán és az elválasztandó részecskék méretviszonyait szemlélteti a 4.3.2.6.2. ábra.

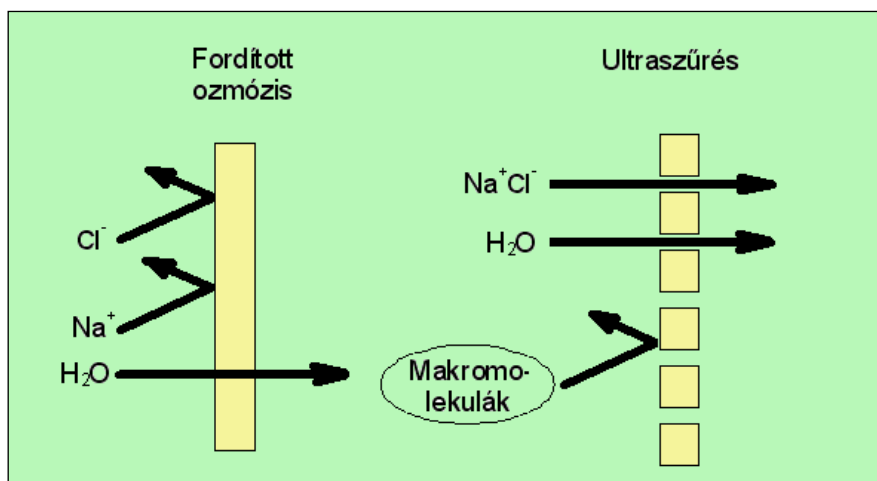


4.3.2.6.2. ábra: Az ultraszűrő membrán keresztmetszete és a különböző részecskék méretviszonyai

Fordított (reverz) ozmózis (RO)

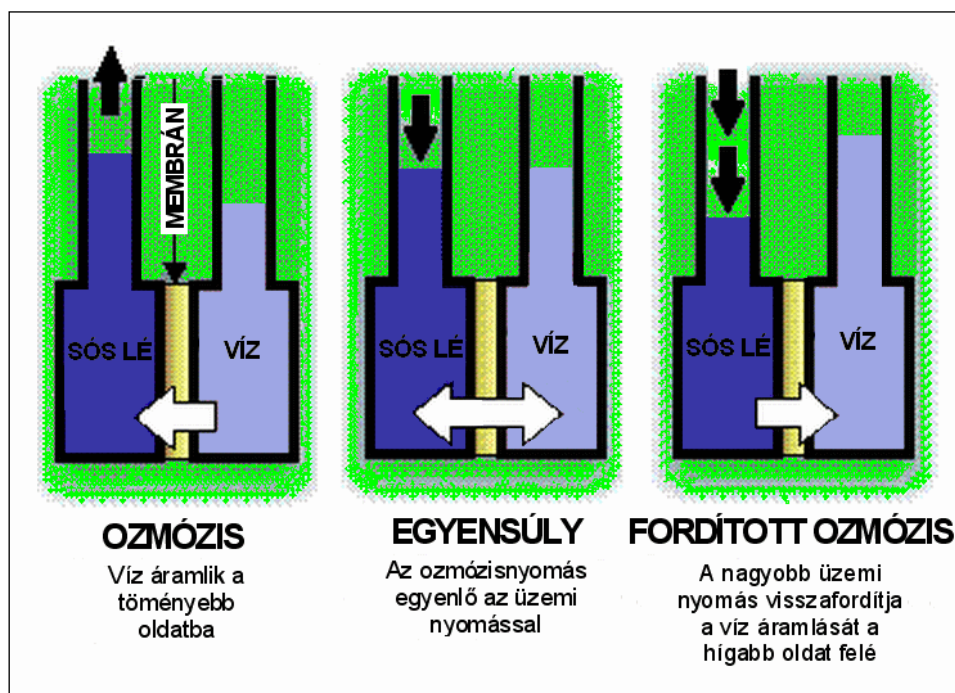
A fordított (reverz) ozmózis hajtóereje a nyomás, jellemző mérettartománya 50–500 (mások szerint csak 50–100) Dalton. Más megfogalmazásban az oldószer és az oldott anyag molekulatömege között maximum egy nagyságrendnyi különbség van. A membrán anyagán gyakorlatilag csak a vízmolekulák hatolnak át (4.3.2.6.3. ábra).

Ebben a tartományban nem értelmezhető a pórusátmérő fogalma, hiszen a „pórus” falát alkotó atomok, atomcsoportok mérete sokkal nagyobb a vándorló molekuláknál, így semmiféle „falról” vagy egyéb más jól definiálható geometriájú struktúráról nem beszélhetünk. Valójában az elválasztás a különböző molekulák eltérő diffúziós viselkedésén alapul, a vízmolekuláknak a laza térhálós szerkezetű, de folytonos membránanyagon kell átdiffundálnia. Felmerülhet az a kérdés, hogy miért tud áthatolni a membránon a vízmolekula ($M = 18$), és miért nem tud a hasonló méretű nátriumion (ionsúlya = 23)? A magyarázat az anyagi tulajdonságokban rejlik. Egyrészt az ionok sohasem léteznek önmagukban (legfeljebb olvadékokban vagy plazmaállapotban), oldatban jelentős hidrátburok veszi ezeket körül, és ezzel a 6–20 vízmolekulával együtt már lényegesen nagyobb méretűek/tömegűek. Másrészt a membrán anyaga a töltéssel nem rendelkező molekulákat inkább befogadja és átengedi, mint az ionos karakterűeket.



4.3.2.6.3. ábra: A reverz ozmózis és az ultraszűrés összehasonlítása

A fordított (reverz) ozmózis arról kapta a nevét, hogy itt az ozmózis jelenségét, a víz áramlási irányát megfordítják. Alapesetben az ozmózis úgy működik, hogy a membrán két oldala közötti koncentrációkülönbség úgy egyenlítődik ki, hogy a víz áramlik át a hígabb oldatból a töményebbe, mindaddig, amíg a két koncentráció ki nem egyenlítődik. Ha a töményebb oldat zárt térben van, és térfogata nem tud növekedni, akkor jelenik meg az ozmózisnyomás, amely szétfeszíteni igyekszik a zárt teret. Ha erre a térre külső erővel pont akkora nyomást gyakorolunk, mint az ozmózisnyomás, akkor éppen meg tudjuk állítani a víz átlépését a membránon. Nyomásegyensúly alakul ki, és ettől a konvekció megszűnik. A reverz ozmózisnál az egyensúlyi nyomásnál is nagyobb üzemi nyomást adnak a töményebb oldalra, ezzel a víz áramlását megfordítják, a töményebb oldatból megy át a tiszta víz oldalra.



4.3.2.6.4. ábra: Az ozmózis megfordítása nyomással

Az ozmózisnyomás az üzemi nyomással szemben működik, így a csak a kettő különbsége szállítja át a vizet a membránon, emiatt igen nagy nyomások szükségesek. Az üzemi nyomás elérheti a 80-100 bart is. (Emlékeztetőül: a fél mólos (~3%-os) NaCl-oldat (de ozmózisnyomás szempontjából a teljes disszociáció miatt egy mólosként viselkedik) ozmózisnyomása 20 °C-on kb. 24 bar – ennyit le kell

vonni a szivattyú által létrehozott nyomásból. A víz fluxusa még ilyen nagy nyomáskülönbség mellett is viszonylag kicsi. A fordított ozmózist elsősorban só(k) eltávolításra alkalmazzák. Legnagyobb léptékben tengervíz sótalanítására használják a Közel-Keleten, de alkalmazzák kazántápvíz előkészítésére, a gyógyszeriparban pirogénmentesítésre és különlegesen tiszta víz előállítására, pl. szövettenyésztéshez, oltóanyag-készítéshez.

Nanoszűrés

A nanoszűrés kategóriáját nem definiálták egyértelműen, minden szerző más határokat ad meg. Az elválasztott atomtömegekre 100 és 1000 között sokféle adatot lehet találni, átmeneti tartomány a reverz ozmózis és az ultraszűrés között, mindkét területtel átfedésben. A biológiai iparok technológiáiban a kis molekulájú [primer metabolitok](#) elválasztására alkalmazzák, például tejsavgyártásnál a termelt tejsav és a maradék glükóz elkülönítésére.

Ultraszűrés (UF)

Molekulatömeg szerint az ultraszűrés az 500–100 000 daltonos tartományban működik, bár egyes szerzők a felső határt lényegesen magasabban adják meg. Az ultraszűrő membránon valódi pórusok vannak (a jellemző átmérő 1–100 nm) és méret szerinti elválasztást valósít meg.

Az ozmotikus hatások a nagyobb molekulatömegek miatt nagyságrendekkel kisebbek, legtöbbször el is hanyagolhatók. Ennek megfelelően az alkalmazott nyomással csak a membrán – lényegesen kisebb – hidraulikai ellenállását kell legyőzni, azaz jóval kisebb nyomás elegendő (1–20 bar). A membránok vízpermeabilitása akár egy nagyságrenddel is nagyobb lehet, mint a fordított ozmózisnál.

Mikroszűrés

A mikroszűrésnél az elválasztandó részecskék már nem oldott molekulák, hanem lebegő szilárd fázist alkotó testek. A mikroszűrő membrán jól definiált pórusai a 0,1–1,0 µm tartományba esnek. A nagyobb méretek miatt az elválasztás diffúziós jellege teljesen háttérbe szorul, és a membrán szitahatása érvényesül. A pórusokon szabadon áthatolnak az oldott anyagok, a kis és nagy molekulák egyaránt, valamint a kolloid részecskék egy része. Teljes visszatartás érhető el az élő sejtekre, ami lehetővé teszi az élelmiszeriparban különféle olatok (bor, sör, gyümölcsle) sterilre szűrését.

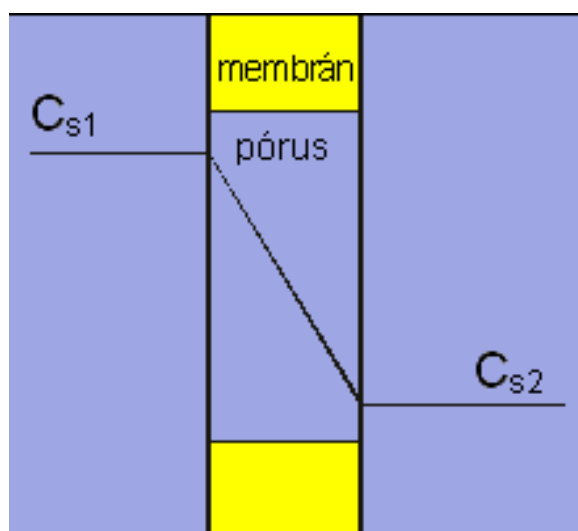
4.3.3. A membrános elválasztások elmélete

Tekintsük át az egyes jelenségek mennyiségi leírását külön-külön, és azután foglaljuk össze ezeket egy egyenletbe.

1. Vizsgáljuk először a legegyszerűbb esetet, a koncentrációkülönbség hatására létrejövő komponens áramot. A két folyadék a membrán pórusain keresztül érintkezik egymással, az oldószer maga nem mozog = nincs konvekciós transzport, csak az oldott anyagok pórusdiffúziója működik. A membrán két oldala között fennálló koncentrációkülönbség a Fick-törvénnyel leírható diffúziós transzportot indítja meg:

$$J_i = -D_i \text{grad } a_i = D \frac{\Delta c}{L}$$

ahol: J_i – az i komponens árama
 D_i – az i komponens diffúziós állandója
 a_i – az i komponens aktivitása
 L – a membrán vastagsága.



4.3.3.1. ábra: Az ideális diffúziós koncentrációprofil

A gradiens kifejezhető a koncentrációkülönbség és a membrán vastagságának (= a pórus hosszának) hányadosaként. Ideális állandósult állapotot feltételezve a pórusban lineáris koncentrációprofil alakul ki (4.3.3.1. ábra). Elvileg figyelembe kellene venni a membrán két oldalán kialakuló határrejteget, a melyek szintén ellenállást jelentenek, és eltorzíthatják az egyszerű vízszintesekkel közelített koncentrációprofilot. A gyakorlatban azonban a pórusokon való átjutás sokkal lassabb folyamat, mint a folyadék főtömegéből a membrán felületére történő diffúzió. Ennek elsődleges oka az, hogy a pórusok összes keresztmetszete sokkal kisebb, mint a membrán felülete. A leglassabb folyamat, a póruson való áthaladás a sebességhatározó, emellett a pórusok két végénél fellépő anyaghiány, illetve a többlet olyan gyorsan pótlódik, illetve eloszlik, hogy az állandó (vízszintes) koncentrációgörbe torzulása elhanyagolható.

Kicsit más az egyenlet felírása abban az esetben, ha a diffúzió nem a pórusokon át történik, hanem a membrán anyagában. Ilyen folyamat például az etilalkohol diffúziója vizes közegből erősen apoláris anyagú (teflon, szilikon) membránokon keresztül. A problémát az okozza, hogy a koncentrációkat és a diffúziós állandót is a membrán anyagában kellene megadni, ahol általában ez nem mérhető. Közelítésként vezetik be az adott komponens ún. „megoszlási hányadosát”:

$$K = \frac{c_{s1}}{c_{m1}} = \frac{c_{s2}}{c_{m2}}$$

ahol: c_s – koncentrációk az oldatban
 c_m – koncentrációk a membránban
 K – „megoszlási hányados” az oldószer és a membrán anyaga között,

amellyel feltételezzük, hogy a membránban és az oldatban létrejövő koncentrációk egyensúlyi esetben arányosak. A diffundáló komponens árama az alábbi módon fejezhető ki:

$$J_i = \frac{D}{L}(c_{m1} - c_{m2}) = \frac{DK}{L}(c_{s1} - c_{s2}) = P_m \Delta c_s$$

$P_m = DK/L$ = membrán permeabilitás.

A három állandót a P_m (membrán permeabilitás) konstansába vontuk össze. Ezzel két nehezen meghatározható jellemzőt (D , K) egy mérhető paraméterbe foglaltunk össze.

A koncentrációkülönbség hatására tehát csak az oldott komponensek mozognak, az oldószer nem.

2. A nyomáskülönbség hatása más. Elsősorban az oldatot préseli át a membránon, és eközben az oldószer viszi magával a benne oldott kis mólsúlyú anyagokat (konvektív transzport). A pórusáramlás leírására más tantárgyakban többféle egyenlet is előfordult:

Az alapegyenlet:

$$J_{vol} = -\frac{k}{\mu} \text{grad } p$$

a folyamat hajtóereje a nyomáskülönbség, az anyagi és technikai paramétereket egy k konstansba foglalják össze, egyedül a viszkozitást emelik ki a nevezőbe.

A szűrésnél

$$= \frac{k \cdot \Delta p}{\mu L} \quad \text{D'Arcy törvénye}$$

Kapilláris áramlásnál:

$$= \frac{\pi r^4 \Delta p}{8\eta \Delta x} \quad \text{Hagen–Poiseuille-törvény}$$

Az analógia teljes, a gradienst egy dimenzióban helyettesíteni lehet a nyomáskülönbség és a pórus hosszának hányadosával, a viszkozitás a nevezőben szerepel. A membránszűrésnél még tovább egyszerűsített formulát használnak:

$$J_{vol} = L_p \Delta p$$

bevezetve az L_p = oldószer permeabilitást (= liquid permeability), amelybe belefoglalják a membrán vastagságát és a viszkozitást is.

3. A membrán két oldala között fellépő ozmotikus nyomáskülönbség szintén az oldószer (víz) kényszeráramlását okozza. Az oldatok ozmózisnyomását a Van't Hoff-törvény segítségével számolhatjuk:

$$\pi = RT \sum c_i$$

A membrán két oldala között mutatkozó ozmózisnyomás-különbség által létrehozott térfogatáram pedig analóg módon fölírva:

$$J_{vol} = L_p \Delta \pi$$

A membránszűrésnél a ráadott nyomás ellene dolgozik az ozmózisnyomásnak, így az eredő szűrletáram a kettő különbségével fejezhető ki.

$$J_{vol} = L_p (\Delta p - \Delta \pi)$$

Egy valós membránszűrésnél, ahol mindhárom hatás egyszerre érvényesül, figyelembe kell venni azt is, hogy a membránon áthaladó kisebb molekulatömegű komponensek nem hoznak létre ozmotikus nyomáskülönbséget, hiszen koncentrációjuk a membrán két oldalán azonos. A jelen lévő részecskéknek csak a visszatartott hányada vehető számításba az ozmózis szempontjából. A visszatartott hányad jellemzésére vezették be a visszatartó képességet (rejekciós tényező, membrán-reflexiós tényező, retenció, szelektivitás) jelölése: r vagy σ (szigma), értelmezése:

$$\sigma = \left(1 - \frac{c_{s2}}{c_{s1}} \right)$$

Értéke 0 és 1 között változhat. Ha a komponensek egyáltalán nem haladnak át a membránon, a szűrletoldalán a koncentráció (c_{s2}) nulla, a σ értéke 1 (teljes visszatartás). Ha viszont a membránon minden jelen lévő anyag akadálytalanul áthaladhat, nem lesz koncentrációkülönbség a membrán két oldala között ($c_{s1} = c_{s2}$), a tényező értéke 0 (nulla visszatartás). A rejekciós tényező értelmezhető a

jelen lévő összes anyagra is (mekkora hányadot tart vissza a membrán), illetve egy oldott komponensre is (a reális membránoknál egy molekulaméret-tartományban egy adott komponensre is a részleges áteresztés jellemző). A visszatartó képességgel kifejezve az anyagáram:

az oldószerre:
$$J_{vol} = L_p (\Delta p - \sigma \Delta \pi)$$

az oldott komponensekre:
$$J_i = P_m \Delta c_s + (1 - \sigma) c_s J_v$$

\downarrow \downarrow
 diffúziós konvekciós
 transzport transzport

Az oldott anyagok transzportegyenlete két tagot tartalmaz. Az első a diffúziós transzportot írja le, ennek iránya a koncentrációviszonyoktól függően lehet az oldószertranszporttal azonos vagy ellentétes. A második tag írja le a konvekciós áramot, a nyomás hatására átszűrődő oldószer által szállított anyagmennyiséget. A gyakorlatban a diffúziós tag általában elhanyagolható a konvekciós mellett.

A koncentrációkülönbséggel operáló membránműveletekkel ellentétben a nyomással végrehajtott membránműveleteknél a felületi jelenségek jelentősen megváltoztatják a transzportok sebességét, az eltérések az ideális viselkedéstől jelentősek.

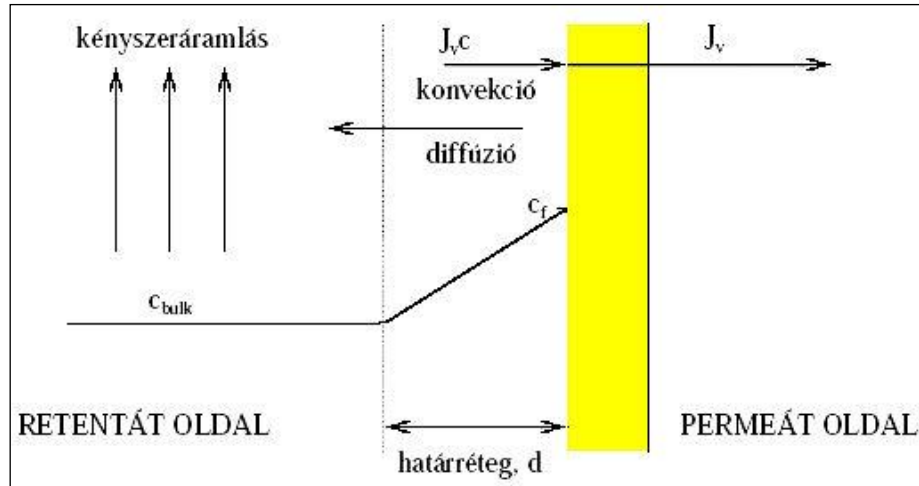
4.3.3.1. Koncentrációs polarizáció

A membránszűrés során a konvektív oldószeráram folyamatosan halad át a membránon, miközben a kis móltömegű anyagokat magával viszi. A nagyobb molekulák viszont felhalmozódnak a membrán felülete közelében. Ezt a lokális koncentrációnövekedést nevezik koncentrációs polarizációnak. Ez a többlet természetesen nem növekszik korlátlanul, hanem a koncentráció-többlet egy diffúziós folyamatot indít meg, amelynek során az anyag-többlet visszadiffundál a folyadék főtömegébe (tömbfázis, bulk). Állandósult állapotban egyensúly alakul ki a két ellentétes folyamat között. A részecskék mozgását szemlélteti a következő animáció.



4.3.3.1.1. animáció: A koncentrációs polarizáció kialakulása

A kialakuló koncentrációprofil alakját mutatja az 4.3.3.1.1. ábra.



4.3.3.1.1. ábra: Koncentrációs polarizáció

Állandósult állapotban:

a konvekció a membrán felületére = ellenirányú diffúzió a főtömegbe

$$J_v c_{bulk} = D \frac{dc}{dx}$$

$$J_v = D \frac{1}{c} \frac{dc}{dx}$$

szétválasztva

$$J_v dx = D \frac{1}{c} dc$$

és integrálva:

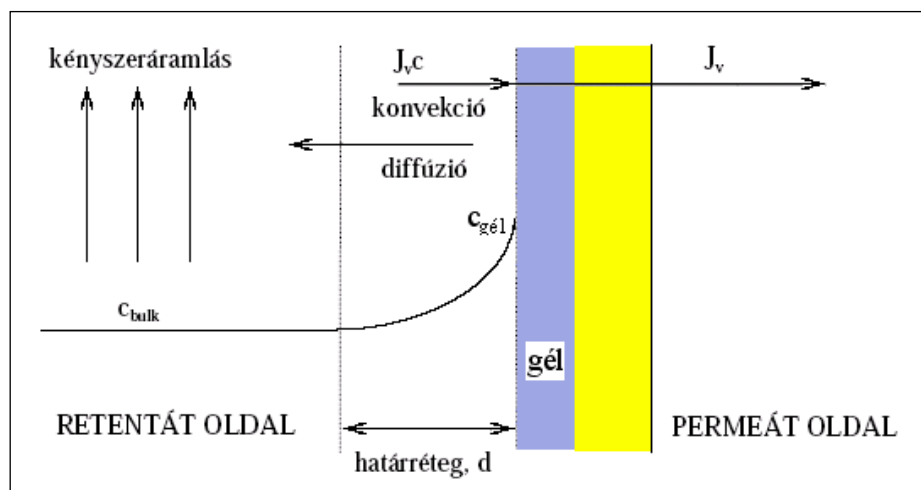
$$J_v x = D \ln \frac{c_{felületi}}{c_{bulk}}$$

$$J_v = \frac{D}{x} \ln \frac{c_{felületi}}{c_{bulk}}$$

A koncentrációs polarizáció kialakulása a membránszűrés szempontjából egyértelműen hátrányos. A megnövekedett koncentráció a felületen lassítja a szűrést, a hatásfok romlik, a művelet sebessége csökken.

4.3.3.2. Gélpolarizáció

Ez a jelenség olyan makromolekulák elválasztása során mutatkozik, amelyek bizonyos koncentráció felett gélképzésre hajlamosak. Típuspélda a fehérjék ultraszűrése, ahol a fehérjeláncok egy nagy víztartalmú, de szilárd fázis (gél) kialakítására (szol-gél átmenet) hajlamosak. A felületi koncentráció-többlet kialakulásának mechanizmusa ugyanaz, mint a koncentrációs polarizációnál, de ha ez a koncentráció eléri a gélesedési határt, a membrán felületén egy gélbevonat alakul ki.



4.3.3.2.1. ábra: Gélpolarizáció

A fenti levezetést analóg módon megismételve a

$$J_v = K \ln \frac{c_{\text{gélésedési}}}{c_{\text{bulk}}}$$

formát kapjuk.

A gélréteg kialakulása a művelet szempontjából káros. A réteg második membránként viselkedik, ellenállása hozzáadódik az eredeti membránéhoz, ezáltal a szűrlet térfogatárama csökken. A gélréteg ellenállását előre szinte lehetetlen számítani, a kísérleti eredmények értékeléséhez egy korrekciós tagot illesztünk a korábban levezetett összefüggésekbe: permeabilitás helyett ellenállásokkal felírva:

$$J_v = L_p (\Delta p - \Delta \pi) = \frac{1}{R_m} (\Delta p - \Delta \pi)$$

beírva a gél réteg ellenállását is:

$$J_v = \frac{1}{R_m + R_{\text{gél}}} (\Delta p - \Delta \pi)$$

Bár ez a fejezet a membránszűrés elméleti, kvantitatív leírásával foglalkozik, szaladjunk előre egy kicsit az üzemeltetési kérdésekhez és térjünk ki röviden a polarizációs jelenségek káros hatásainak csökkentésére is.

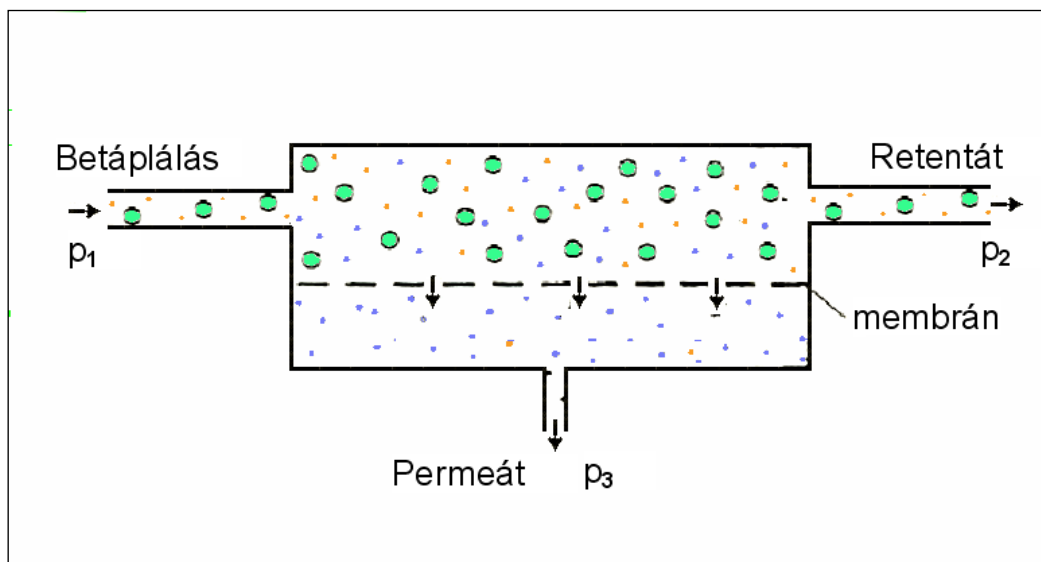
Az első gondolat azzal kapcsolatos, hogy mit nem célszerű tenni. Ha lelassul a szűrés, az első gondolat az lenne, hogy növeljük meg a nyomást. Valójában nem célszerű a nyomáskülönbséget növelni. Mindamellet, hogy ez növeli a költségeket, általában hatástalan. Ha ugyanis megnézzük az állandósult állapotra felírt egyensúlyi egyenleteket, kitűnik, hogy az egyensúlyi szűrletáram nagysága független a nyomástól. Így tehát széles tartományban hiába változtatjuk a nyomást, a fluxus állandó marad. Némi eredményt érhetünk el kis fluxus értékeknél, mivel ekkor mintegy lehetőséget adunk az ellenirányú diffúziós folyamatnak, hogy elszállítsa a felületi koncentráció többletet.

Sokkal hatékonyabb beavatkozást tesz lehetővé a felületi határréteg vastagságának csökkentése. A vegyipari műveletek tanulmányozásánál alapelv volt, hogy a fluidum turbulens áramoltatása valamennyi transzportfolyamatnál elvékonyította a felületi diffúziós határréteget, ezzel csökkentette az ellenállását. Ez a membránszűrésnél is érvényes, a keveréssel vagy más kényszeráramlással létrehozott turbulencia akár többszörösére növelheti a szűrlet fluxusát. Az optimum itt is gazdasági jellegű, mivel a membránok között gyakran csak szűk csatornák vannak (ld. később, a membránrendezések, modulok tárgyalásánál), amelyekben turbulens áramlást csak nagy szivattyúzási munka befektetésével lehet elérni.

4.3.4. A technológiai paraméterek hatása a membránszűrésre

4.3.4.1. Nyomáskülönbség

A nyomáskülönbség megadása nem minden esetben egyszerű, mivel a membránok mentén áramló folyadékban is jelentkezik nyomásesés, így a membrán két oldala közötti nyomáskülönbség a készülékben pontról pontra változik.



4.3.4.1.1. ábra: Nyomásmérési pontok membránszűrőnél

A p_1 és p_2 nyomások csak akkor különböznek lényegesen, ha a membránmodulon való átáramlás során nyomásesés jön létre, azaz a folyadéknak szűkület(ek)en, vékony csatornákon kell áthaladnia. Ha az oldat ilyen „fojtáson” megy keresztül, a nyomásesés mértéke függ az áramlási sebességtől, ami a belépő nyomással változtatható. A szűk csatornákon végighaladó folyadék nyomása fokozatosan csökken, miközben a szűrletoldalon a nyomás gyakorlatilag állandó (rendszerint atmoszférius kifolyást állítanak be). Tehát a szűrés sebességét meghatározó, a membrán két oldala között fellépő nyomáskülönbség is helyről helyre változik. A pontos matematikai leírás helyett jó közelítéssel használhatjuk a nyomások számtani középértékét:

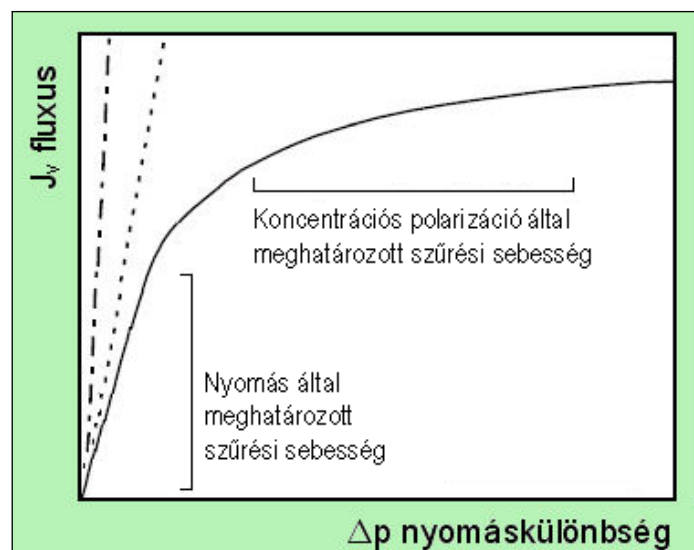
$$\frac{p_1 + p_2}{2}$$

A hajtóerőként működő átlagos nyomáskülönbség a membrán két oldala között tehát:

$$\Delta p = \frac{p_1 + p_2}{2} - p_3$$

Nagy áramlási keresztmetszetű membránmoduloknál a nyomásesés elhanyagolható. A membrán retentát oldalán úgy lehet nagyobb (de mindenhol azonos) nyomást fenntartani, hogy a retentát kilépési pontjára egy fojtószelepet szerelünk, és ezzel állítjuk be a kívánt nyomást.

A szűrlet fluxusa egyenesen arányos a membrán két oldalán észlelhető nyomáskülönbséggel (D'Arcy-törvény, Hagen–Poiseuille-törvény). A lineáris jelleg azonban csak az oldószerre (vízre), illetve a vissza nem tartott anyagokra ($\sigma = 0$) érvényes. Visszatartott anyagok jelenlétében a koncentrációval, illetve a retencióval növekvő mértékben egyre nagyobb az eltérés. Bizonyos határ felett a görbe vízszintesbe hajlik, ezen a platón már a nyomás növelése nem befolyásolja a fluxust (ld. az előző fejezetben a polarizációs jelenségek leküzdéséről írottakat).

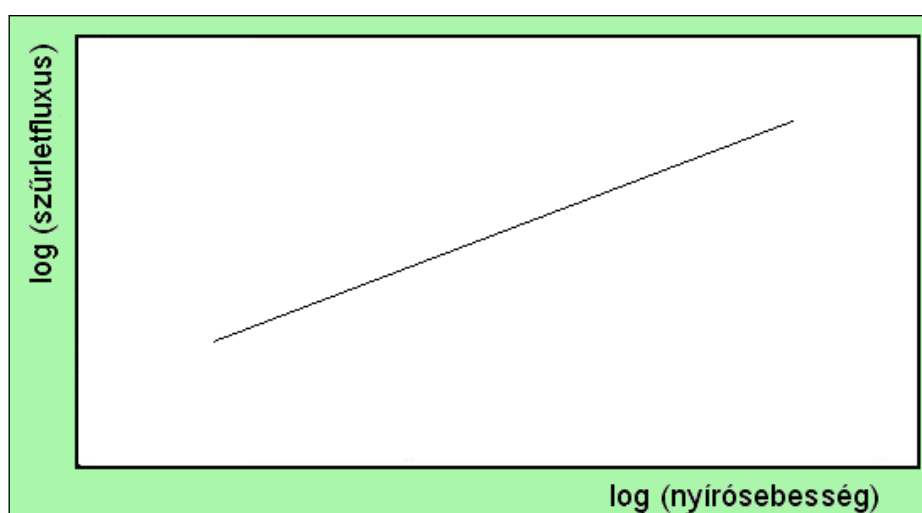


4.3.4.1.2. ábra: A nyomáskülönbség hatása a membránszűrés sebességére

4.3.4.2. Áramlási viszonyok

A folyadék áramlása a felületi jelenségeket nagymértékben befolyásoló paraméter. A membrán felületével párhuzamos mozgás biztosítja azt a korábban rögzített feltételt, mely szerint a membrán felületén lerakódás nem keletkezhet, az elválasztás csakis magán a membránon történik. Itt újra használják a keresztáramú szűrés elvét. A molekulák szűrésénél nem a szűrőlevegő kirakódását kell megakadályozni, hanem a visszatartott molekulák koncentrációjának növekedését, azaz a koncentrációs polarizációt. A polarizációs jelenségeknél tárgyaltuk, hogy a felületi határreteg vastagsága csökkenthető az áramlás turbulenciájának fokozásával. A membrán felületével párhuzamosan /érintőlegesen létrehozott turbulens áramlás elvékonyítja a felületi határreteget, ezáltal lerövidíti a diffúziós úthosszát a főtömegbe távozó visszatartott molekulák számára.

A turbulencia mértékét kvantitatívan többféleképpen is jellemezhetjük. A Vegyipari műveletek tárgyban általánosan alkalmazott dimenziómentes Reynolds-szám itt kevésbé használható a szűrőmodulok csatornáinak sajátos kiképzése miatt. Jellemezhetjük viszont az áramlást a nyírósebességgel. A szűrletfluxus és a nyírósebesség kapcsolata hatványfüggvénnyel írható le, amely log-log ábrázolással linearizálható (4.3.4.2.1. ábra).



4.3.4.2.1. ábra: Az áramlási viszonyok hatása

Az optimális áramlási sebesség meghatározása fontos mérnöki optimalizálási feladat, mivel az áramlás gyorsítása egyik oldalról növeli a szűrési sebességet és a retenciót, másrészt viszont nő a szivattyúzás energiaigénye és a rendszer melegedése is.

4.3.4.3. Makromolekula-koncentráció

A részben vagy teljesen visszatartott makromolekulák jelenléte a polarizációs jelenségek miatt gátolja a membrántranszportot. A polarizációs jelenségek tanulmányozásánál láttuk, hogy a létrejövő fluxus logaritmikusan függ az oldat koncentrációjától:

$$J_v = \frac{D}{d} \ln \frac{c_{felületi}}{c_{bulk}}$$

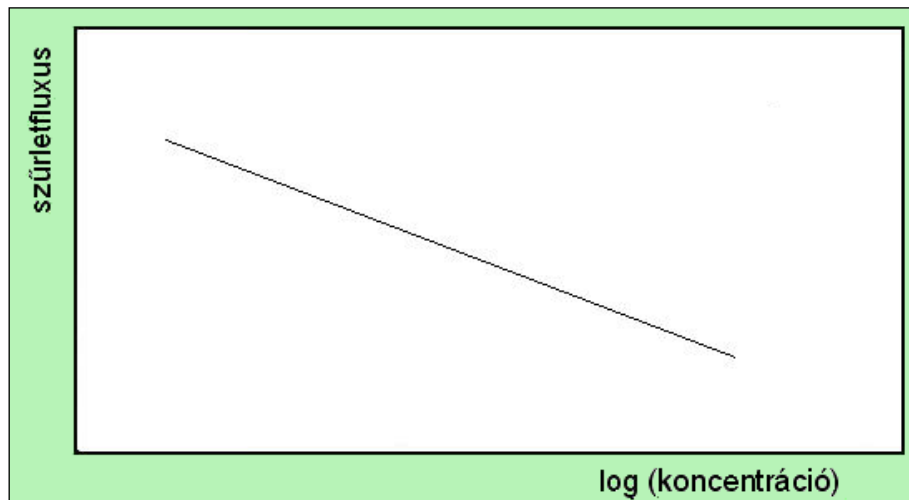
emlékeztetésül: D – diffúziós állandó

d – filmvastagság

c_p – koncentráció a membrán felületén

c_b – koncentráció a retentát főtömegében.

A főtömeg koncentrációja a nevezőben szerepel, láthatóan csökkenti a szűrési sebességet. Féllogaritmikus ábrázolásban a függvény egy negatív meredekségű egyenest ad (4.3.4.3.1. ábra).



4.3.4.3.1. ábra: A fehérjekoncentráció hatása a membránszűrés sebességére

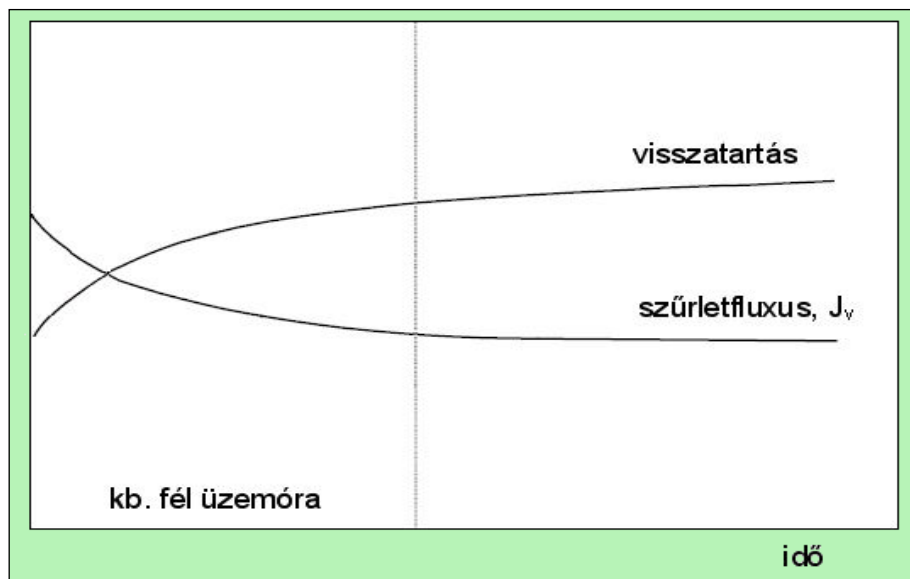
4.3.4.4. A membrán kora

A membrán tulajdonságai (visszatartás, szűrési sebesség) az üzemidővel változnak. Ezen belül megkülönböztethetjük az első használatnál bekövetkező gyors változásokat, és a huzamos használat közben bekövetkező lassú, fokozatos teljesítménycsökkenést.

Az új, csak vízzel kipróbált membrán tulajdonságai az üzemi használat első 15–30 percében nagymértékben megváltoznak, és csak egy tranziens szakasz után válnak közel állandóvá. A folyamat sok tényezőtől tevődik össze, a legfontosabb hatások:

- a fehérjék adszorpciója a membrán felületén (mindenféle kölcsönhatás lehetséges, kivéve a kovalens kötést)
- irreverzibilis gél vagy rétegeképződés a felületen (függ a visszatartott fehérjék tulajdonságaitól, koncentrációjától és a technikai paramétereiktől)
- szilárd részecskék (sejttörmelékek) „beszorulása” a membrán pórusaiba (függ a membrán kialakításától és a részecskék koncentrációjától, és pl. sejtlízistól)

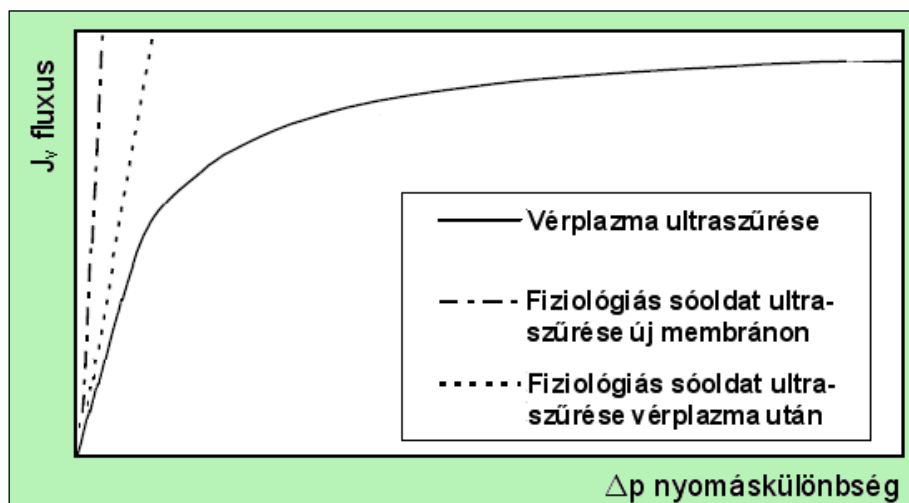
A „tiszta” membrán pórusai nagy fluxussal, de kis visszatartással szűrnek (4.3.4.4.1. ábra).



4.3.4.4.1. ábra: Az új membrán tulajdonságainak változása

A fehérjék irreverzibilis változásokat is okoznak a membránon. Ezek a későbbiekben észlelhetően csökkentik a víz, illetve sóoldat fluxusát is. A művelet végrehajtása során célszerű ezeket a hatásokat minimalizálni, a koncentrációs polarizációt olymértékben csökkenteni, hogy gélesedés ne lépjen fel; a pH és az ionerősség beállításával az adszorpciót és aggregációt minimalizálni.

Az irreverzibilis hatásokat szemlélteti a 3.4.4.4.2. ábra. Egy vadonatúj membránon tiszta oldószert, ez esetben fiziológiás sóoldatot szűrve a szűrési sebesség a nyomáskülönbség függvényében lineárisan növekszik, ahogy ezt a 4.3.3. alfejezetben bemutattuk. Ennek az egyenesnek a meredeksége az L_p oldószert-permeabilitás. Ha ugyanezt a membránt egyszer már fehérjeoldat (vérplazma) szűrésére használták, akkor utána újra kimérve ugyanezt az összefüggést kisebb meredekséget, kisebb permeabilitást észlelünk.



4.3.4.4.2. ábra: A membrán „előéletének” hatása

A későbbiekben is változik, lassan öregszik a membrán. Ez a folyamat más jellegű, mint az előző. A membrán minden egyes használat (gyártási tétel, szarzs legyártása) során elszennyeződik, a szűrési sebesség lecsökken. A gyártás befejeztével a membránt pontos eljárásrend, receptúra szerint meg kell tisztítani, akkor (majdnem) visszanyeri eredeti tulajdonságait. Ezek a tisztítás után mérhető szűrési sebességek csökkennek lassan, fokozatosan a használat során. Egy jó membránmodult több százszor vagy másként megadva 2-3 évig is lehet használni még elfogadható teljesítménnyel.

A már használt membrán tisztítását, regenerálását mosással, kémiai kezeléssel (erős savakkal és/vagy bázisokkal) vagy proteolitikus enzimekkel oldhatjuk meg. Kézenfekvő lenne visszaáramoltatással (ellennyomással) tisztítani a pórusokat, de néhány gyártó ezt nem javasolja, mivel az ellennyomás felszakíthatja a vékony, kis pórusméretű felületi réteget, ezzel tönkretéve a membránt.

4.3.4.5. Hőmérséklet

A hőmérséklet megváltoztatása több ponton is befolyásolja a folyamatot. A legfontosabb a melegítés viszkozitáscsökkentő hatása. A viszkozitás csökkenésével az áramlás a membrán pórusaiban könnyebbé válik, ezáltal nő a szűrlet fluxusa. A hőmérséklettel ugyanakkor megváltoznak az adszorpciós folyamatok egyensúlyi viszonyai, a molekulák diffúziós állandói, kismértékben változnak a membrán anyagának tulajdonságai is. A növekvő diffúziósebesség csökkenti a polarizációs jelenségeket, mivel gyorsul a felületi koncentráció-többlet visszavándorlása. A különböző hatásmechanizmusú és különböző irányú változások eredőjét analitikusan nehéz leírni, a tapasztalatok szerint a hőmérséklet emelkedésével a szűrési sebesség nő, a retenció pedig csökken. Ez arra mutat, hogy érdemes lenne a magasabb hőmérsékleteken végrehajtani a membránszűrést. Ugyanakkor figyelembe kell venni a biomolekulák hőérzékenységet, denaturálódását vagy kicsapódását. A gyakorlatban a szűrőberendezéseket nem fűtik, mivel a keringetésre befektetett teljesítmény melegíti a levét. A hőfokot fölengedik 40-50 fokra, és ha ezt meghaladja, akkor a cirkulálókörbe beépített hőcserélőben hűtve ezen a hőfokon tartják a rendszert.

4.3.5. A membránszűrés anyagmérlegei

4.3.5.1. Alapfogalmak

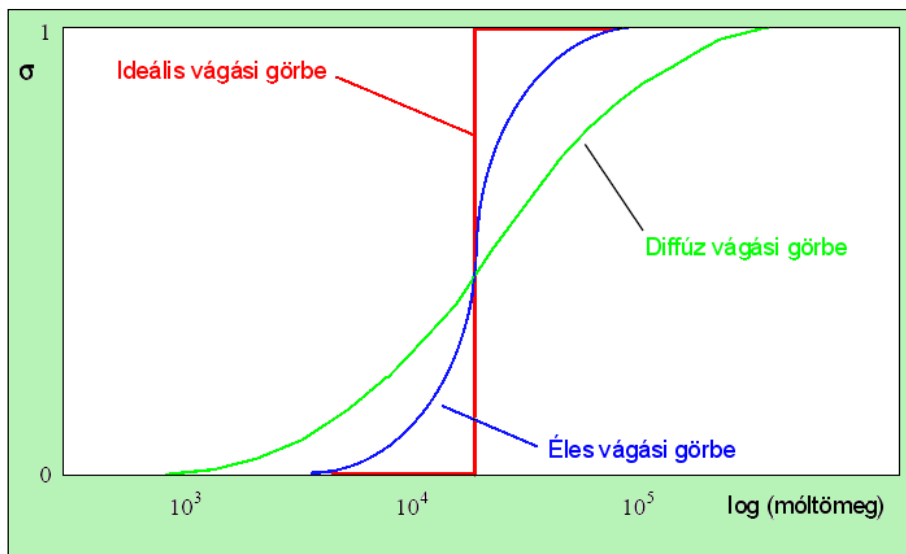
A membránműveleteket leíró mérlegegyenletek felírásához előbb célszerű áttekinteni a használatos mennyiségek definícióját.

Elsőként térjünk vissza a membrán visszatartására, szelektivitására, amit a már tárgyalt membránrejekciós (reflexiós, retenciós) tényezővel jellemezhetünk. A definíció szerint a koncentrációkkal kifejezve:

$$\sigma = 1 - \frac{c_p}{c_r}$$

ahol c_p – a koncentráció a permeátban
 c_r – a koncentráció a retentátban.

A membránok áteresztése a különböző méretű molekulákra nézve csak elméletileg adható meg egy konkrét mérettel. A valóságban ez mindig egy szűkebb vagy szélesebb molekulatömeg-tartomány, amelyet az ún. vágási görbével jellemezhetünk. Az ideális membrán vágási görbéje teljesen egyenes, lépcsős függvény. A kitűzött molekulatömeg alatt egyáltalán nem enged át semmit, fölötte pedig teljes az áteresztés. A valós membránok csak közelítik az ideális viselkedést, a lépcső helyett szigmoid görbéket kapunk. A membrán „jóságát” azzal jellemezhetjük, hogy vágási görbéjük mennyire áll közel az ideálishoz, milyen keskeny a részleges visszatartási tartomány. A szelektív, meredek vágási görbéket élesnek, a lapos, széthúzódó görbét diffúznak nevezik (a „sharp” és „diffuse” angol kifejezések tükörfordítása).



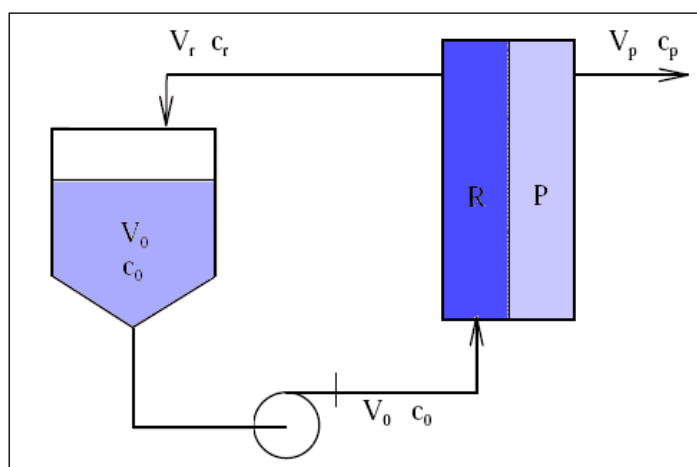
4.3.5.1.1. ábra: Vágási görbék

A visszatartás-méret görbe ellapulását egyrészt a membrán heterogenitása (a pórusméret szórása, szabálytalan alakú pórusok), másrészt a molekulák alakjának változatossága okozza. A membrán egyik legfontosabb jellemzője, a vágási (cutoff) érték az a molekulatömeg, amelyet az adott membrán 90%-ban (egy régi konvenció szerint 50%-ban) visszatart.

Az ultraszűrő membránoknál a szelektivitást ismert nagyságú, lehetőleg globuláris makromolekulákkal vizsgálják. A mért cutoff értékek sajnos nem abszolútak, nagyságuk függ egyrészt az alkalmazott standard anyagoktól és a közegtől, másrészt időben is változik a membrán öregedése, kompaktációja során. A fordított ozmózis membránoknál a kalibráló anyag rendszerint nátrium-klorid, ennek visszatartásával jellemzik az adott gyártmányt.

A felhasználó számára érdekes jellemző adat még a membrán permeabilitása vagy vízértéke. Ez a tiszta oldószer (ionmentes víz) fluxusa a membránon üzemi nyomáson és hőmérsékleten, dimenziója $\text{m}^3/\text{m}^2\text{h}$. Néha a nyomás–fluxus kapcsolat linearitását kihasználva $\text{m}^3/\text{m}^2\text{hbar}$ egységekben közlik a vízértéket. Ennél a formánál a különböző nyomásokra kiszámíthatjuk a fluxus értékeket, de ismerni kell a technológiai határokat és a hőmérsékletet is.

Az alapvető mennyiségeket egy tipikus membránszűrő berendezés blokkdiagramján szemléltetjük (4.3.5.1.2. ábra).



4.3.5.1.2. ábra: Membránszűrő berendezés folyamatábrája

A membránszűrésnél a három folyadékáramot többféle néven is említik. A betáplált folyadékot „feladásnak” vagy angol néven „input”-nak szokták nevezni. Térfogata V_0 , koncentrációja c_0 . A membránon áthaladó anyagot nevezik szűrletnek vagy permeátumnak, térfogata: V_p , koncentrációja c_p . Végül a membrán által visszatartott, visszacirkuláló oldat neve koncentrátum vagy retentát, térfogata V_r koncentrációja c_r .

Általánosan használt műveleti jellemző a koncentrációs faktor (CF), amellyel a visszatartott komponensek betöményítésének mértékét adhatjuk meg.

$$CF = \frac{\text{bevitt térfogat}}{\text{visszatartott térfogat}} = \frac{V_0}{V_r}$$

A megszűrt, megtisztított oldat mennyiségére jellemző a kihozatal (recovery):

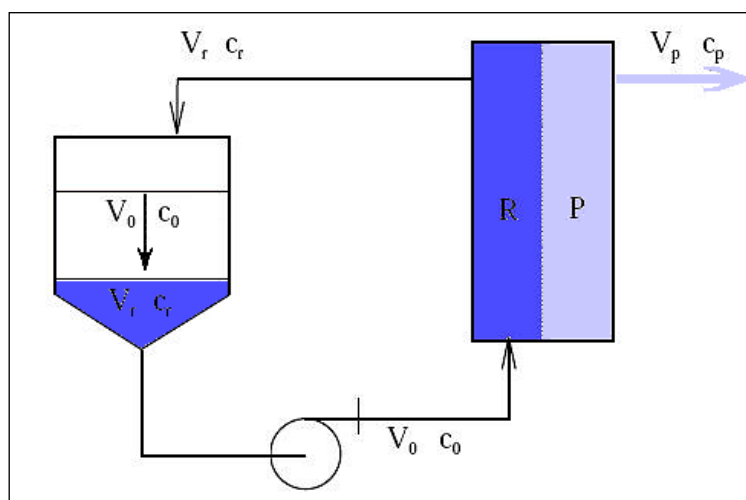
$$R = \frac{\text{permeát térfogat}}{\text{bevitt térfogat}} = \frac{V_p}{V_0}$$

Az anyagmérleg segítségével ($V_0 = V_p + V_r$) felírható a két mennyiség közötti összefüggés is:

$$CF = \frac{1}{1 - R}$$

4.3.5.2. Koncentrálás membránszűréssel

Az oldat keringetése során az oldószer és a vissza nem tartott komponensek folyamatosan távoznak a rendszerből, ezáltal a térfogat csökken, azaz a visszatartott komponensek koncentrációja növekszik.



4.3.5.2.1. ábra: Koncentráló membránszűrés folyamatábrája

Egy tipikus ultraszűrő berendezés felépítését a blokkvéma mellett videón is bemutatjuk. A rozsdamentes acélból készült félüzemi berendezéshez 1 négyzetméteres szűrőfelületű üregezzál-membránmodul tartozik.



4.3.5.2.1. videó: Félüzemi ultraszűrő berendezés

A retentát és a permeát koncentrációját az anyagmérlegekből számíthatjuk:

bemenet = kimenet

$$V_0 c_0 = V_r c_r + V_p c_p,$$

$$c_p = \frac{V_0 c_0 - V_r c_r}{V_p} \qquad c_r = \frac{V_0 c_0 - V_p c_p}{V_r}$$

A művelet tervezésénél, számításánál nem ismerjük az összes koncentráció adatot, de ezeket a térfogatáramokkal is kifejezhetjük.

A koncentrációs faktoral:

$$c_r = c_0 \frac{CF}{CF(1-\sigma) + \sigma}$$

$$c_p = c_0 \frac{CF(1-\sigma)}{CF(1-\sigma) + \sigma}$$

vagy a kihozattal:

$$c_r = c_0 \frac{1}{1 - R\sigma}$$

$$c_p = c_0 \frac{1 - \sigma}{1 - R\sigma}$$

A koncentráció anyagmérlegét differenciálisan felírva

változás = bemenet – kimenet

$$\frac{d(V_R c_R)}{dt} = 0 - W c_R (1 - \sigma)$$

ahol

$$W = - \frac{dV}{dt} \qquad \text{(térfogatáram)}$$

A szorzatfüggvény deriváltját két tagba írva:

$$\frac{dV_R}{dt} c_R + V_R \frac{dc_R}{dt} = -W c_R (1 - \sigma)$$

Az első derivált helyére behelyettesítve -W -t:

$$-Wc_R + V_R \frac{dc_R}{dt} = -Wc_R(1-\sigma)$$

$$\frac{dc_R}{dt} = \frac{W}{V_R} c_R \sigma$$

szétválasztva a változókat:

$$\frac{dc_R}{c_R} = \frac{W}{V_R} \sigma dt = -\sigma \frac{dV}{dt} \frac{1}{V_R} dt = -\sigma \frac{dV}{V_R}$$

integrálva a kiindulási állapottól a pillanatnyi állapotig:

$$\ln \frac{c_R}{c_0} = -\sigma \ln \frac{V_R}{V_0} = \sigma \ln \frac{V_0}{V_R}$$

$$\ln \frac{c_R}{c_0} = \sigma \ln CF$$

$$c_R = c_0 CF^\sigma$$

A koncentráció anyagmérlege tehát egy egyszerű exponenciális kifejezéssel felírható.

Ellenőrizzük a levezetés helyességét gyors fejszámolással! Vizsgáljuk meg a két szélső esetet, a teljes és a nulla visszatartást! Teljes visszatartás esetén $\sigma = 1$, a koncentrációs faktor az első hatványon a saját értékét adja vissza, azaz a c_R értékét a térfogatok aránya adja. Ez összhangban van az első anyagmérlegünkkel. A másik szélső esetben a $\sigma = 0$, nincs visszatartás, olyan a helyzet, mintha a membrán ott sem lenne. Bármely szám nulladik hatványa egy, azaz $c_R = c_0$, a membrán két oldalán a koncentrációk egyenlők, a membránnak tényleg nincs semmi hatása az oldott anyagokra.

4.3.5.3. Elválasztás membránszűréssel

Az elválasztás, avagy tisztítás a membrán szelektivitásán alapul, a membrán a különböző méretű részecskéket különböző mértékben tartja vissza. A különböző visszatartást az eltérő σ -értékek számszerűsítik. Azonos σ -értékek esetén az elválasztás nem valósítható meg. A koncentrációknál levezetett összefüggéseket az egyes komponensekre felírva kiszámíthatjuk a permeát- és retentát koncentrációkat. Az elválasztás vizsgálatához célszerű a koncentrációk arányait kifejezni:

$$\left(\frac{c_1}{c_2} \right)_R = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)_0 CF^{(\sigma_1 - \sigma_2)}$$

$$\left(\frac{c_1}{c_2} \right)_R = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)_0 CF^{(\sigma_1 - \sigma_2)}$$

Láthatóan a két anyag elválasztása akkor hatékony, ha a szigma értékek közti különbség nagy.

Vizsgáljunk meg egy valós problémát, a sajtgyártásnál visszamaradó savó komponenseinek ultraszűrését! (A koncentrációs faktor 7,34, a fehérje és a zsír visszatartása teljes, a laktóz és a só akadálytalanul permeál.)

4.3.5.3.1. táblázat: Sajtgyári savó ultraszűrése

	Betáplált savó	Koncentrátum	Permeátum
Fehérje, %	0,80	5,87	0
Laktóz, %	4,80	4,80	4,80
Só, %	0,70	0,70	0,70
Zsír, %	0,05	0,37	0
Fehérje % /összes szárazanyag	12,60	50,00	0
Laktóz % / összes szárazanyag	75,59	40,89	87,27
Fehérje/laktóz %	16,67	122,29	0

Az egyes komponensek mozgása megfelel az eddig tárgyalt elméletnek. Érdekes többlet-információt ad viszont a termékek arányának változása a szűrés során. Érdeemes megjegyezni, mert általános törvényszerűség, hogy a permeátum „tiszta” abból a szempontból, hogy a nagy molekulájú komponensek (fehérjék) nem jutnak át a membránon, míg a retentát „szennyezett” marad, mert a kis molekulájú komponensek az eredeti koncentrációban megmaradnak.

4.3.5.4. Az ultraszűrés munkavonala

A polarizációs jelenségek tanulmányozásánál (4.3.3.1 fejezet) láttuk, hogy a létrejövő fluxus logaritmikusan függ az oldat koncentrációjától:

$$J_v = \frac{D}{d} \ln \frac{c_{felületi}}{c_{bulk}}$$

emlékeztetésül: D – diffúziós állandó

d – filmvastagság

c_p – koncentráció a membrán felületén

c_b – koncentráció a retentát főtömegében.

$$J_v = \frac{D}{d} (\ln c_p - \ln c_{bulk})$$

az egyszerűség kedvéért konstansokkal felírva:

$$J_v = A_1 - A_2 \ln(c_b)$$

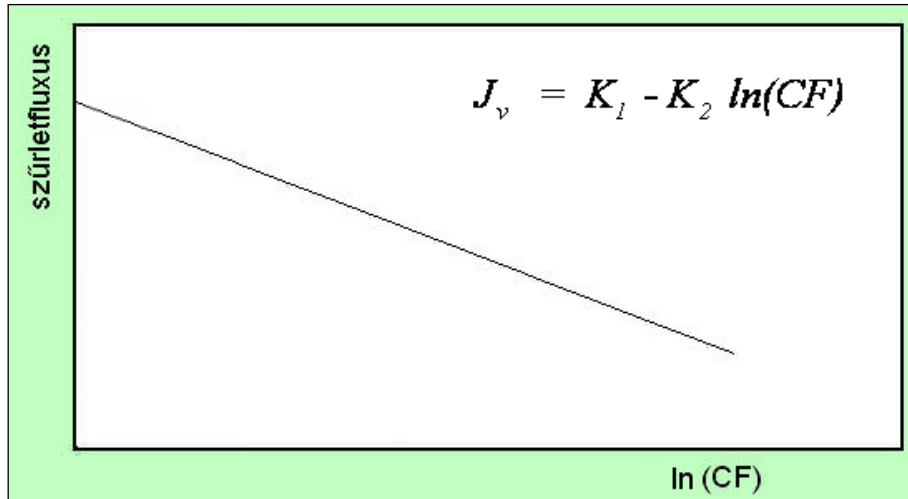
Levezettük, hogy az ultraszűrés során a retentát koncentrációja arányos a koncentrációs faktoral:

$$c_R = c_0 CF^\sigma$$

tehát ha $\sigma = 1$, az összefüggés lineáris. A c_{bulk} helyébe behelyettesítve a koncentrációs faktort (a c_0 értékét beolvasztjuk a konstansba):

$$J_v = K_1 - K_2 \ln(CF)$$

Diagramban ábrázolva negatív meredekségű, lehajló egyenest kapunk (4.3.5.4.1. ábra). Az összefüggés teljesen analóg a koncentráció – szűrés sebesség kapcsolattal. Ez a forma jobban használható mérnöki gyakorlatban, mert ez a térfogatokkal teremti meg a kapcsolatot a koncentrációk helyett.



4.3.5.4.1 ábra: A membránszűrés munkavonala

Az ábrázolt egyenest nevezik a membránszűrés munkavonalának. A szűrés állapotát az egyenes egy pontja adja meg, ezt nevezik munkapontnak.

A fluxus a koncentrálás kezdetén a legnagyobb ($J_v = K_1$), azután az egyre töményedő retentátnál a szűrési sebesség egyre romlik. Szakaszos koncentrálásnál tehát a munkapont mintegy „végigcsúszik” a munkavonalon az elért végső koncentrációs faktor értékig. A változás során az összetartozó fluxus és koncentráció értékek számíthatók.



4.3.5.4.1. animáció: A munkapont végighalad a munkavonalon

Az átlagos fluxus, illetve a szűrési idő ebből az összefüggésből viszont nem adható meg, ehhez az alapegyenletet kell differenciális formában felírni:

A térfogatáram:

$$\frac{dV}{dt} = -AJ_v$$

a korábbiakból:

$$J_v = L_p (\Delta p - \Delta \pi)$$

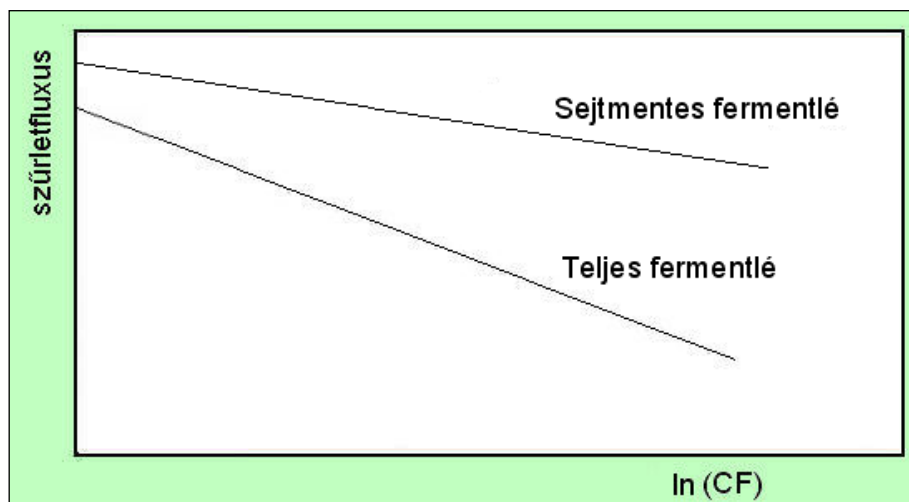
$$\frac{dV}{dt} = -A L_p \Delta p \left(1 - \frac{RTc_b}{\Delta p} \right)$$

az időben változó c_b koncentrációt kifejezhetjük az összes anyagmennyiséggel (mólszám) és a térfogattal ($n=cV$).

$$\frac{dV}{dt} = -A L_p \Delta p \left(1 - \frac{RTn}{\Delta p V_R} \right)$$

A kapott egyenlet integrálását elvégezve ($t = 0$ -tól t -ig, $V = V_0$ -tól V_R -ig) az alábbi bonyolult, a gyakorlati életben nehezen alkalmazható formulához jutunk:

$$t = \frac{l}{AL_p \Delta p} \left(V_0 - V + \frac{RTn}{\Delta p} \cdot \ln \left(\frac{V_0 - RTn/\Delta p}{V - RT/\Delta p} \right) \right)$$

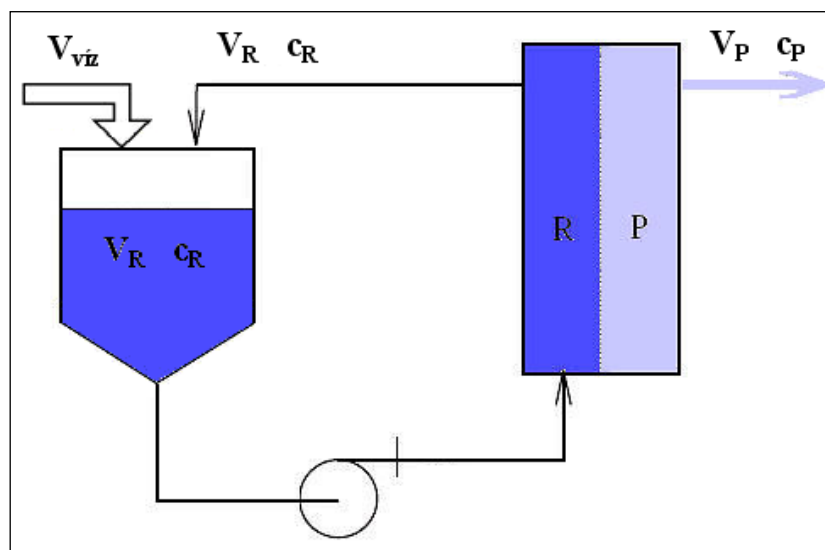


4.3.5.4.2. ábra: Teljes és szűrt fermentálé membránszűrésének összehasonlítása

A munkavonalak jól alkalmazhatók különböző alternatívák összehasonlításánál, például a 4.3.5.4.2. ábra teljes és szűrt fermentálé feldolgozását mutatja be. A teljes fermentálé membránra vitele nyilvánvalóan olcsóbb (a sejtválasztás műveletének költsége megtakarítható), de a fluxus olyan mértékben csökken, hogy ez a megtakarítás kérdésessé válik.

4.3.5.5. Diaszűrés

Diaszűrésnek nevezik azt a membránszűrés technikát, amelyben víz hozzáadásával és szűrlet formájában való elvételével a kis molekulatömegű anyagokat szelektíven eltávolítják, kimossák az oldatból.



4.3.5.5.1. ábra: A diaszűrés folyamatábrája

Az eddig vizsgált esetekben a folyadék összterfогata állandó volt:

$$V_0 = V_R + V_P$$

A diaszűrésnél viszont a retentát körben cirkuláltatott folyadék mennyiségét víz hozzáadásával állandó értéken tartják. Állandó retentát térfogat mellett a művelet kvantitatív leírása is leegyszerűsödik.

$$V_0 = V_R$$

$$V_P = V_{\text{víz}}$$

Az anyagmérleg az előbbiekhöz hasonlóan:

változás = bemenet - kimenet

$$\frac{d(V_R c_R)}{dt} = 0 - W c_R (1 - \sigma)$$

mivel $V_R = V_0 = \text{állandó}$, kiemelhetjük a deriváltból

$$V_0 \frac{dc_R}{dt} = 0 - W c_R (1 - \sigma)$$

Szétválasztással és integrálással próbálkozhatunk

$$V_0 \int_{c_R}^{c_0} \frac{dc_R}{c_R} = -(1 - \sigma) \int_0^t W dt$$

mivel

$$W = \frac{dV}{dt} \quad (\text{térfogatáram})$$

$$V_0 \int_{c_R}^{c_0} \frac{dc_R}{c_R} = -(1 - \sigma) \int_0^t \frac{dV_{\text{víz}}}{dt} dt$$

A jobb oldali integrál a bevitt víz térfogatával egyenlő.

$$\ln \frac{c_R}{c_0} = -(1 - \sigma) \frac{V_{\text{víz}}}{V_0}$$

azaz

$$c_R = c_0 e^{\left[-(1 - \sigma) \frac{V_{\text{víz}}}{V_0} \right]}$$

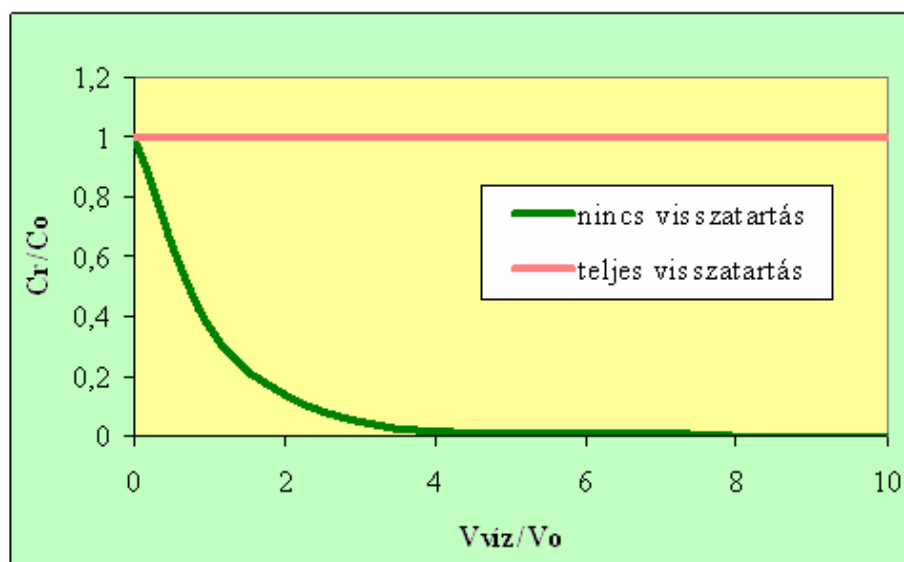
A levezetés eredményét most is a határesetek vizsgálatával ellenőrizzük. Teljes visszatartás esetén (nagy molekulatömeg, $\sigma = 1$):

$$c_R = c_0$$

azaz a koncentráció nem csökken. Ez érthető, változatlan térfogatban ($V_0 = V_R$) változatlan anyagmennyiség (egyáltalán nem tud átmenni a membránon) állandó koncentrációt jelent. A kis molekulájú anyagoknál viszont ($\sigma = 0$):

$$c_R = c_0 e^{\left[-\frac{V_{\text{víz}}}{V_0} \right]}$$

azaz a koncentráció exponenciálisan csökken. A függvények ábrázolásához célszerű dimenziómentes változókat (c_R/c_0 és V_{viz}/V_0) választani, így általános érvényű, minden diaszűrésre érvényes diagramot kapunk (4.3.5.5.2. ábra). A V_{viz}/V_0 paraméternek van fizikai jelentése is, ez a térfogatcsere számát adja meg, azaz hányszor cseréltük le a folyadékot a tartályban. A tartály kifejezés itt nem pontos, de arra utal, hogy ismét felmerül a hasonlóság az ideálisan kevert folytonos tartályreaktor (CSTR) egységugrás zavarásra adott válaszával (Adszorpció, 4.2.2.2. alfejezet), ugyanazt az exponenciális válaszfüggvényt kaptuk. A kitevő is azonos, a bevitt folyadékmennyiség és a térfogat hányadosa.



4.3.5.5.2. ábra: A koncentrációk változása diaszűrés során

A tisztítás mértéke e hatványaival könnyen számolható, a táblázatból kitűnik, hogy öt térfogatcserevel már el lehet távolítani a kis molekulájú anyagok 99 százalékát is.

4.3.5.5.1. táblázat: Kis molekulatömegű anyagok eltávolítása diaszűrés során

V_{viz}/V_0	Eltávolítás, %
1	63,2121
2	86,4665
3	95,0213
4	98,1684
5	99,3262
10	99,9995

A számok a technika nagy tisztítási hatékonyságát illusztrálják. Koncentrálás itt nem történik, hiszen a retentát térfogata állandó marad, viszont a szennyezők, pl. sók koncentrációja exponenciálisan csökken. A műveletek természetesen összekapcsolhatók, a kívánt tisztaság elérése után a vízadagolás leállításával a rendszer minden egyéb változtatás nélkül koncentrálóként működik tovább.

4.3.5.6. Elválasztás, tisztítás diaszűréssel

Az eddigiekben csak egy komponens viselkedését vizsgáltuk a diaszűrés körülményei között. A gyakorlati feladatok során mindig többkomponensű rendszerekkel dolgoznak, és az elért tisztítás mértékére a koncentrációarányok jellemzőbbek, mint az abszolút koncentrációk. A retentátban maradó koncentrációt két komponensre felírva, majd a két egyenlet hányadosát képezve

$$\left(\frac{c_1}{c_2}\right)_R = \left(\frac{c_1}{c_2}\right)_0 e^{\left[-\frac{V_{\text{víz}}}{V_0}(\sigma_2 - \sigma_1)\right]}$$

Az elválasztás hatékonyságát ez esetben is alapvetően megszabja a retenció tényezők különbsége. Kis különbség esetén is lehet jó elválasztást elérni, ha kellően nagy térfogatú vizet vezetünk át a rendszeren. Abban az ideális esetben, ha a két komponens visszatartása a két határérték ($\sigma_1 = 0$ és $\sigma_2 = 1$), a koncentrációarány

$$\left(\frac{c_1}{c_2}\right)_R = \left(\frac{c_1}{c_2}\right)_0 \exp\left[-\frac{V_{\text{víz}}}{V_0}\right]$$

Tekintsünk át egy elvi példát. Egy 15% fehérjés és 4% sót tartalmazó oldatot diaszűrésnek vetnek alá ($\sigma_{\text{só}} = 0$ és $\sigma_{\text{fehérje}} = 1$).

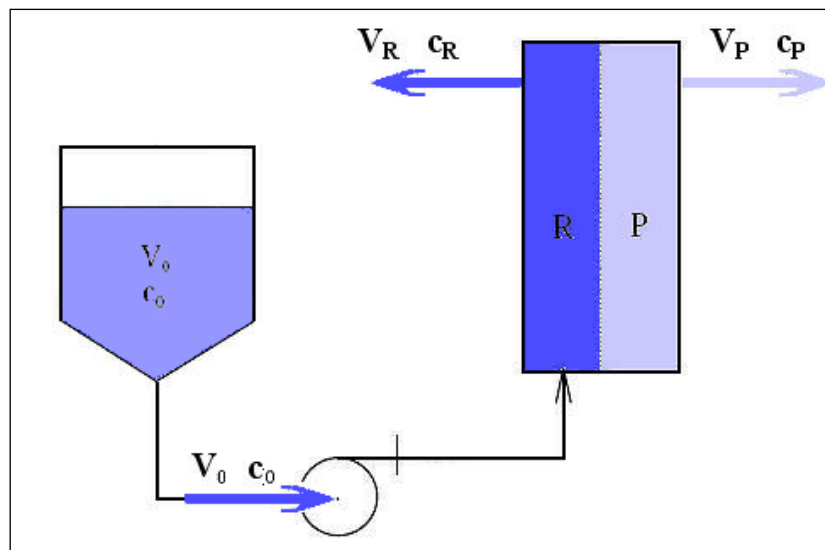
4.3.5.6.1. táblázat: Diaszűrés hatása a makromolekulák tisztaságára

$\frac{V_{\text{víz}}}{V_0}$	$c_{\text{fehérjes}} \%$	$c_{\text{só}}, \%$	$c_{\text{só}}$	összes szárazanyag	$c_{\text{fehérje}} \%$
			$c_{\text{fehérje}}$		összes szárazanyag
0	15	4,00	0,27	19,0	79,0
1	15	1,50	0,10	16,5	90,9
2	15	0,54	0,04	15,5	96,8
3	15	0,20	0,01	15,2	98,7

Látható, hogy a fehérje „kitisztul”, a retentátban csak a fehérje marad. Ez lényeges különbség a korábban tárgyalt koncentrációhoz képest, ahol a szennyezések megmaradtak.

4.3.5.7. Folyamatos membránszűrés

A membránszűrő berendezéseknél nem minden esetben alkalmaznak recirkulációt. Ezeknél a permeátum és a retentát elvétele folyamatos, ezért is nevezik ezeket nyitott vagy folyamatos rendszereknek (4.3.5.7.1. ábra).



4.3.5.7.1. ábra: A folyamatos ultraszűrés elve

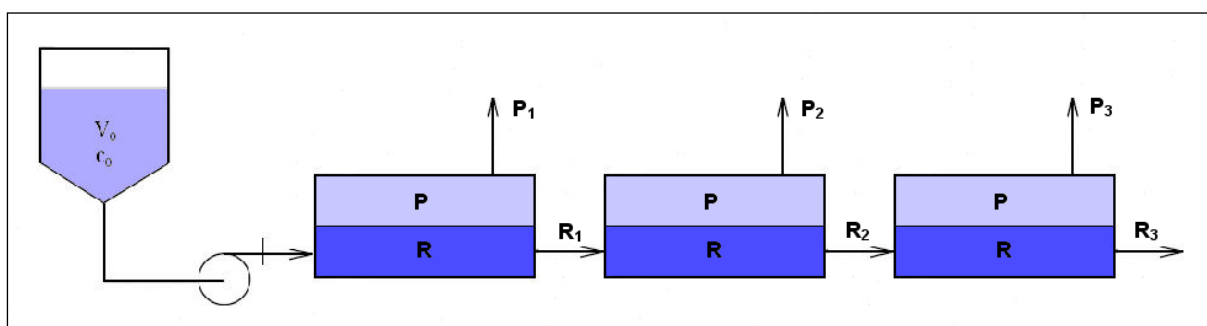
A koncentrációs faktor értelmezése is megváltozik:

$$CF = \frac{\text{betáplált térfogatáram}}{\text{koncentrátum térfogatáram}} = \frac{W_0}{W_R} = \text{állandó}$$

A folyamatos működésnél rövid tranzienst szakasz után beáll az állandósult állapot, amelynek paraméterei hosszabb idő elteltével is alig változnak, akkor is csak a membrán „öregedése” következtében. A folyamatos membránszűrő berendezések működése munkavonalon is jól értelmezhető. Az állandó retentátoldali koncentráció állandó fluxust jelent, így a folyamatos működésnél a munkapont nem vándorol, hanem a munkavonal egy adott helyén stabilizálódik.

Ez viszont azt is jelenti, hogy a kívánt koncentrációra vagy koncentrációs faktorra kell állítani a munkapontot. A végső értékekhez viszont a legkisebb fluxus érték tartozik, a szűrés lassú. A szakaszos elválasztásnál viszont legalább a folyamat elején nagy a szűrési sebesség.

A szűrés gyorsítása érdekében folyamatos üzemben célszerű a koncentrációt több lépésben elvégezni, és az első lépésekben a nagy oldószerfluxus előnyeit kihasználni. Háromfokozatú töményítést mutat be a 4.3.5.7.2. ábra és az animáció.



4.3.5.7.2. ábra: Háromlépcsős ultraszűrés sémája



4.3.5.7.1. animáció: Többlépcsős ultraszűrés méretezése

A munkapontok koordinátái mutatják, hogy az első fokozatban még nagyobb szűrési sebesség érhető el, a későbbiekben ez csökken. Azonos koncentrációs lépésekre bontva a folyamatot két fokozat esetén

$$CF_1 = \sqrt{CF_{\text{összes}}}$$

három fokozat esetén

$$CF_1 = \sqrt[3]{CF_{\text{összes}}}$$

koncentrációs faktorokat lehet beállítani.

Az első lépések fluxusa 25–40%-kal nagyobb, mint az egyfokozatú rendszerek átlagos szűrési sebessége. Egy ipari berendezés különböző kapcsolásaival kapott adatokat foglalja össze az 4.3.5.7.1. táblázat. A szűrőfelület megosztásával a folytonos elrendezés kapacitásnövekedést eredményezett, de az összehasonlításból kitűnik, hogy bármennyire is előnyös a többfokozatú rendszer alkalmazása, a szakaszos működés versenyképes, sőt ebben az esetben jobb megoldás. A mérések elvégzői nem vették figyelembe, hogy az elvett permeát által okozott térfogat(áram)csökkenés miatt a második és a harmadik fokozatban kisebb membránfelületre van szükség, mint az elsőben, dacára a lassuló szűrési sebességnek. Érdekes lett volna kimérni pl. egy 80 + 60 + 40 négyzetméteres háromfokozatú rendszer hatékonyságát.

4.3.5.7.1. táblázat: Sajtgyári savó koncentrációja 35%-ra 180 egyforma szűrőfelületű modulból álló ultraszűrő berendezésen

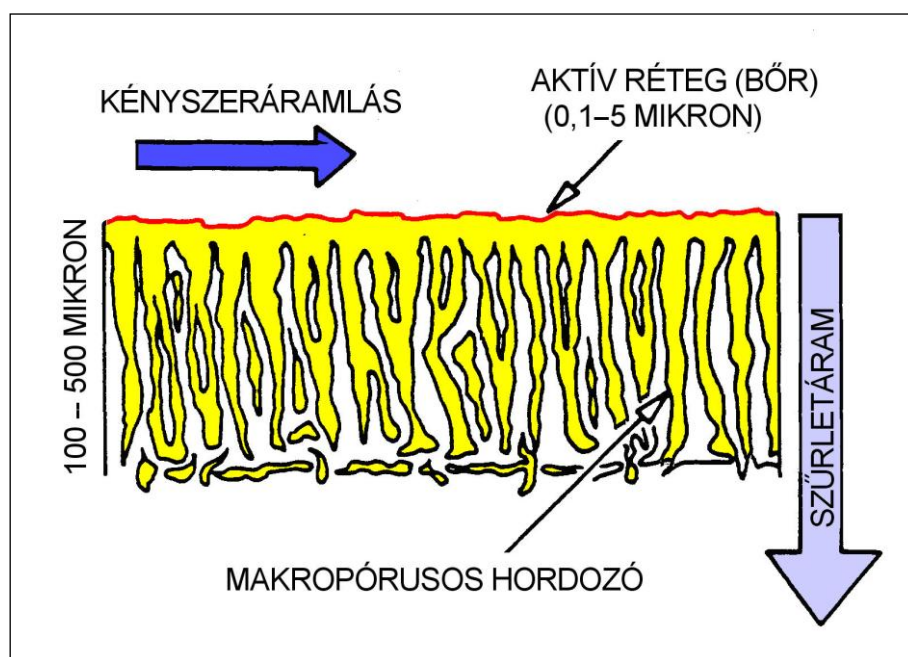
Fokokatok száma	Modulok száma	Kapacitás tonna/nap	Százalék
1	1x180	308,6	100
2	2x90	376,5	122,0
3	3x60	39,4	128,5
szakaszos	1x180	431,2	139,8

4.3.6. A membránok jellemzői

Az eddigiekben elsősorban a membrán segítségével végrehajtott műveletre koncentráltunk, maga a membrán a háttérben maradt. Definiáltuk a membrán vágási görbét, vágási értékét, jellemeztük pórusmérettel, vízátereséssel és hidraulikai ellenállással, de anyagáról, szerkezetéről, gyártásáról nem esett szó.

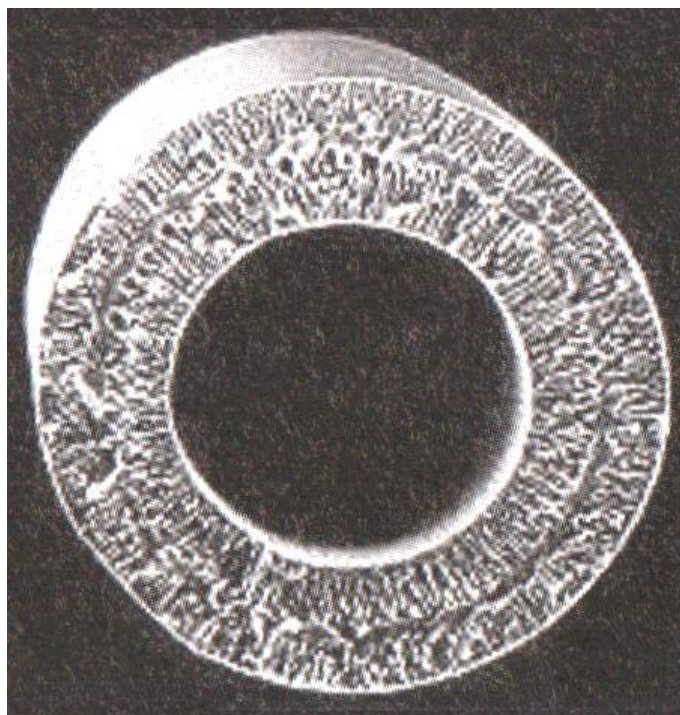
4.3.6.1. Membránok csoportosítása

Az első besorolási szempont a membránok szerkezete. Eszerint megkülönböztethetünk **izotróp** és **anizotróp** membránokat. Ezek a jelzők a membrán porozitására vonatkoznak: az izotróp membránok anyaga és porozitása minden irányban egyforma, míg az anizotrópoknál a membrán kettő vagy több rétegből áll. Az elválasztás a legfelső, legkisebb pórusméretű rétegben történik, az alatta lévő, nagyobb pórusokat tartalmazó anyag szerepe az előző mechanikai megtámasztása, a szűrlet elvezetése. A gyakorlatban a legtöbb membrán anizotróp, az elválasztás egy vékony, gyakran csak mikrométeres vastagságú „bőrön” történik. Mivel a membránszűrés abszolút, méret szerinti elválasztás (ellentétben a tölteten vagy szűrőrétegen végbemenő mélységi vagy statisztikus szűréssel), a szűrőelem (azaz a membrán) vastagsága nem befolyásolja az elválasztás minőségét, tehát elegendő egy minimális vastagságú, filmszerű bevonat valamely hordozó felületén.



4.3.6.1.1. ábra: Anizotróp membrán metszete

A hordozó + aktív réteg szerkezet felismerhető a membránokról készült elektronmikroszkópos felvételeken is (4.3.6.1.2. ábra).



4.3.6.1.2. ábra: Üregesszál-membrán keresztmetszete, belső felületén az aktív szűrőréteg (katalógusfotó)

Ha a membrán rétegei eltérő anyagból készülnek, akkor beszélünk összetett vagy **kompozit membránról**. A lehetséges kombinációk köre igen széles, szinte valamennyi polimerből készíthetők már membránok a cellulóz-acetáttól a teflonig. A hagyományos szénalapú polimerhártyát szinte bármely hordozóra fel lehet vinni, de előfordulnak teljesen szervesetlen rendszerek is, pl. fénoxid bevonat szinterelt kerámián.

4.3.6.2. Membránok előállítása

A membránok klasszikus alapanyaga a regenerált cellulóz. Az eljárás gyakorlatilag a cellulóz oldat beviteléből, majd adott formában való kicsapásából áll. Manapság már szinte minden ipari jelentőségű polimerből gyártanak membránokat. A tendencia az egyre ellenállóbb, magasabb hőmérsékleten és extrém pH-értékeken is használható membránok irányába mutat. Előállítottak már membránokat teflon, poliszulfon, poliakrilnitril, PVC, poliészter, polietilén, polipropilén alapanyagból. Ebbe az irányba mutat a kerámia-, illetve fémalapú membránok fejlesztése.

A membránok előállításának technológiájával a Műanyagok tárgya foglalkozik, ezért itt nem térünk ki a részletekre, csak felsorolunk néhány lehetőséget.

Az oldott polimerek **kicsapás**ára több út is kínálkozik. Legelterjedtebb a vizes kicsapás, amelynél a polimeroldatot vékony rétegben vízfürdőbe engedik, ahol is az kicsapódik. Ez a módszer lap-, cső-, és üregesszál-membránok előállítására egyaránt alkalmas. Illékony oldószerben oldott polimerek esetében a felületről elpárolgó oldószerből filmréteg marad vissza. Kicsapódás, filmképzés végbemehet hűtés hatására is.

Membránokat elő lehet állítani [szinterezéssel](#) (porkohászati úton) is, így készülnek a kerámia- és fémalapú szűrőtestek, de a módszer alkalmazható teflonra is. A klasszikus műanyagformáló műveletekkel, extrudálással ill. húzással is létrehozhatunk membránokat.

Az így létrehozott membránok általában már megfelelő pórusmérettel, illetve diffúziós tulajdonságokkal rendelkeznek. Bizonyos esetekben azonban a pórusokat utólag hozzák létre a folyamatos rétegen. Ennek eszköze lehet:

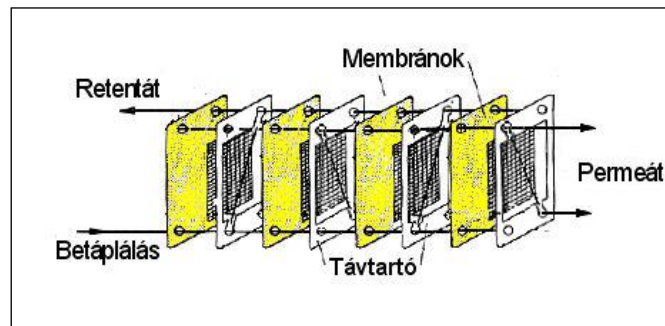
- nyújtás (a húzóerő irányában számtalan kis szakadás jön létre, ezek a pórusok közel azonos méretűek, de nem kör keresztmetszetűek)
- lézersugaras perforálás

- bombázás elemi részecskékkel (a besugárzás következtében létrejött szerkezeti hibákat maratófürdőben tágtíják pórusokká).

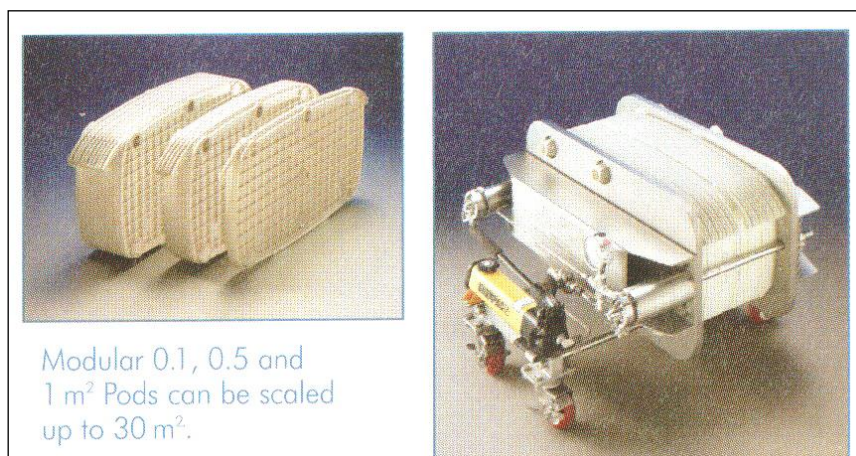
4.3.6.3. Membránmodulok

A membránokat a legritkább esetben hozzák forgalomba önmagukban „méterre” vagy „négyzetméterre” (bár kívánságra így is szállítanak), hanem felhasználásra kész, „szerelt” formában, a berendezésekbe azonnal beépíthető egységben. Ezek a hordozóval, távtartókkal, csatlakozókkal, burkolattal ellátott cserélhető egységek az ún. membránmodulok. Főbb kialakítási típusaik:

Lapmembránok: A kicsapott, húzott, hengerelt síkmembránok közvetlen forgalomba hozatala a membrányártás első időszakára volt jellemző. Megfelelő berendezésben akár több méter szélességben lehet végtelenített membránt előállítani, amit aztán a konstrukció igényeinek megfelelően szabnak méretre. A síklapokat ritkán használják egymagukban, de pl. egyrétegű szűrőket alkalmaznak a bakteriológiai szűrőkben, kisebb folyadékmennyiségek sterilre szűréséhez. Az üzemi méretű berendezésekben számos keretbe foglalt membránt helyeznek el párhuzamosan, egymástól néhány milliméteres távolságra. Az elrendezést keretekkel és közbeillesztett műanyag távtartó hálókkel rögzítik. A közdarabok mintázata és bordáinak kialakítása szabja meg az áramlási képet, amely befolyásolja a polarizációs jelenségek kialakulását. A membránelemek összekötése a klasszikus keretes szűrőprés felépítéséhez hasonlóan valósul meg. A sűrűn egymásra helyezett membránok révén nagy szűrőfelületet lehet elhelyezni egységnyi térfogatban.



4.3.6.3.1. ábra: Keretes síkmembránok

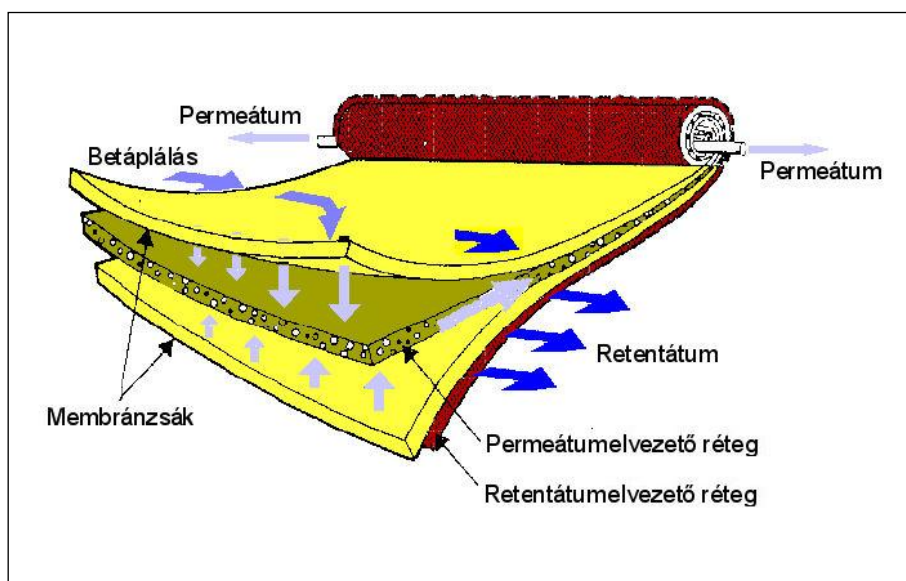


4.3.6.3.2. ábra: Keretes membránszűrő (katalógusfotó)

Tovább növelhető a beépített felület, ha a síkmembránt harmonikaszerűen hajtogatják. A lapok közötti szűk térben az áramlás lamináris, turbulens áramlást létrehozni gyakorlatilag lehetetlen. A polarizációs jelenségek hatását éppen az áramló rétegek vékonysága csökkenti, a szűk térben csak vékony diffúziós határréteg tud kialakulni, így rövid lesz a diffúziós úthossz. Ezek a rendszerek eltömődésre hajlamosak, csak kis szárazanyag-terheléssel használhatók.

Előny, hogy a membrán sérülése esetén csak egy, viszonylag kis területű lapot kell kivenni, kicserélni, a többi elem tovább használható.

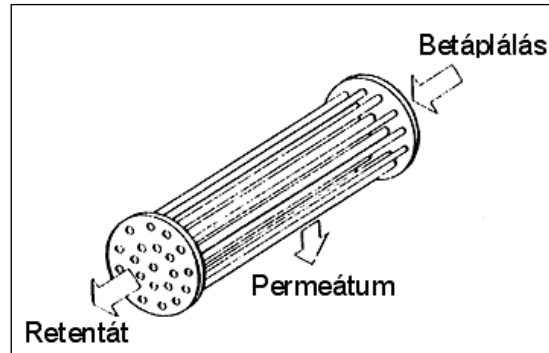
Spirálmodulok: Voltaképpen a lapmembrán-konstrukcióból származtathatók olyan módon, hogy a síkmembránál alkalmazott szendvicsszerkezetet (membrán, elvezető réteg, membrán, távtartó réteg) egy csőre feltekerceselik. A két lapmembránból kialakított „zsák” vagy „boríték” külső felületén áramlik a feladott folyadék, a tekercs tengelyével párhuzamosan; a belsejébe behatoló permeátumot a beépített réteg spirális úton a központi csőbe vezet. A lapok között kialakuló áramlási kép hasonló az előbb tárgyalthoz. A tekercselésnél jelentős mechanikai feszültségek lépnek fel, ezért ellenálló anyagokat kell választani. Az egységnyi térfogatba beépíthető szűrőfelület még nagyobb, mint a lapmembránmoduloknál. A szűrési paraméterek is kedvezők, az egyedüli hátrány, hogy sérülés, membránszakadás esetén az egész modult, a beépített több négyzetméternyi aktív felülettel ki kell cserélni.



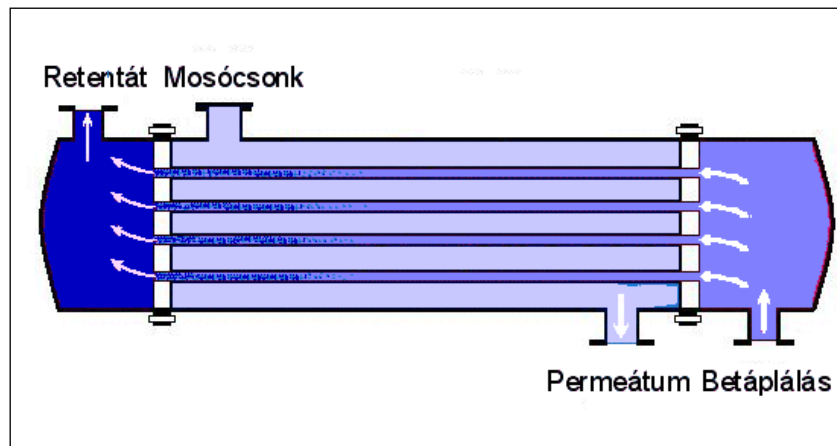
4.3.6.3.3. ábra: Spirálmodul belső felépítése

A modulok másik nagy csoportja cső alakú membránokat tartalmaz, ezek átmérőjük szerint csoportosíthatók.

Csőmembránok: A legnagyobb átmérőjük, belméretük jellemzően 12–25 mm (0,5–1 inch). Léteznek belső és külső merevítésűek, az alkalmazott nyomás iránya szerint. Az előbbieknél már a gyártásnál a támasztóréteg felületére viszik fel a membrán anyagát, az utóbbiaknál a kész, húzott membráncsőre tekerceselnek fel üvegszál erősítést. A modulok felépítése a csököteges hőcserélőre emlékeztet, az egy modulba épített csövek száma 6–20 között változik. A csőszerű kiképzés nagy előnye, hogy a membrán felületén turbulens áramlást is létre lehet hozni, ezáltal minimalizálhatók a felületi polarizációs jelenségek. A csövek tisztítása is egyszerű, hátrány viszont a nagy helyigény.

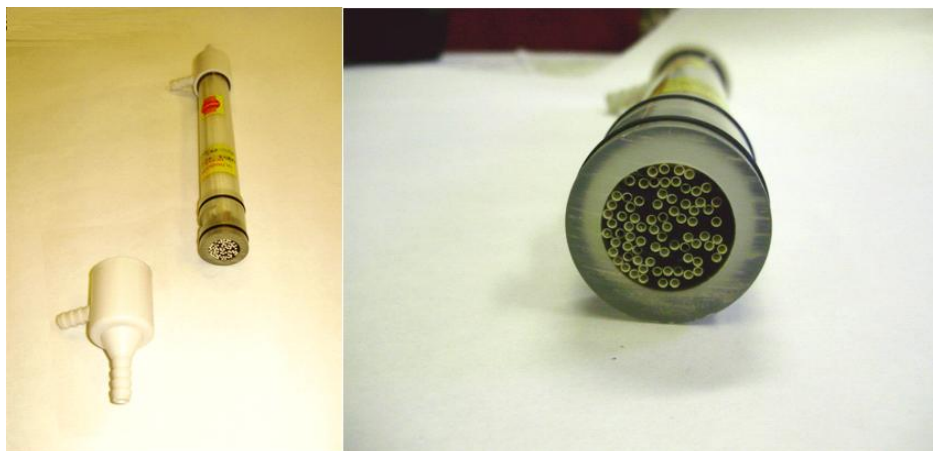


4.3.6.3.4. ábra: Csőmembránok elrendezése



4.3.6.3.5. ábra: Csőmembránmodul – analóg a csőköteges hőcserélővel

Üregesszál- (hollow fiber) membránok: A fajlagos felület a méret csökkentésével növelhető, azaz vékonyabb csöveknél nagyobb. Így jutunk el az üreges szálakhoz, amelyek belső átmérője csak 0,5–1,5 mm, a cső makarónira vagy szívószálra emlékeztet. A falvastagság 100–200 mikrométer, a fal általában nem tartalmaz külön mechanikai hordozóréteget. A membrán anyaga és az extrudálás technológiája biztosítja a megfelelő szilárdságot. A szál maga hajlékony, mint egy gumicső, de a két végpontja be van fogva, így nem mozdulhat/hajolhat el a modulon belül. A szálak kissé szabálytalan rögzítését (ragasztását) szemlélteti a 4.3.6.3.6. ábra.



4.3.6.3.6. ábra: Szétszerelt üregesszál-ultraszűrő modul

Egy modulba akár több száz szálát kötegelnek párhuzamosan, így a szűrőfelület/térfogat arány igen kedvező.

Néhány membránmodult videón is bemutatunk.



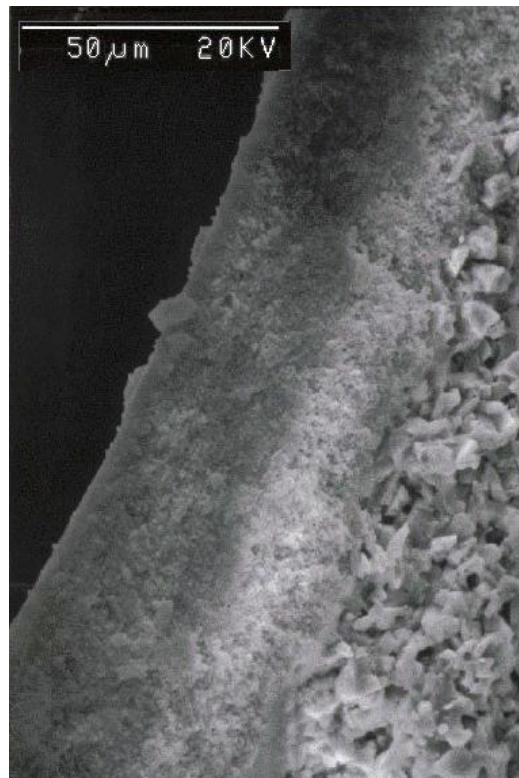
4.3.6.3.1. videó: Membránmodulok



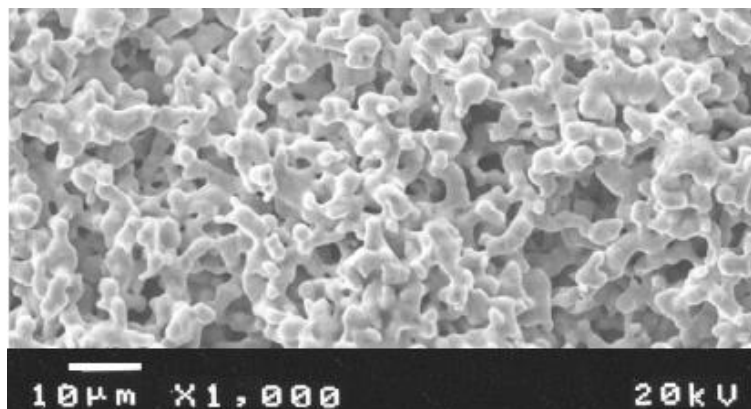
4.3.6.3.7. ábra: Nagyméretű üregesszál modulok sejtek kiszűrésére

Mikrokapilláris membránok: Készülnek hajszálvékony csőmembránok is, ezek jellemző belső átmérője 5–20 mikrométer, falvastagsága 10 mikrométer körüli. Egy modulba akár több tízezer vagy akár millió kapillárist is beépítenek. Mivel belsejükben a nyomásesés nagy, az áramlási sebesség kicsi, emiatt csak speciális célokra alkalmazzák ezeket. Ilyenek pl. a műveseállandóság dializáló moduljai. A kapillárisok mesterséges „hajszálerekként” működnek, a folyamat hajtóereje a koncentrációkülönbség és nem az üzemi nyomás.

Gyártanak még sokféle, a fenti csoportosításba be nem sorolható modult is. Ezek közül érdemes megemlíteni a **kerámiamodulokat**. Ezek egy [szinterezett](#) kerámiahasábból állnak, amelyben párhuzamosan csőszerű, hengeres vagy szögletes járatok futnak. Az elválasztás a járatok belső felületén kialakított vékony, szűkebb pórusú kerámia rétegen történik. A makropórusos testet durvább szemcsésű porból, az elválasztást végző aktív réteget nagyon finomra őrölt porból alakítják ki (4.3.6.3.8. ábra). A permeátum a kerámiatest pórusaiban vándorolva a hasáb külső felületén jelenik meg.



4.3.6.3.8. ábra: Kerámiamodul aktív és hordozó rétege



4.3.6.3.9. ábra: Szinterezett nikkemembrán elektronmikroszkópos képe

A szinterezett kerámiahasábokat (4.3.6.3.10. ábra) rozsdamentes acélból készült házba szerelik, ez hordozza a be- és kivezető csomópontokat és ez gyűjti össze a kerámia felületén megjelenő permeátumot (4.3.6.3.11. ábra).



4.3.6.3.10. ábra: Kerámia membrántestek (katalógusfotó)



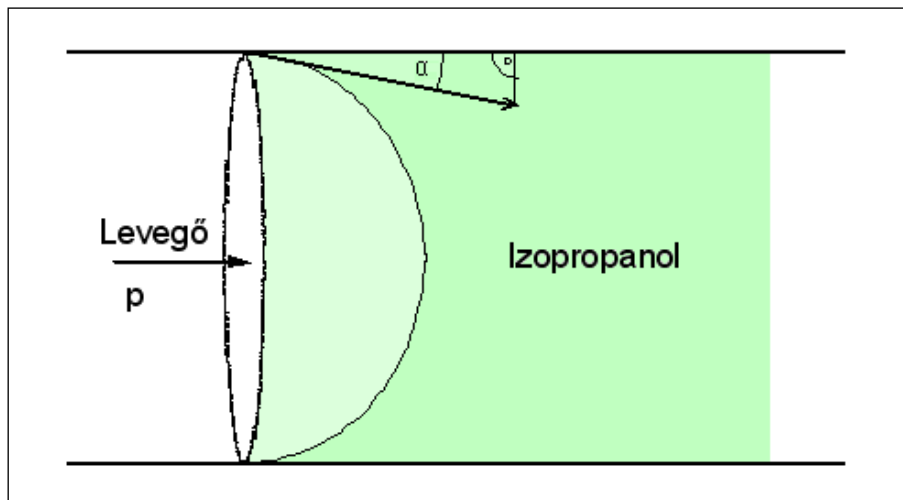
4.3.6.3.11. ábra: Házba épített kerámia membránszűrők (katalógusfotó)

4.3.7. Üzemközi membránvizsgálat. Buborékpont meghatározása

A membránok tárgyalt jellemzőit (pórusméret, vágási görbe, vízáteresztőképesség) általában a gyártó vizsgálja meg és adatait a katalógusokban vagy a szállított tétellel együtt közli. A felhasználót elsősorban az érdekli, hogy a használt membrán képes-e még hozni a kezdeti adatokat vagy technológiai módosításra, esetleg cseréire van szükség. Az ilyen jellegű üzemközi vizsgálatok két paraméterre szoktak kiterjedni: – a vízáteresztésre és – a sérülésekre (integritásvizsgálat).

A technológiai paraméterek hatásának vizsgálata során tárgyaltuk, hogy a membrán használata során öregszik, tulajdonságai romlanak. A legnagyobb mérvű változások az első félórában észlelhetők, azután a paraméterek viszonylag állandósulnak. A membrán vízértékében irreverzibilis változásokat okoz a fehérjék adszorpciója. Már viszonylag rövid kontaktus fehérjeoldatokkal jelentős csökkenést eredményez a fluxusban. Ennek vizsgálata azonban egyszerű köbözéssel megoldható, nem is tárgyaljuk részletesen.

A membránok épségének vizsgálatára alakították ki az ún. buborékpont-meghatározást. A módszer elsősorban hidofil, mikropórusos membránoknál használható, de víz helyett izopropanolos nedvesítéssel alkalmazási köre szélesíthető. A vizsgálat alapelve az, hogy ha egy telt kapillárisból gáznyomással szorítjuk ki a folyadékfázist, a nyomás és a kapillaris átmérője fordítottan arányos egymással. Az összefüggés jól értelmezhető a felületi feszültséggel (4.3.7.1. ábra).



4.3.7.1. ábra: A gáz-folyadék határfelület kapillárisban

Az erőegyensúly:

nyomóerő = felületi feszültség ereje

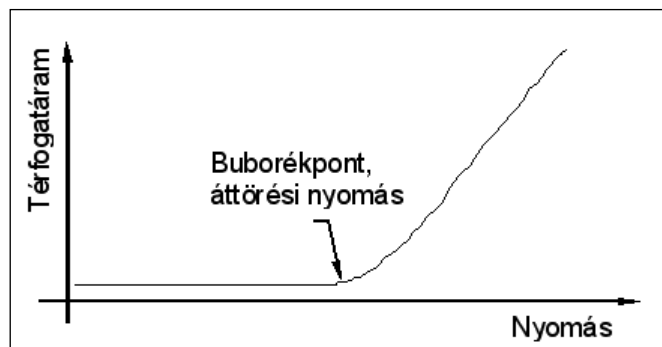
$$p_{\text{levegő}} \left[\frac{d^2 \pi}{4} \right] = d \pi \gamma \cos \alpha$$

Ebből:

$$p_{\text{levegő}} = \frac{4 \gamma \cos \alpha}{d}$$

ahol $p_{\text{levegő}}$ – a ráadott nyomás
 d – pórusátmérő
 γ – a folyadék felületi feszültsége
 α – nedvesítési szög.

Ebből az következik, hogy ha fokozatosan növeljük a gáz nyomását, akkor elsőként a legnagyobb átmérőjű pórusból szorul ki a folyadék, tehát az áttörési nyomás (buborékpont) jellemző a legnagyobb pórus méretére. Ennek segítségével vizsgálhatjuk az ép membrán póruseloszlását, illetve az esetleges hibák, sérülések jelenlétét. A mérés gyakorlati kivitelezésénél az áthatoló gáz térfogatáramát vizsgálják a nyomás függvényében (4.3.7.2. ábra).



4.3.7.2. ábra: A buborékpont meghatározás térfogatáram-görbéje

A gáz térfogatárama kis nyomásoknál sem nulla, mivel egy lassú diffúziós transzport működik. Ez adja a görbe alsó, lineáris szakaszát. Ennek meredeksége nem függ a pórusmérettől, csak a membrán felületétől. A buborékpontban a görbe törést mutat, hirtelen emelkedni kezd, ez már tényleges áramlás egy kapillárison keresztül, amit a Hagen–Poiseuille-egyenlettel írhatunk le.

A buborékpont-meghatározást elsősorban olyan technológiáknál használják rendszeresen, ahol minimális mennyiségű átérésztett szennyezés sem engedhető meg (pl. gyógyszeripar, steril szűrések stb.).

4.3.8. Számpélda a membránműveletek anyagmérlegeihez

1. példa. 1000 liter 4%-os fehérjeoldatot ultraszűrővel koncentrálnak olyan módon, hogy 800 l permeátum keletkezik. A membrán visszatartása az adott fehérjére teljes.

- Mennyi a koncentrációs faktor értéke?
- Mekkora lesz a koncentráció a retentátban?
- Hogyan alakulnak a koncentrációviszonyok, ha a fenti oldat 1%-nyi sót is tartalmaz?

1. megoldás.

A) A koncentrációs faktor:

$$CF = \frac{V_0}{V_R} = \frac{1000 \text{ l}}{200 \text{ l}} = 5$$

B) Teljes retenció esetén a σ értéke 1, a sűrítmény koncentrációja pedig

$$c_R = c_0 CF^\sigma = 4\% \cdot 5^1 = 20\% .$$

C) A só akadálytalanul halad át a membránon ($\sigma_{\text{só}} = 0$), a sókoncentráció tehát nem változik.

$$c_R = c_0 CF^\sigma = 1\% \cdot 5^0 = 1\%$$

A koncentrációk aránya az ultraszűrés megkezdése előtt

$$\frac{c_{\text{fehérje}}}{c_{\text{só}}} = \frac{4\%}{1\%} = 4$$

befejezése után:

$$\frac{c_{\text{fehérje}}}{c_{\text{só}}} = \frac{20\%}{1\%} = 20$$

Azaz a koncentrálás mellett jelentős mértékű tisztítás is megvalósult.

4.4. Kicsapás, kristályosítás

A koncentráció műveleteknél a víz eltávolításának bevált módja, hogy a célterméket átvisszük egy másik fázisba. Ha az oldatot túltelítetté tesszük, akkor az oldott anyag szilárd fázisként kiválik, elkülöníthető lesz az oldószerrel és az oldott szennyezésektől (anyalúg). Ha a kivált szilárd anyag rendezett, kristályos szerkezetű, akkor kristályosításról, ha pedig amorf, rendezetlen szerkezetű, akkor csapadékképzésről beszélünk. A két művelet leírása nagyon hasonlít egymásra, helyük a feldolgozási műveletsorban mégis különböző. A csapadékképzést inkább a koncentráció műveletek közé soroljuk be, mert a víztől való elválasztásra alkalmas. A kristályosítás során viszont jelentős mértékű tisztítás is végbemegy, ezért sokkal inkább a végtisztítás fázisába illeszkedik. A különbség oka az, hogy a kiváló csapadék a maga rendezetlen szerkezetével sok szennyezést köt meg és visz magával, de kristályosítás során az épülő kristályrácsba csak egyféle, azonos molekulák épülhetnek be. A hibátlan rácsú egykristály gyakorlatilag szennyezésmentes, homogén anyag. A kristályok csak zárványaikban, illetve felületükön hordoznak szennyezéseket. Ez utóbbi a kristályok mosásával csökkenthető.

Különbőség van a túltelítés létrehozásának módjában is. A kristályosításnál túlnyomórészt bepárlás utáni hűtést alkalmazzák, a kicsapásnál viszont ez ritka. Sokkal inkább valamilyen anyag (kicsapószer) hozzáadásával érik el az oldhatóság csökkenését. Az oldhatóság csökkentésének kézenfekvő módja az oldószer (adott esetben vizes közeg) polaritásának megváltoztatása. A poláris molekulák a poláris oldószerekben oldódnak jól, az apoláris jellegűek inkább az apoláris folyadékokban (ld. Extrakció). A víz önmagában egy nagyon poláris oldószer, de polaritása mindkét irányban változtatható. Szerves oldószerek (alkoholok, aceton) hozzáadásával csökkenthető, sók beoldásával növelhető (ld. vizes kétfázisú extrakció).

Mindkét művelethez kapcsolódik a szilárd fázis kiválása után egy fázis-szétválasztási lépés. A kivált anyagot a már tárgyalt szilárd-folyadék elválasztási műveletek (szűrés, üleptetés, centrifugálás) egyikével különítjük el az anyalúgtól.

A két művelet hasonlóságuk miatt egymás mellett, egy alfejezetben tárgyaljuk. Ezzel némiképp megtörjük a tananyag felépítésének logikáját, amely a feldolgozási műveletsor egymásra épülését követi, de így ez az anyagréssz könnyebben érthető és tanulható, mintha elkülönítve, egymástól távoli alfejezetekben kerülne kifejtésre.

4.4.1. Csapadékképzés

Amorf csapadékot általában a makromolekulák (fehérjék, poliszacharidok), illetve erősen apoláris anyagok (pl. szteroidok) képeznek, a kis molekulákat könnyebb kristályosodásra bírni.

A kicsapódást létrehozhatjuk:

- az oldószer polaritásának megváltoztatásával (kisózás, oldószeres kicsapás)
- a hőmérséklet megváltoztatásával (emelésével vagy csökkentésével).

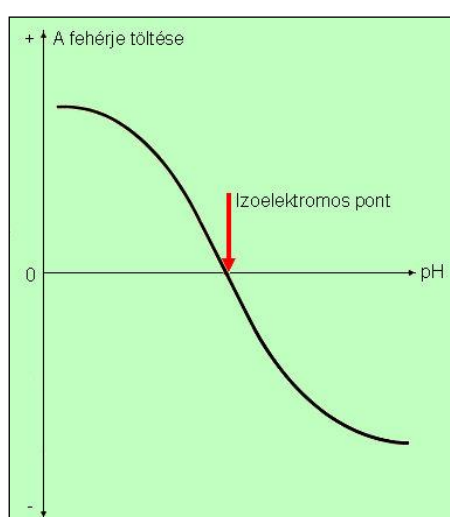
A csapadékképzésnél gyakran fellépő probléma, hogy a csapadékba vitt anyag nem oldható vissza, illetve elveszíti a biológiai aktivitását. Ezt a művelet kidolgozásánál, fejlesztésénél és lépték-növelésénél minden lépésben ellenőrizni kell.

4.4.1.1. A pH hatása

A kicsapásra kerülő anyagok között külön figyelmet érdemelnek a fehérjék, illetve más, ionos természetű molekulák. Ezek töltését, illetve disszociációját jelentősen befolyásolja a közeg pH-ja. A csapadék kialakításánál az a cél, hogy az oldott molekulákat összetapasszuk, szilárd fázisba tömörítsük. A töltéssel rendelkező molekulák viszont azonos töltésük miatt taszítják egymást, így nehéz ezeket érintkeztetni. Ha sikerül megszüntetni a töltést, akkor a molekulák találkozása gyakran végbemegy, a kiválás folyamata megindul, illetve felgyorsul. A töltés csökkentésére alkalmas módszer a pH megváltoztatása.

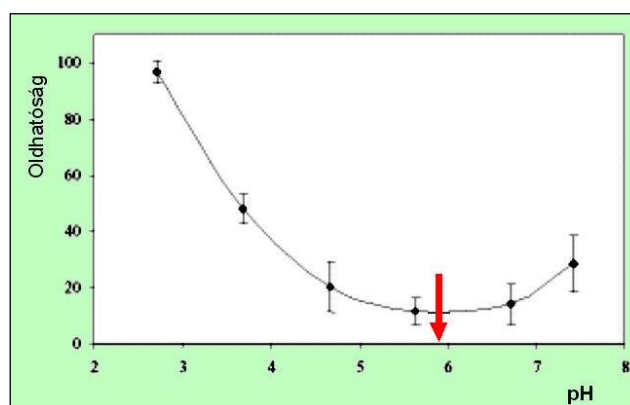
Gyenge savak és gyenge bázisok esetében a disszociáció visszaszorítása erős savval illetve bázissal az ionos jelleg megszűnését okozza – ahogy ezt az Extrakció fejezetben levezettük. Az ikerionos molekuláknál más a helyzet. Ezek több, ellentétes töltésű ionizálható csoportot tartalmaznak. A fehérjéknél például ionos jellegű a karbonsav- és aminosav-láncvég szabad csoportja, illetve az aminosavak oldalláncain található savas (Asp, Glu) és bázikus (Lys, Arg, His) funkció csoportok.

Savas közegben a bázikus csoportok nitrogénjei protonálódnak, kationossá válnak, míg a karbonsav csoportok disszociációja visszaszorul, negatív töltésük megszűnik. A fehérje eredő töltése pozitív lesz. Magas pH-értékeknél, lúgos közegben fordított folyamat játszódik le. Az aminocsoportok elvesztik protonjukat, ezzel pozitív töltésüket, a savas csoportok viszont disszociálnak, és anionos formába mennek át. A molekula össztöltése negatívvá válik. A két szélsőség között folyamatos az átmenet, és létezik egy olyan pH-érték, ahol a fehérjemolekula eredő töltése éppen nulla. Ez nem azt jelenti, hogy minden atomcsoport elvesztette a töltését, hanem a jelenlévő pozitív és negatív töltések éppen kiegyenlítik egymást. Ezt a pH-értéket nevezzük az adott fehérje izoelektromos pontjának (4.4.1.1.1. ábra). Az egyes fehérjék izoelektromos pH-ja különböző, az adott anyagra jellemző érték.



4.4.1.1.1. ábra: A fehérjék töltése a pH függvényében

A töltés megszűnése a fehérjemolekulák közötti taszítóerők megszűnését is jelenti. Könnyebb a molekulákat összehozni, összetapasztani, csapadékot képezni. Emellett az ionos csoportok eltűnése a töltések köré rakódó hidrátburkok eltűnését is jelenti. Hidrátburkok nélkül pedig a fehérjék oldhatósága csökken. Általános jelenség, hogy a fehérjék oldhatósága az izoelektromos ponton minimális (4.4.1.1.2. ábra).



4.4.1.1.2. ábra: Fehérje oldhatósága a pH függvényében

Mindebből az következik, hogy bármelyik kicsapási módszert is válasszuk ki a később felsoroltak közül, a pH-értéket célszerű az izoelektromos pontra állítani, ekkor lehet a legkevesebb kicsapószerrel a fehérjéket a leghatékonyabban leválasztani.

4.4.1.2. Oldószeres kicsapás

Vizes oldathoz elegyedő szerves oldószert (alkohol, aceton), esetleg poli-etilén-glikolt (PEG) adva, az oldószer polaritása csökken. A jelen lévő fehérjék közül az apolárisabb molekulák oldhatósága javul, a

poláris jellegűeké viszont romlik, ezek kicsapódására számíthatunk. Fokozatos oldószeradagolás esetén az egyes fehérjék polaritási sorrendben válnak le, ezzel elválasztásuk is megvalósítható.

Az oldószer-víz elegyítés fordított irányban is végrehajtható. Sztteroidok, vagy egyes rosszul oldódó antibiotikumok alkoholos oldatából víz hozzáadásával le lehet választani az oldott anyagokat.

Az oldószeres kicsapás során célszerű szem előtt tartani néhány alapelvet.

Célszerű a műveletet alacsony hőmérsékleten végezni, mert:

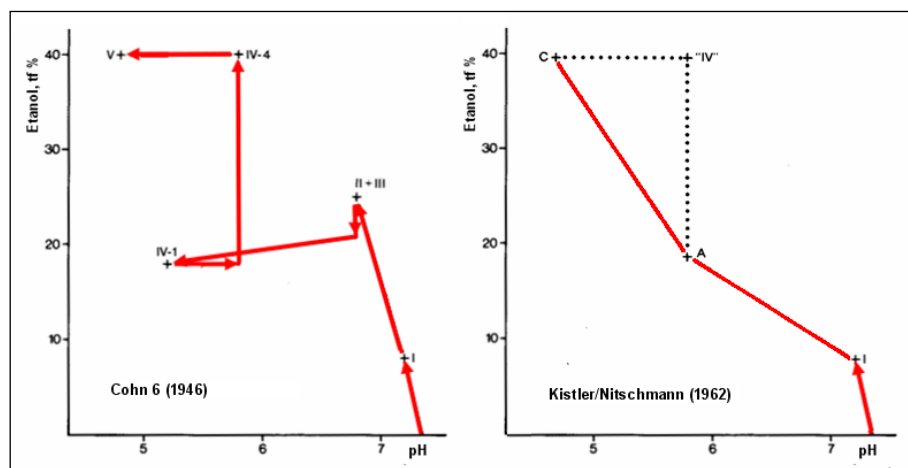
- alacsonyabb hőmérsékleten kisebb az oldhatóság, ezáltal több anyag választható le
- hidegen lelassulnak a bomlási reakciók, kisebb a denaturálódás mértéke.

A hőmérsékletet akár 0 °C alá is csökkenthetjük, mert az oldószer-víz elegyek fagyáspontja alacsonyabb, mint a vízé.

Célszerű az ionerősséget alacsony értéken (0,05–0,20) tartani. Az oldott sók ugyanis növelik az oldat polaritását, azaz pont ellentétes hatást fejtenek ki, mint az oldószeradagolás. Valamennyi sóra szükség van a pufferhatás miatt, hiszen be kell állítani az izoelektromos pH-t, de a puffer molaritását lehetőleg kis értékre állítsuk be.

A többkomponensű fehérjeoldatok nem viselkednek ideális oldatokként, a molekulák között kölcsönhatások lépnek fel. A legegyszerűbb modell szerint a fehérjemolekulák versengenek egymással a hidrárburokért, ezáltal csökkentik egymás oldhatóságát

Az oldószeres fehérje kicsapásra klasszikus ipari léptékű példa a vérplazma-fehérjék Cohn-féle hideg etanolos frakcionálása (1946). A vérérdőktől begyűjtött vér sejtmentesített felülúszóját dolgozták fel, az alkoholtartalom és a pH lépcsős változtatásával választották szét a vér fehérjeit. A pH-t 4,8 és 7,2 között, az etanol koncentrációt pedig 8–40% között változtatták, az anyagot mindvégig -2 és -10 °C között tartották. Az eredeti hideg etanolos eljárást többen továbbfejlesztették (4.4.1.2.1. ábra), de a csapadékképzési lépések egy részét csak évtizedekkel később, a kromatográfiás eljárások tökéletesítése váltotta ki.



4.4.1.2.1. ábra: Etanolos vérplazma frakcionálási eljárások

4.4.1.2.1. táblázat: A Cohn-frakciók adatai

Frakció	Etanol %	pH	Kicsapott fehérjék
I	8	7,2	Fibrinogén, Faktor VIII, Fibronectin, Komplement komponensek
II-III	25	6,9	IgG, IgA, IgM, Faktor II, VII, IX, X, globulinok
IV-1	18	5,2	α - és β -globulinok, AT-III, α 1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	α - és β -globulinok, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin (α - és β -globulinok)

A Cohn-frakcionálás során mindjárt az első frakcióban megjelenik a VIII. faktor, a véralvadáshoz nélkülözhetetlen fehérje, amelynek hiánya az örökletes vérzékenységek nyolcvan százalékát okozza. Ezek a páciensek a normális véralvadás fenntartása érdekében hetente VIII factor injekcióra szorulnak. Az ötödik, utolsó frakcióban jelenik meg legnagyobb tömegű komponens, a humán szérum albumin. Ez a fehérje felelős a vér ozmotikus egyensúlyáért, pufferoló hatása is van, vérvesztés esetén ennek a komponensnek a pótlása a legfontosabb.

Az etanolos frakcionálásnak több, még ma is értékelhető előnye van más eljárásokkal szemben:

- egyszerű, olcsó anyagok és berendezések szükségesek (puffer, alkohol, hűtököpenyes tartályok)
- sokszorosan ellenőrzött, elfogadott eljárás (1946 óta használják)
- léptéknövelhető (a legnagyobb üzem egy tételben 2500 liter vérplazmát dolgoz fel)
- a folytonosítás nehezen valósítható meg a csapadékok centrifugálásának ciklikus művelete miatt
- a befertőződés veszélye kicsi a jelenlévő alkohol és az alacsony hőmérséklet miatt.

Ne hallgassuk el ugyanakkor a hátrányokat és nehézségeket sem:

- nagy mennyiségű nagytisztaságú alkoholt használnak fel, ennek regenerálása és tisztítása sok energiát igényel
- az alkohol hatására a fehérjék egy része denaturálódik, a csapadékból nem lehet visszaoldani, emiatt egyes anyagokra rossz a kihozatal
- az előállított termékekben nyomokban sem maradhat alkohol, el kell távolítani. Ez külön műveletet jelent (liofilizálás, bepárlás (nagy vákuumban, esetleg filmbepárlóval), ultraszűrés, gélkromatográfia)
- a folyamat minden berendezését (tartályok, centrifugák) folyamatosan hűteni kell, ez nagy energiáfordítást igényel.

4.4.1.3. Kicsapás sóadagolással (kisózás)

A fehérjék kicsapása, illetve frakcionált kicsapása régóta ismert, klasszikus elválasztási művelet. A tömény sóoldatokban egyes fehérjék rosszabbul oldódnak, mint a vízben, és a sókoncentráció növelésével kicsapódnak.

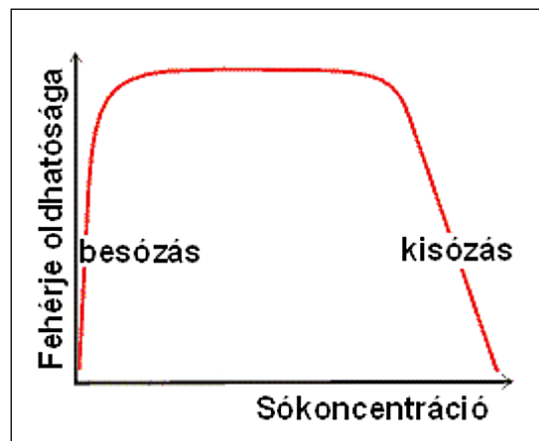
A kisózás folyamatának leírására többféle megközelítést is kidolgoztak. Mindegyik modell összhangba hozható kísérleti eredményekkel, használható kvantitatív leírásra. Ezek közül hármát mutatunk be röviden.

- Az oldószer polaritásának növekedése csökkenti az apoláris fehérjék oldhatóságát. A mechanizmus ellentétes az oldószeres kicsapással, ahol a polaritás csökkent és a poláris fehérjék csapódtak ki. A polaritás növekedése az ionerősséggel hozható kapcsolatba.
- A hidrátburok elvonása csökkenti a fehérjék oldhatóságát. A hozzáadott sók ionjai nagy felületi töltéssűrűségük révén sok vízmolekulából álló hidrátburkot vonzanak maguk köré, ezzel a fehérjék hidratáltsága csökken, ami az oldhatóság csökkenésével jár. Ennél a modellnél az ionok anyagi minőségét is számításba kell venni, nem elegendő az eredő ionerősség.
- A fehérjék ionpárok képeznek a só ionjaival. A kationos csoportok a só anionjával, a karbonsavcsoportok pedig a sók kationjával. Ennek az ionpárkomplexnek a képződése és disszociációja egy egyensúlyi kémiai reakció, amelyre formálisan felírható egy oldhatósági szorzat:

$$K = [\text{fehérje}][\text{NH}_4]^n[\text{SO}_4]^m$$

ahol n és $2m$ sztöchiometriailag a fehérje ionizálható csoportjainak számát jelentik. A sóionok koncentrációjának növekedésével a szorzat értéke csak úgy maradhat állandó, ha az oldott fehérje koncentrációja csökken, azaz a fehérje kicsapódik.

A fehérjék oldhatóságának változása a sókoncentráció függvényében nem mindig mutat monoton csökkenést. Sok fehérje ionmentes vízben rosszabbul oldódik, mint híg sóoldatban (globulinok oldhatósági kategóriája). Ezeknél a sók ionjainak megjelenésével az oldhatóság javul, mert az ionok rákötődnek a fehérjemolekula egyes pontjaira, ezzel javítják a hidratáltságot, vele az oldhatóságot. Ezt a jelenséget nevezik „besózásnak”, azaz só hatására történő oldatba vitelnek, ami éppen ellentéte kisózás folyamatának. A sókoncentráció további növelésével aztán az oldhatóság csökken, a kisózás a többi fehérjéhez hasonlóan bekövetkezik (4.4.1.3.1. ábra).



4.4.1.3.1. ábra: Besózás és kisózás jelensége

A kisózási lépés tervezése és megvalósítása során célszerű szem előtt tartani néhány tapasztalati irányelvet.

- A só kiválasztásánál az egyes ionok kicsapási hatékonyságát a [Hofmeister-sorban](#) elfoglalt helyük alapján hasonlíthatjuk össze.
- Ipari léptékben a nagy sómennyiségek miatt vegyük figyelembe a sók árát. Lehet, hogy az olcsóbb sóból többre van szükség, de mégis gazdaságosabb.
- Vizsgáljuk meg a sóoldat és a csapadék sűrűségkülönbségét. A csapadék centrifugálását megnehezítheti, ha kicsi a sűrűségkülönbség.
- A só hozzáadásánál törekedjünk a térfogatnövekedés minimalizálására. Ha túlságosan híg oldatban adjuk hozzá a sót, akkor nagyon felhígítjuk az oldatot, romlik a kicsapás hatékonysága. Logikus lenne, ha inkább szilárd sót adnánk a fehérjeoldathoz, de ennek az a veszélye, hogy a sókristályok felületén pillanatszerűen kialakul egy sóval telített folyadékfilm, és ebből a

telített oldatból a kívántnál több fehérje csapódik ki, ami beburkolja a sókristályt és ezzel megakadályozza feloldódását.

- Kisózásnál a hasonló jellegű (polaritású) fehérjék közül előbb a nagyobb molekulák válnak ki, a kisebb móltömegűek tovább maradnak oldatban.

A felsoroltakat figyelembe véve a leggyakoribb kicsapásra használt só az ammónium-szulfát. Olcsó, inert, jól disszociáló erős elektrolit, nagy ionerősséget ad. Egyes speciális célokra, elsősorban nukleinsavak kicsapására más anyagokat is használnak.

Sztreptomycin: eredetileg antibiotikum, aminek támadáspontja a prokarióta riboszóma, ennek S12 fehérjéjéhez kapcsolódva gátolja a fehérjeszintézist. Ennek megfelelően oldatban is a ribonukleinsavhoz kapcsolódó fehérjéket csapja ki.

Protamin: a spermában jelenlévő természetes DNS-kötő fehérje. Semlegesített protamin-szulfáttal mind a DNS, mind az RNS kicsapható az oldatból. Sokszor a nukleinsav-kötő fehérjék is a csapadékba kerülnek.

Poli-etilénimin: szintetikus, vízoldható, pozitív töltésű, bázikus polimer, amely ionos komplexet képez a savas karakterű molekulákkal, így a nukleinsavakkal is. Kicsapja ezeket, illetve a nukleo-proteineket is. A kicsapáshoz sokszor meglepően kis koncentráció (0,1%) is elegendő.

A fehérjék kisózással végrehajtott kicsapását a kollagén példáján mutatjuk be. A halbőrből extrahált kollagént kisózással tisztítjuk.



4.4.1.3.1. videó: Kollagén kisózása

A kb. 3%-os kollagénoldathoz telített nátrium-klorid oldatot adunk, amitől azonnal pelyhes fehér csapadék válik ki.

4.4.1.4. Kicsapás hővel

A túltelítés létrehozásának klasszikus módja az oldat bepárlása, majd lehütése. A melegen telített oldat lehűtve túltelítetté válik. Ez a biológiai anyagok hőérzékenysége miatt csak korlátozottan alkalmazható. Kis molekulájú biotermékek (aminosavak: lizin, treonin) feldolgozásánál használnak (vákuum)bepárlást, de a fehérjéknél a hődenaturálódás miatt ez nem járható út. Viszont éppen a hőbomlást kihasználva meg lehet szabadulni egyes szennyező fehérjéktől. Ez a szelektív denaturálás nem tartozik a szűkebb értelemben vett csapadékképzéshez, mivel itt nem a célterméket visszük át a csapadék fázisba, hanem egy szennyező komponens inaktíválunk, sokszor anélkül, hogy kicsapódna az oldatból. Az eljárás lényegét egy példával világíthatjuk meg legjobban.

Élesztősejtek feldolgozása után a preparátumban kétféle dehidrogenáz enzim (A és B) található, de csak az egyikre van szükségünk, a másik aktivitása zavarja a főtermék működését. Vizsgáljuk meg a két enzim inaktíválódásának kinetikáját! A denaturálódás monomolekuláris, azaz elsőrendű kinetikával leírható folyamat. A sebességi állandó hőmérsékletfüggése az Arrhenius-egyenlettel írható le.

$$\frac{dP}{dt} = -kP \qquad k = k_0 e^{-\frac{E}{RT}}$$

Mérési adatok alapján számítsuk ki a két enzim reakciósebességi állandóit két hőmérsékleten, 20 és 50 °C-on (4.4.1.4.1. táblázat).

4.4.1.4.1. táblázat: A két enzim hődenaturálódásának kinetikai állandói

	20 °C-on	50 °C-on
$k_A = 5 \cdot 10^{57} \text{ sec}^{-1} \cdot \exp(-380 \text{ kJ/RT})$	$8,3 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
$k_B = 4,2 \cdot 10^{64} \text{ sec}^{-1} \cdot \exp(-415 \text{ kJ/RT})$	$4 \cdot 10^{-10}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$

Ennek birtokában már kiszámíthatjuk a maradék aktivitást (c/c_0) például 10 perces hőkezelés után:

4.4.1.4.2. táblázat: A két enzim maradék aktivitása 10 perces hőkezelés után

	20 °C-on	50 °C-on
A	>0,999	0,91
B	>0,999	0,17

Látható, hogy a k állandó értékében meglévő egy nagyságrendnyi különbség a bomlás mértékében megjelenik. Szobahőmérsékleten mindkét enzim stabil, de ötven fokon már a B enzim aktivitásából csak 17%-nyi maradt, amíg az A aktivitása alig csökkent, 91%-a megmaradt. Tehát ezzel a kinetikai művelettel a B enzim eliminálható az A mellől.

4.4.1.5. A precipitáció léptéknövelése

A csapadékképzés műveletének reprodukálása, léptéknövelése nehéz problémát jelent, mert nem a készülék egészében, hanem lokálisan, a molekulák, részecskék felületén kell azonos feltételeket biztosítani (koncentrációk, túltelítés, anyagtranszportok).

A precipitáció folyamata több szakaszra osztható, amelyek időben követik egymást, de párhuzamosan is lejátszódnak. Felsorolásszerűen az egyes lépések:

- 1) Átkeveredés
- 2) Gócképződés
- 3) Gócnövekedés (diffúzió által limitált)
- 4) Gócnövekedés (áramlás által limitált)
- 5) Aggregáció
- 6) Elválasztás.

Ebben a sorrendben tekintjük át részletesebben is az egyes részfolyamatokat.

Átkeveredés: A kicsapás kiváltása mindig valamilyen folyadék hozzáadásával történik. A hozzáadott kicsapószer elkeverése, homogenizálása sohasem pillanatszerű. Az elosztás sebessége kvantitatívan az átkeverési idővel jellemezhető, amely definíció szerint

$$t = \frac{l^2}{4D}$$

ahol: l – a turbulens örvények átlagos mérete
 D – diffúziós állandó.

Az összefüggésben szereplő örvények mérete pedig a következőképpen számítható:

$$l = \left(\frac{\rho v^3}{P/V} \right)^{1/4}$$

ahol: ρ – sűrűség v – viszkozitás
 P – teljesítmény V – térfogat

A nevezőben szereplő P/V hányados a „bekevert teljesítmény” (kW/m^3), amivel jól jellemezhető a kevert tartályreaktor keverésének intenzitása, a turbulencia mértéke. Ebben a szakaszban tehát intenzív keverésre van szükség, hogy gyorsan elérjük a koncentráció homogenitását.

Gócképződés: gócok képződése alatt azt a folyamatot értjük, amelynek során a homogén oldatban egyesével mozgó makromolekulákból létrejön az első, szilárd fázist képviselő szemcse, amihez aztán oldatból folyamatosan tapadnak hozzá további makromolekulák. Nagy molekulák kicsapásánál ez az egyesülés spontán és gyorsan végbemegy, már az első két molekula találkozásával és összetapadásával góc jön létre. A kristályosítással ellentétben ez a lépés sebességmeghatározó szűk keresztmetszetet jelent.

Diffúziós gócnövekedés: a gócok növekedésének első szakasza. A diffúziós jelzöt azért kapta, mert a részecskék mozgását, mozgatását egyértelműen a Brown-mozgás jellemzi. A növekvő góc még elég kicsi ahhoz, hogy maga is Brown-mozgással változtassa helyét. Ezáltal folyamatosan újabb és újabb folyadékkal érintkezik, a felületén a diffúziós transzport a sebességmeghatározó folyamat. A diffúzió sebességének leírására Fick-törvényét írhatjuk fel:

$$\frac{dc_i}{dt} = k(c_i - c^*)^2$$

ahol: $k = 8 \cdot \pi \cdot D \cdot d \cdot N$
 D – diffúziós állandó
 d – szemcseátmérő
 N – Avogadro-szám.

Keveréses gócnövekedés akkor válik jellemzővé, amikor a növekvő góc mérete olyan mértékben megnövekszik, hogy a kialakuló szemcsét a hőmozgás már nem képes folyamatos mozgásban tartani. Ez csökkenti a gócnövekedés sebességét, mivel két mozgó partner (a góc és az oldott molekula) találkozásának valószínűsége sokkal nagyobb, mint ha az egyik áll, és csak a másik mozog. A találkozások valószínűségét megnövelhetjük, ha a folyadékot keverjük, és ez által továbbra is mozgásban tartjuk a gócokat. A folyamatot leíró differenciálegyenlet alakilag teljesen azonos az előzővel, de a k konstans jelentése itt egészen más, nem a diffúziótól függ, hanem a keverés intenzitásától.

$$\frac{dc_i}{dt} = k(c_i - c^*)^2$$

$$k = 2/3 \cdot \alpha \cdot N \cdot d^2 \left(\frac{P/V}{\rho \eta} \right)^{1/2}$$

ahol α – tapadási faktor, annak valószínűsége, hogy az ütközés után a molekula megtapad a góc felületén
 d – szemcseátmérő
 $[(P/V) / (\rho \cdot \eta)]^{1/2}$ – ismét a sebességgradiens a folyadékban

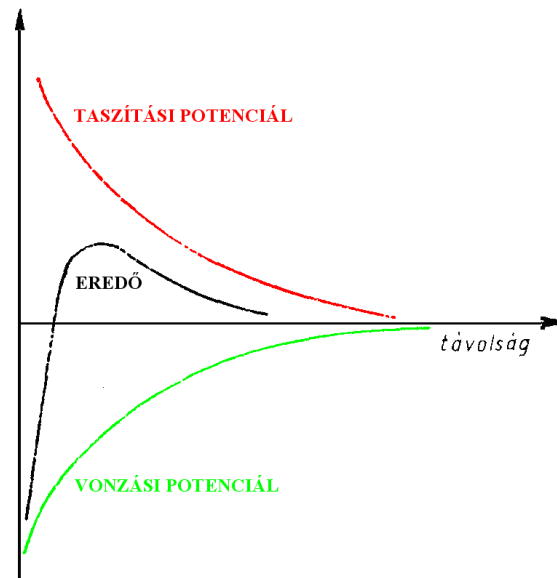
A kétféle gócnövekedési mechanizmust animációval is szemléltetjük:



4.4.1.5.1. animáció: A gócnövekedési mechanizmusok összehasonlítása

Az aggregáció kifejezést gyűjtőfogalomként, a kialakult góccok összetapadására használjuk. Beleértjük a kolloid rendszerek destabilizációját (koaguláció), és a destabilizált részecskék összetapadását (flokkuláció).

A növekvő góccoknak, mint a kolloidok legtöbbszörének, felületi töltése van. Emiatt az érintkező folyadékban ellenionréteg alakul ki, amelynek síkjaiban jól értelmezhető potenciálok jönnek létre (Nernst-, Stern-, ξ -potenciál, ld. a Kolloidika tárgyban). Az elektrosztatikus taszítás és a van der Waals-vonzóerők eredőjeként egy potenciálgát alakul ki, amely akadályozza a részecskék összetapadását (4.4.1.5.1. ábra).



4.4.1.5.1. ábra: Vonzási és taszítási potenciálok

A destabilizáció célja a potenciálgát csökkentése, illetve lebontása. Ezt többféle módon is megvalósíthatjuk, különféle anyagok adagolásával.

Erős elektrolitok adagolása összenyomja a felületi határrejtegeket és csökkenti a potenciálgátat. A Debye-sugár fordítottan arányos az ionkoncentrációval, az ionerősséggel.

$$K = \left(\frac{2z^2 e^2 N c}{\epsilon k T} \right)^{1/2} = 5 \cdot 10^7 \sqrt{I}$$

ahol: K – a Debye sugár reciproka z – az ion töltésszáma
 e – az elektron töltése N – Avogadro-szám
 c – ionkoncentráció k – Boltzman-állandó
 T – abszolút hőmérséklet I – ionerősség
 ϵ – permittivitás

A sóadagolásnak megvan az az előnye is, hogy a hozzáadott anyag az oldatban marad, és nem szennyezi a csapadékot.

Derítő csapadékképzés (sweep floc coagulation) esetén a csapadékot úgy távolítjuk el az oldatból, hogy az eredeti csapadékképzéssel párhuzamosan egy második, jól ismert anyag kicsapását indítjuk el, amelynek nagyméretű, nagy felületű pelyhei magukkal ragadják, „kisöprik” az összes lebegő anyagot.

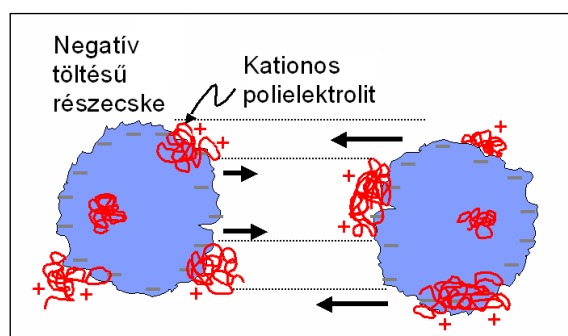
Erre a célra alumínium-, vas- és néha magnéziumsókat használnak, enyhén lúgos közegben. Al(III) vagy Fe(III) sőt vízhez adva a disszociáció után Fe^{3+} és Al^{3+} ionok alakulnak ki, amelyek aztán hidratálódnak és $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ és $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ akvakomplex ionok keletkeznek, majd hidrolitikus reakciók során létrejön egy háromdimenziós mátrix, amely a kolloid részecskékhez tapadhat adszorpcióval.

A pH-t pontosan be kell állítanunk, hogy az optimális feltételeket megteremtjük. Ez gyakorta bonyolult, mert az akvakomplex fémionok, az Al(III) és a Fe(III) savas természetűek, H_3O^+ iont szabadítanak fel, ami a vizek természetes alkálitásával reagál. Elméletileg minden mg/l Al(III) só elfogyaszt 0,5 mg/l alkálitást, felszabadítva ezzel 0,44 mg/l CO_2 -ot. Ha a természetes alkálitás nem elég, hogy az Al(III) sóval reagáljon, akkor pl. Na_2CO_3 hozzáadásával azt biztosítani kell.

A fémionok hatása kettős. Egyrészt elektrolitként elnyomják a felületi töltéseket, másrészt a leváló hidroxidok sweep floc hatása tisztítja a folyadékot.

Ez a kettős csapadékképzés akkor célszerű eljárás, ha a szennyező anyagokat kívánjuk eltávolítani a rendszerből. A csapadékban ugyanis jelentős arányban jelen vannak az oldhatatlan fémvegyületek, amelyekről nagyon nehéz megszabadulni.

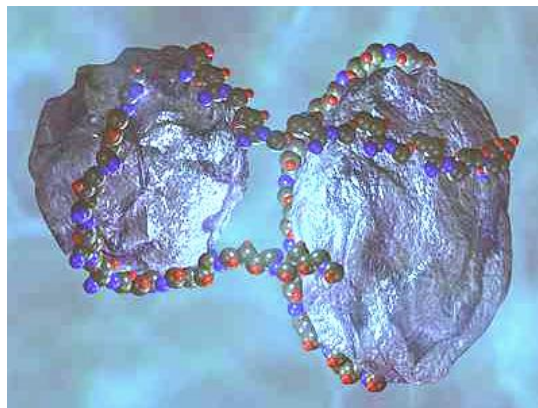
Ionpároképzés polielektrolitokkal. A koloid részecskék felületi töltésének elnyomását a kisméretű ásványi ionok mellett polielektrolitokkal is megvalósíthatjuk. A felületen lévő (általában negatív) töltésű helyekre kationos vegyületek (vízoldható polimerek, esetleg detergensok) tapadhatnak, ezáltal lefedik, leárnyékolják a szemcse töltését és csökkentik a taszító erőket (4.4.1.5.2. ábra).



4.4.1.5.2. ábra: Ionpároképzés polielektrolitokkal

Hídképző polimerek. Hosszú, lineáris láncsal rendelkező polimerek más mechanizmussal segítik elő a részecskék aggregációját. Ezek a polimermolekulák több koloid részecskéhez is kapcsolódhatnak egyszerre, ezáltal kedvezőbb ülepedési tulajdonságú agglomerátumot hoznak létre. Polielektrolitoknál a kötődés ionos jellegű, mint ez előzőekben, a nemionos jellegű polimereknél viszont a van der Waals-erők játszanak szerepet.

A polimerek mérete, formája, és töltése (amelyeket az ionerősség, az ionok töltése és a pH befolyásol) határozzák meg, hogy milyen mértékben képesek elősegíteni a koagulációt. A polimerek alakja, hajtogatottsága sokféle lehet, de ha az ionizálható csoportjai ionizálódnak, akkor az azonos töltésű csoportok taszítása miatt „kiegyenesedik”, a lineárishoz közelítő formák túlsúlyba kerülnek a globulárisakkal szemben. Ilyenkor van lehetőség arra, hogy a polimerláncok a koloid részecskékhez kapcsolódva köztük „hidakat” képezzenek (4.4.1.5.3. ábra).



4.4.1.5.3. ábra: Hídképző polimerekkel összekapcsolt csapadékszempcsék

Ennél az eljárásnál is fennáll az a nehézség, hogy a hozzáadott polimer beszennyezi a csapadékot, így a céltermék leválasztásánál nem célszerű ezt választani.

Elválasztás: a csapadék és a folyadékfázis elválasztására a már tárgyalt szilárd-folyadék elválasztási műveleteket (szűrés, centrifugálás) alkalmazhatjuk, ezeket itt nem tárgyaljuk részletesen.

A keverés intenzitása

Sorra véve a csapadékképzés különböző fázisait, belátható, hogy az egyes szakaszokban eltérő keverési intenzitás szükséges.

Az átkeverés során intenzív, erőteljes keverésre van szükség, hogy az átkeverési idő minél rövidebb legyen, minél hamarabb homogenizálódjon a rendszer.

A göcképzés diffúziós jellegű folyamat, a Brown-mozgás hozza létre, tehát ennél nincs szükség keverésre.

A göcnövekedés első, diffúziós szakaszában megint csak nincs hatása a keverésnek, tisztán diffúziós transzport megy végbe.

Az áramlási göcnövekedés szakaszában már kevertetni kell a rendszert, hogy a megnövekedett részecskék mozogjanak a folyadékban. A túl intenzív, turbulens keverés viszont nyíró hatásával felaprítaná a csapadékszemcséket, ezért ebben a szakaszban mérsékelt keverés az optimális.

Az aggregáció fázisában még inkább ügyelni kell a lazán összetapadó csapadék érzékenységére, éppen csak az ülepedést meggátló kavarást alkalmaznak.

A művelet végrehajtása során az egyes szakaszok nem különülnek el élesen, párhuzamosan is zajlanak, ezért az ellentmondó követelményeknek legjobban megfelelő kompromisszumos keverési profil általában fokozatosan lassuló fordulatszámú. Kezdetben rövid ideig intenzív, majd a végére a keverés átmegy kavarássá.

4.4.2. Kristályosítás

Ahhoz, hogy az elválasztandó anyagot szilárd fázisba vigyük, kétféle műveletet is alkalmazhatunk: a csapadékképzést (frakcionált kicsapás) és a kristályosítást. A csapadékképzést a koncentráció műveletek közé sorolhatjuk, míg a kristályosítást általában a down-stream műveletek utolsó lépéseként, azaz végtisztításként használjuk. A továbbiakban a kristályosítással fogunk foglalkozni részletesebben.

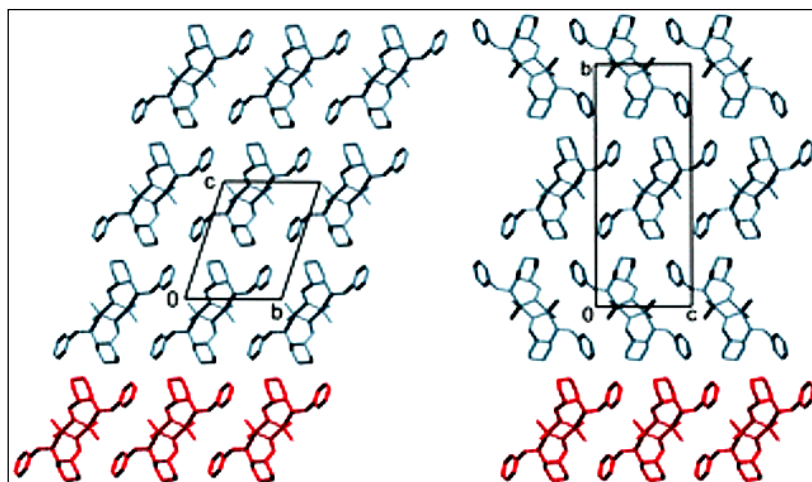
4.4.2.1. Általában a kristályosításról

A kristályosítás régi és széles körben (nem csak a biológiai iparban) használatos tisztítási művelet, évente 100 millió tonnás nagyságrendben kristályosítanak például szervesetlen sókat. A biológiailag érdekes anyagok közül a legnagyobb léptékben a szacharózt kristályosítják. Ennek a kristályosításnak nemcsak a terméke (kristálycukor) értékes, hanem a maradék anyalúg, a melasz is hasznos anyag, sok fermentációs táptalaj alapkomponense. A kristályosítás során tiszta vagy legalább is a kiindulásnál sokkal tisztább anyagot kapunk. A kristályok növekedése során a kristályrácsba csak azonos, illeszkedő molekulák épülnek be, a hibátlan rácsú egykristály gyakorlatilag szennyezésmentes, homogén anyag. A szennyező anyagok nem épülnek be a kristályrácsba, csak a kristályok felületén, illetve a zárványokban találhatók.

Egy anyag többféle alakban is kristályosodhat, azonos molekulából többféle kristályalak is létrejöhet (4.4.2.1.1. ábra).

A kristályosítás előnye, hogy

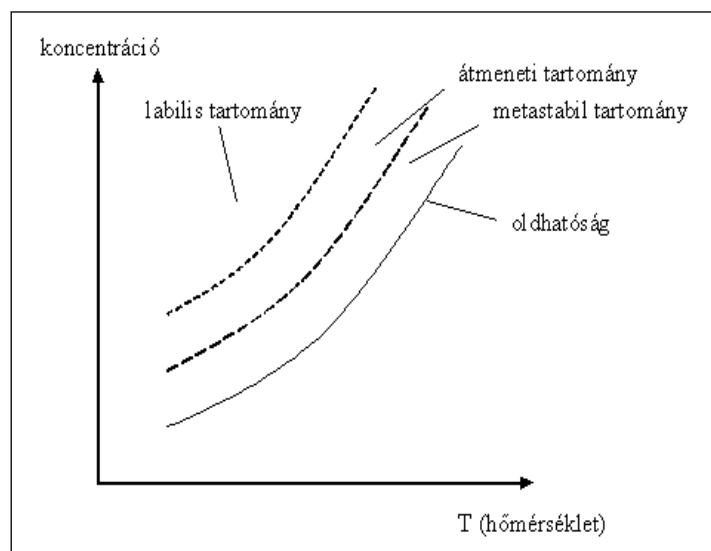
- tiszta terméket kapunk (erős szelektivitás a beépülés során),
- az egyforma méretű és alakú kristályokat jól lehet feldolgozni (mozgatni, szűrni, szárítani),
- javul a termék esztétikai megjelenése.



4.4.2.1.1. ábra: Azonos molekulákból többféle lehetséges kristályalak jöhet létre

Másrésről a kristályosítás hátránya a lépték-, ill. méretnövelés nehézsége. Ez abból adódik, hogy

- kétfázisú rendszerrel dolgozunk;
- a szennyezéseknek (szilárd és oldott) nagy szerepe van a folyamatban;
- egyszerre zajlik hő- (a kristályosodási hő) és anyagátadás (túltelített oldatból kiválás);
- a rendszer termodinamikailag labilis (túltelítés);
- továbbá, hogy mindezeket a gyártások során folyamatosan reprodukálni kell.



4.4.2.1.2. ábra: A túltelítés tartományai

A telítés és az oldhatóság kapcsolatát vizsgálva (4.4.2.1.2. ábra) 3 instabil tartományt különíthetünk el az oldhatósági görbe felett:

- Metastabil, közvetlenül a telítési görbe felett. A kis kristályok nagy felületi energiájának következtében új góc nem képződik, viszont a kristálynövekedés a jelen lévő kristályok felületén folyik. Ebben a tartományban oltókristályok bevitelével kristályosíthatunk.
- Az átmeneti tartományban a góképződés és a már meglévő kristályok növekedése egyszerre zajlik.
- A labilis tartományban a spontán góképződés jellemző, apró kristályok alakulnak ki oltókristály nélkül is.

A tisztítás mértékét a kristályosításnál a tisztítási faktorról (E-faktor) jellemezzük. A faktort a termékre (A) és valamely szennyezőre (B) is felírhatjuk:

$$E_A = \frac{\text{A komponens a kristályban}}{\text{A komponens az anyalúgban}}$$

$$E_B = \frac{\text{B komponens a kristályban}}{\text{B komponens az anyalúgban}}$$

Az elválasztási faktor a két E-faktor hányadosa:

$$\beta = \frac{E_A}{E_B}$$

4.4.2.2. A kristályosítás mechanizmusa, fázisai:

A kristályok kialakulásának folyamatát a csapadékképződéhez hasonló szakaszokra oszthatjuk fel. A lépések sorrendje és elnevezése hasonló, de a jelenségek fizikai tartalma eltérő.

1. Túltelítés létrehozása
2. Gócképződés
3. Gócnövekedés (diffúzió által limitált)
4. Gócnövekedés (áramlás által limitált)
5. Elválasztás
6. Mosás
7. Szárítás

Túltelítés: Ezt a csapadékképzéstől eltérően rendszerint *koncentrálással* (pl. vízelvétel bepárlással) és ezt követő hűtéssel oldják meg.

Gócképződés:

a) homogén gócképződés: A gócképződés a kristályosodásnál nem olyan spontán és gyors folyamat, mint csapadékképzésnél. Ott elegendő volt, ha két molekula összetapadt, és ez már növekedőképes góc volt. A kristályok legkisebb eleme, amely már hordozza a kristály tulajdonságait, az elemi cella. Ennek kell létrejönnie a növekedőképes góc kialakulásához. Az elemi cella viszont a kristály alakjától függően több molekulából áll (például tetraéderes szerkezet esetén 4, kockarács esetén 8 alkotó). Ilyen nagyobb számú részecske találkozása kevésbé valószínű, és ráadásul megfelelő irányból és megfelelő energiával kell érkezniük, hogy az ütközés után együtt is maradjanak. A találkozás valószínűsége a koncentrációval, pontosabban a túltelítés mértékével növekszik, a labilis tartományban a legnagyobb. A homogén gócképződés sebességét leíró félempirikus modell:

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot (c - c^*)^i$$

- ahol
- N – gócok száma
 - k – állandó
 - c – az oldott anyag (túltelített) koncentrációja az oldat főtömegében
 - c* – telítési koncentráció, oldhatóság
 - i – empirikus paraméter.

A homogén gócképződés tehát lassú folyamat, sokszor ez a sebességmeghatározó lépés.

b) heterogén gócképződés: a kristályosodás idegen anyagok (pl. lebegő porszemek, szennyezések, a tartály fala, a keverő) felületén is megindulhat. Ez a folyamat nagyon nehezen reprodukálható. A gyártásoknál a főkomponensek azonos koncentrációja megoldható, de a mikrokomponenseket, a szálló port azonos szinten tartani kívül esik a technológián.

c) másodlagos gócképződés: a már meglévő kristályok ütközése, dörzsölődése során a felületéről apró szilánkok válhatnak le, és ezek újabb gócként funkcionálnak. Ennek a sebessége a keverés intenzitásától és a kristályok törékenységétől függ.

A felsorolásból kitűnik, hogy a gócképződés lassú, illetve nehezen reprodukálható folyamat. Mindezt elkerülhetjük, ha oltókristályokat alkalmazunk. A kristályosítani kívánt tiszta anyag apró kristályait beadva kellő számú góc egyszerre jelenik meg a rendszerben, ezzel a folyamat szabályozottan indítható. A reprodukálható gyártáshoz viszont az oltókristályok számát, méretét és méreteloszlását is állandóan kell tartani.

Diffúziós gócnövekedés:

A diffúziós jelző a csapadékképzéshez hasonlóan arra utal, hogy a folyamat mindkét partnere, a kristály és a felületére kirakódó molekula is hőmozgást végez, így könnyebben találkoznak. Az anyagtranszport leírására ez esetben is Fick-féle leírást használjuk. Feltételezzük, hogy a kristály szögletes, síklapok határolják, így az anyagátadást Fick I. törvényének egydimenziós változatával jellemezhetjük:

$$\frac{dM}{dt} = k \cdot A \cdot (c - c^*)$$

ahol M – a kristály tömege

$k = f(\rho; \eta; D)$ tömegátadási együttható,

c – a túltelített oldat koncentrációja,

c^* – a telített oldat koncentrációja az adott hőmérsékleten,

A – a kristály felülete.

A gócnövekedés hajtóereje a túltelítés mértéke, a tömeggyarapodás sebessége elsősorban ettől függ.

Konvekciós gócnövekedés:

A kristálygóc növekedésével elveszti a mozgásképeségét, a Brown-mozgás már nem képes továbbvinni. Ekkor válik meghatározóvá a konvekciós mechanizmus, a szuszpenzió keverése, áramoltatása. A konvektív anyagtranszport leírására formálisan ugyanazt az egyenletet használjuk, mint a diffúziósnál, de a k paraméter értelmezése más. A tömegátviteli tényező itt két tagból áll, mivel két egymást követő folyamat sebességét kell leírni. Az első a molekula eljutása a kristály felületére, sebességére jellemző a k állandó, aminek értéke a keverés intenzitásától és az oldat tulajdonságaitól függ. A második lépés a molekula beépülése a kristályrácsba. Ezt a κ felületi reakciósebességi állandóval adhatjuk meg, ami csak a hőmérséklettől függ. A két átviteli tényezőt reciprok összegezésével szerepeltetjük az egyenletben:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{1}{\frac{1}{k} + \frac{1}{\kappa}} \cdot A \cdot (c - c^*)$$

ahol κ – a felületi reakciósebességi állandó,

k – az áramlásra jellemző állandó.

$$l = \frac{l^3}{l^2} = \frac{V}{A/6} = \frac{6 \cdot M}{\rho \cdot A}$$

Az egyenletek közös hibája, hogy a tömegnövekedés függ a felülettől, amely a növekedés során folyamatosan változik, így nehéz számolni. A tömeg és a felület egységes kifejezése érdekében bevezettek egy új paramétert, a kristály „jellemző méretét”:

ahol l – a kristály jellemző mérete, kocka esetén élhossza

M – a kristály tömege

A – a kristály felülete.

Ez a felírás egy kocka alakú kristályra helytálló. Más kristályalakokra viszont nem kielégítő, ezért bevezették a Φ_V térfogati és Φ_A felületi korrekciós alaktényezőket (ezek értéke kocka alak esetén eggyel egyenlő). Ezekkel kifejezve a kristály tömege és felülete:

$$M = \rho \cdot l^3 \cdot \Phi_V$$

$$A = 6 \cdot l^2 \cdot \Phi_A$$

Visszahelyettesítve a fenti egyenletbe:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{d(\rho \cdot l^3 \cdot \Phi_V)}{dt} = 6 \cdot \Phi_A \cdot l^2 \cdot \frac{1}{\frac{1}{k} + \frac{1}{\kappa}} \cdot (c - c^*)$$

Az egyenletet egyszerűsítve és átrendezve a következő alakot kapjuk:

$$\frac{dl}{dt} = \left(\frac{6 \cdot \Phi_A}{\Phi_V \cdot \rho} \right) \cdot \frac{l}{\frac{1}{k} + \frac{1}{\kappa}} \cdot (c - c^*) = k_g \cdot (c - c^*) = G$$

ahol: k_g – összefoglaló konstans
 G – lineáris növekedési sebesség.

Az egyszerűsített egyenletből kitűnik, hogy a lineáris növekedés független a kristályok méretétől, csak a túltelítés mértékétől függ. Azaz a kis kristályok ugyanakkora lineáris sebességgel növekednek, mint a nagyok. Tehát ha nincs új göcképződés, akkor a kristályok azonos mértékben nőnek, méreteloszlásuk nem változik, azonos marad az oltókristályéval.

Ennek alapján belátható, hogy a rendszer az egyenletes méreteloszlás felé törekszik. Például, amíg egy kis (egységnyi) kristály (egységnyivel, azaz) kétszeresére nő, a tömege $2^3=8$ -szorosára nő, addig egy nagyobb (10 egységnyi hosszúságú) kristály csak 1,1-szeresére nő, a tömege pedig $1,1^3 = 1,33$ -szorosára növekszik. Azaz a kis kristályok utolérnek, pontosabban megközelítik a nagyokat méretben és tömegben, ez pedig kedvez a homogén termék kialakulásának. Ezt a folyamatot szemlélteti az 3. táblázat és az animáció.



4.4.2.2.1. animáció: A méret- és tömegarányok változása a kristálynövekedés során

4.4.2.2.1. táblázat: A méret- és tömegarányok változása a kristálynövekedés során.

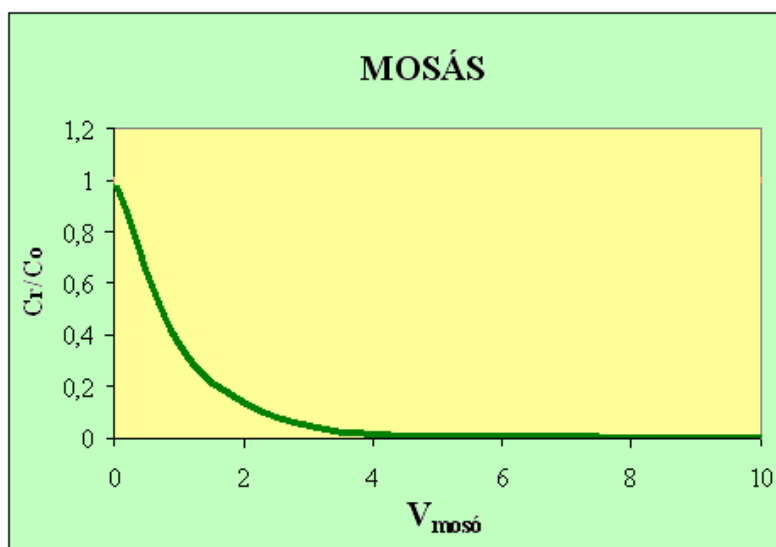
méret			Tömeg			méretarány		tömegarány	
1	2	10	1	8	1 000	2	10	8	1 000
2	3	11	8	27	1 331	1,50	5,50	3,38	166,38
5	6	14	125	216	2 744	1,20	2,80	1,73	21,95
10	11	19	1 000	1 331	6 859	1,10	1,90	1,33	6,86
15	16	24	3 375	4 096	13 824	1,07	1,60	1,21	4,10
20	21	29	8 000	9 261	24 389	1,05	1,45	1,16	3,05

A kiindulási állapotban három eltérő méretű kristályt (egy-, kettő- és tízegységnyi hosszúsággal) választottunk ki. Ezek méret- és tömegnövekedését adtuk meg egészen a húzegységnyi hosszúságig. Az abszolút méretkülönbségek megmaradnak, de a méret- és tömegarányok drasztikusan csökkennek. Az eredetileg tízszeres hosszúságarány 1,45-re, az ezerszeres tömegarány háromszorosra csökkent.

A közel azonos méretű kristályok mind technológiailag, mind eladhatóság szempontjából előnyösek.

Elválasztás: a kivált kristályokat a tárgyalat szilárd-folyadék elválasztási műveletek egyikével nyerjük ki az anyalúgból.

Mosás: a kristályok felülete az elválasztás után rendszerint még szennyezett az anyalúg maradványaival. Célszerű ezt a szennyező réteget egyből, még nedves állapotban lemosni a felületről. Dead end szűrésnél ez egyszerűen megvalósítható, még a szűrőfelületen tiszta mosófolyadékkal át lehet mosni a kristályos anyagot. A mosás műveletének leírására ugyanazt a matematikai formát alkalmazhatjuk, mint amit a vákuum dobszűrőnél, illetve a diaszűrésnél tárgyaltunk. A kristályokon lévő folyadékban a szennyezések koncentrációja exponenciálisan csökken a mosófolyadék mennyiségével (4.4.2.2.1. ábra).



4.4.2.2.1. ábra: A mosás hatékonysága

Szárítás: az elválasztás után a kristályos anyag felülete még nedves, a mosással is csak azt értük el, hogy az anyalúg helyett a tiszta mosófolyadék borítja a kristályokat. Ezt a folyadékot szárítással távolítják el a kristályokról. Ha a folyadék nem tiszta, oldott szennyezéseket tartalmaz, akkor a szárításnál bepárlódik, és a szennyező anyagok rászáradnak a kristályok felületére, ami erősen rontja a termék minőségét.

4.4.2.3. Kristályosítás ipari léptékben

Minden elválasztási/tisztítási művelet alkalmazásánál alapvető kérdés, hogy alkalmazható-e nagyobb, ipari mennyiségű anyag feldolgozására vagy csak laboratóriumi módszer marad. A kristályosítás minden reprodukciós nehézsége ellenére jól léptéknövelhető, nagy mennyiségű anyag feldolgozására is alkalmas.

Szakaszos kristályosítás: Szakaszos kristályosítást a kisebb mennyiségű termékekre alkalmazzák (< 500 kg). Készülékként rendszerint egy keverős tartályreaktort választanak, változtatható fordulatszámú keveréssel, duplikátoros fűtési és hűtési lehetőséggel. Előfordulnak nagy átmérőjű és kis magasságú tartályok is, nagy átmérőjű, lassú fordulatú kavarával (kristályosító „csésze”). A szakaszos kristályosítás során a kristályok folyamatosan nőnek, amíg az anyalúg „ki nem merül”. Mi okozza ezt a „kimerülést”? A lineáris növekedést leíró egyenlet,

$$\frac{dl}{dt} = k_g \cdot (c - c^*) = G$$

szerint a folyamat hajtóereje az aktuális és a telítési koncentráció közötti koncentrációkülönbség, röviden fogalmazva a túltelítés mértéke. Ez viszont csökken, mivel a kristályképződéssel anyag távozik az oldatból. A csökkenő hajtóerő pedig csökkenő növekedési sebességet jelent. Ha fenn kívánjuk tartani az állandó kristálynövekedést, akkor hűtéssel a telítési koncentrációt is csökkenteni kell, így a koncentrációkülönbség állandósítható.

Ha egyből intenzív hűtést alkalmazunk, akkor nagy lesz a hajtóerő, gyorsan nőnek a kristályok, de a termék minősége nem lesz egységes (egyenetlen méretű, és sokszor szennyezett kristályok). Ehelyett célszerű optimált hőfokprogram szerint hűteni. A profil kialakítása több tényezőtől függ:

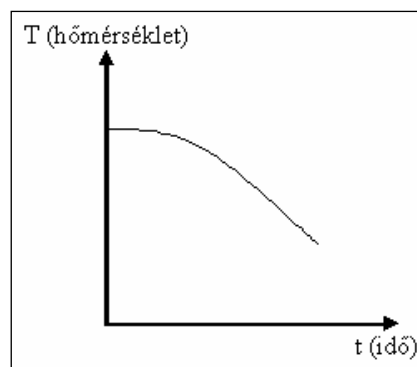
- az oltókristály tömegétől és méretétől,
- a növekedési sebességtől (G),
- az oldhatóság hőmérsékletfüggésétől $\left(\frac{dc^*}{dT}\right)$

Ez utóbbit, a telítési görbe meredekségét a teljes hőmérséklettartományban ki kell mérni. Ha a számításokat egy állandó G -érték tartására végezzük el, akkor a hűtési profil meredeksége a következőképpen írható fel:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{3 \cdot G \cdot M_0}{\left(\frac{dc^*}{dT}\right) \cdot V \cdot l_0^3} \cdot (l_0 + G \cdot t)^2$$

ahol: M_0 – az oltókristály kezdeti tömege
 l_0 – az oltókristály kezdeti mérete.

A hűtési görbe eleje általában lapos, a későbbiekben egyre meredekebben lehajlik (4.4.2.3.1. ábra).



4.4.2.3.1. ábra: Optimált hőfokprofil

A hőmérséklet mellett a kristályosítás fontos paramétere a keverés intenzitása. Vizsgáljuk meg az egyes fázisok keverésigényét!

1. Túltelítés (= hűtés) – a megfelelő hőátadáshoz szükséges a keverés
2. Gócképződés – molekuláris folyamat, kicsi a hatása a keverésnek
3. Diffúziós gócnövekedés – a növekedésre nincs hatása, de a hűtéshez szükséges
4. Áramlási gócnövekedés – a növekedéshez és a hűtéshez szükség van mérsékelt keverésre.

Mivel ezek fázisok nem különülnek el élesen, és a részfolyamatok párhuzamosan is működnek, a kristályosítás teljes tartama alatt egyenletesen mérsékelt keverést alkalmaznak.

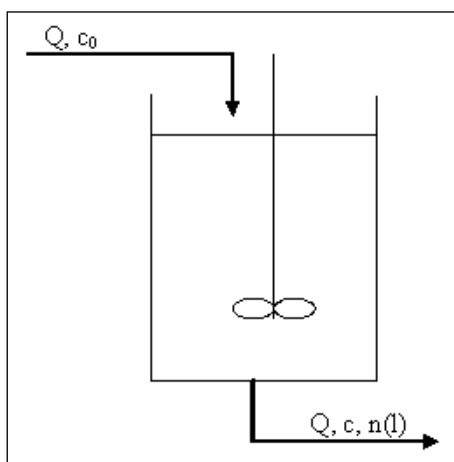
A műveletek léptéknövelésénél mindig alapvető kérdés, hogy egy keverési állapotot, keverési intenzitást hogyan lehet reprodukálni másik készülékben, és/vagy nagyobb léptékben. A méretnövelést többféle kritérium szerint megvalósíthatjuk:

- állandó P/V (bekevert teljesítmény),
- állandó fordulatszám,
- állandó kerületi sebesség,
- mindig a minimális leülepedésgátló keverés alkalmazásával.

A választott kritérium technológiánként változó, nincs általánosítható szabály, mindig az aktuális folyamat paramétereit, tulajdonságait figyelembe véve kell számolni.

Ha nem alkalmaznak oltókristályt, akkor a gócképződés sebességének reprodukálását is meg kell oldani. Minél nagyobb a sarzsméret, annál inkább számolni kell a másodlagos gócképződés megjelenésével.

Folytonos kristályosítás: A folytonos kristályosító egy kevert folytonos tartályreaktor (4.4.2.3.2. ábra), amelynek bemenete a túltelített oldat, kimente pedig a kristályokat tartalmazó anyalúg. Állandóan tartott körülmények között a készülékben állandósult állapot alakul ki, időben állandó lesz a kilépő kristályok száma, mérete és méreteloszlása is. A betáplálásban nincsenek kristályok, azaz nem alkalmaznak oltókristályt, a góccok elsősorban a másodlagos gócképződésből származnak.



4.4.2.3.2. ábra: Folytonos kristályosító

A felsorolt előnyök mellett viszont a folytonos kristályosító szabályozása, az állandósult állapot fenntartása bonyolultabb, mint egy szakaszos készüléknél. A szakaszos és a folytonos műveletek előnyeit és hátrányait figyelembe véve általában, ha a termelt sarzs mérete nem haladja meg az 500 kg-ot, akkor inkább szakaszos, ha ennél nagyobb, akkor inkább folyamatos kristályosítást alkalmaznak.

A meghatározó kristályméret (l_D) a következő összefüggéssel határozható meg:

$$l_D = \frac{3 \cdot G \cdot V}{Q}$$

ahol $G = \frac{dl}{dt}$ a növekedési sebesség,

V – a reaktor térfogata,

Q – a térfogatáram.

4.4.2.4. Átkristályosítások

A kristályosításnál az anyagban maradhatnak egyes szennyezések, mint például együttkristályosodás, zárványok vagy felületi szennyezés (ez utóbbi a mosással csökkenthető), ezért további tisztításra átkristályosítást szoktak alkalmazni.

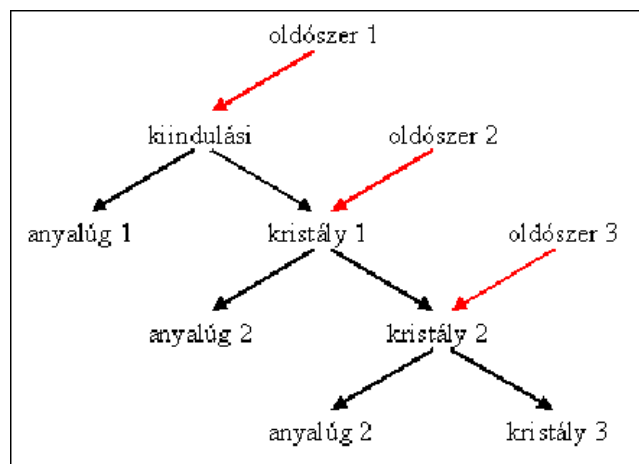
Egyszerű ismételt átkristályosítás: A kristályosítást megismételve egyre tisztább anyagot kapunk. A kinyert anyagot újra és újra átkristályosítjuk, ezzel növelve a termék tisztaságát. E módszer lényegét a 4.4.2.4.1. ábra mutatja be.

Az elért tisztaság tetszőleges értékig növelhető, de a lépések számával a kihozatal romlik:

$$y = \left(\frac{E_A}{1 + E_A} \right)^n$$

ahol E_A – tisztítási faktor (ld. a 4.4.2.1. fejezetet)

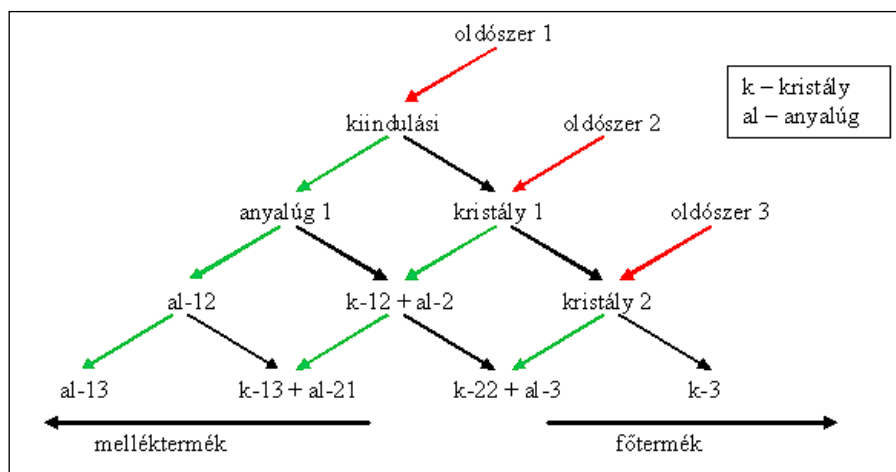
n – a lépésszám.



4.4.2.4.1. ábra: Ismételt átkristályosítás

A kristályosítást lehet adszorpcióval is kombinálni (pl. aktív szén derítés), amely akkor hatékony, ha a szennyeződés jobban megkötődik a szénen, mint a főkomponens.

Frakcionált átkristályosítás: olyan esetekben alkalmazzák, amikor a szennyezés is értékes melléktermék, illetve két hasznos anyagot akarnak elválasztani egymástól. Ma már a nagyléptékű kromatográfiás elválasztások kiszorítják a gyakorlatból. A folyamat elve az 4.4.2.4.2. ábrán látható. Az előbb tárgyalt átkristályosításhoz képest az a különbség, hogy az anyalúgokat is feldolgozzák, bepárolják és újrakristályosítják. A kivált (szennyezett) kristályfrakciót egyesítik a feldolgozás egy másik pontjáról származó anyalúggal, ebben feloldják, és újra kristályosítják. Az ábra piramisszerű felépítésén látható, hogy a könnyen kristályosodó főtermék jobbra halad és egyre tisztább lesz, míg a jobban oldódó melléktermék balra mozog, és az anyalúgokban halmozódik fel.



4.4.2.4.2. ábra: Frakcionált átkristályosítás

Az ábra alapján a módszert kvantitatívan is leírhatjuk, ekkor egy binomiális számsorozat jön ki a frakciók (f) leírására):

$$f(r, n) = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot p^r \cdot (1-p)^{n-r}$$

ahol n – a sorszám (lefelé) 0-tól;
 r – a helyszám (átlóban jobbra le) 0-tól;
 p – a kivált frakció;
 $(1-p)$ – az anyalúgban maradó anyaghányad.

A fenti összefüggés jelöléseit figyelembe véve jó elválasztáshoz a $\frac{P_A}{P_B} \geq 4$ feltétel teljesülése

szükséges. Az ábrából is kitűnik, hogy ez igen munkaigényes művelet, csak nagy értékű termékek előállításánál lehet gazdaságos. Egyes rezolválási eljárásokban, illetve egyes szteroidmolekulák elválasztásánál még alkalmazzák.

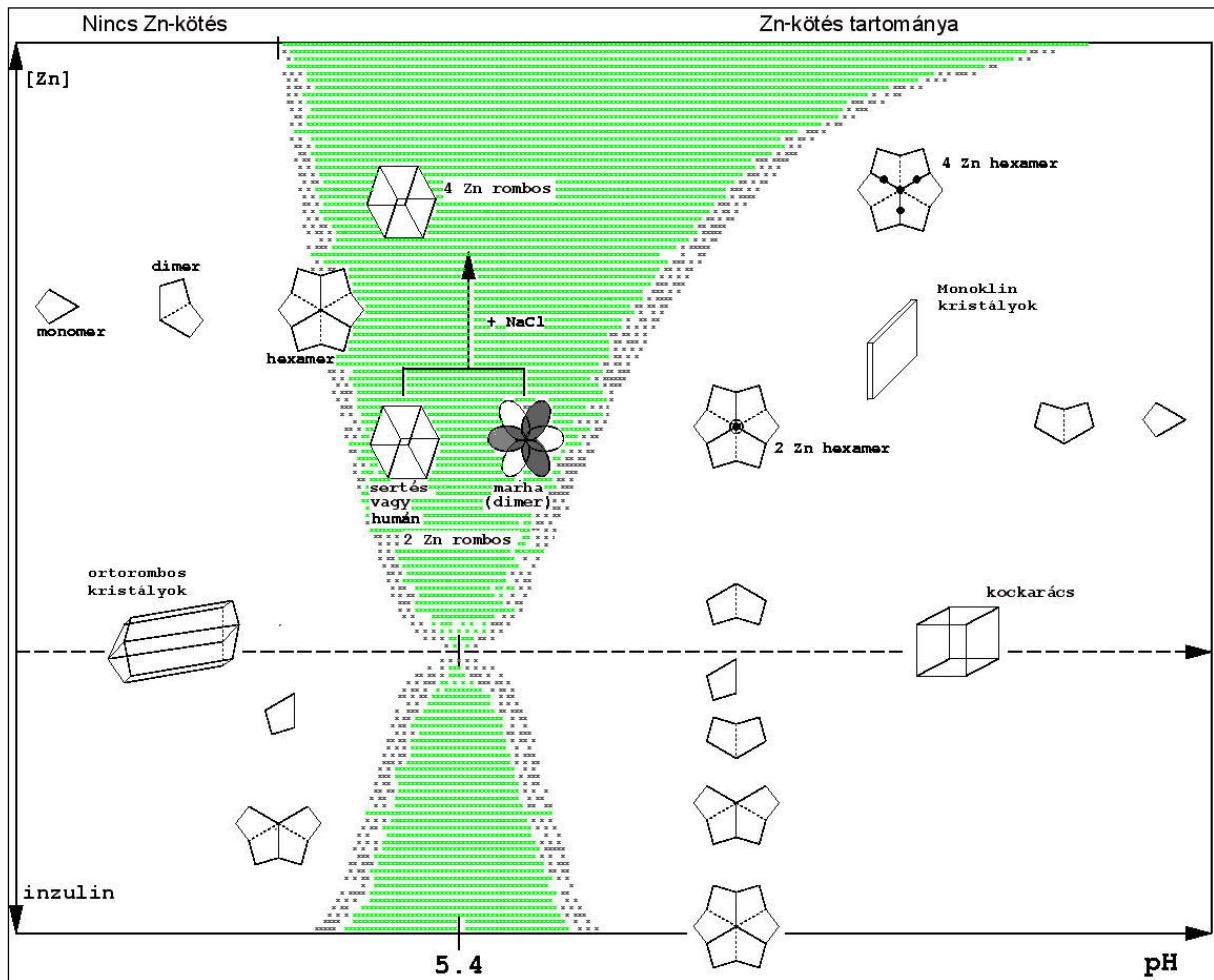
4.4.2.5. Fehérjék kristályosítása

A fehérjék kristályosítása sokkal bonyolultabb, mint a kis molekuláké; hiszen a makromolekulák sokkal nehezebben rendezhetők kristályrácsba, esetükben nem különül el a precipitáció és a kristályosítás.

A fehérjék kinyerése általában csapadék formájában is megfelelő, ritkán van szükség kristályos anyagra. Kivétel és ellenpélda az inzulin, amit cinkionokkal kristályosítva hoznak forgalomba. A fehérjék kristályosítása 10–20 mg/l koncentrációjú oldatból történik. Makroméreteknél a leggyakoribb kicsapószer a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, valamint a PEG (poli-etilén-glikol). A túltelítés kialakítása hűtéssel nagyon ritka, de ez esetben is kivétel az inzulin, amelyet 55 °C-os oldatból lassú hűtéssel kristályosítanak. Az inzulin a közeg összetételétől függően nagyon sokféle alakban képes kristályosodni (4.4.2.5.1. ábra). Néhány tizednyi eltérés a pH-ban már eltérő kristályformát eredményez. Ráadásul a Zn-ionok koncentrációja, pontosabban a cink és az inzulin molaránya is erősen befolyásolja a terméket. A színessel jelölt tartományon belül alakul ki a cinkionokkal képzett rombos kristályforma, ami gyógyszerként forgalomba kerül.

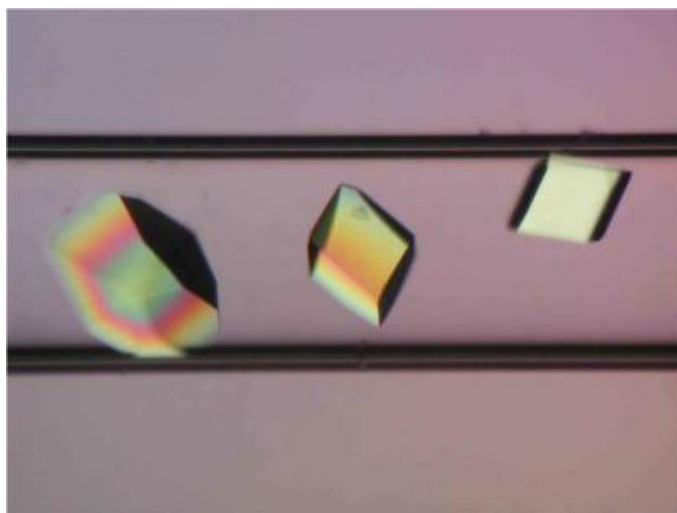
A fehérjék kristályosításának másik célja lehet, hogy röntgendiffrakciós vizsgálatokhoz néhány nagyobb kristályt állítsanak elő. Az ehhez szükséges laboratóriumi módszereknek nagy irodalma van. Mindegyikben közös, hogy nagyon lassan hozzák létre a túltelítést. Ennek létrehozására ugyanazokat az anyagokat használják, mint a kicsapásnál. Azaz pontosan szabályozni, irányítani kell az oldat ionerősségét, hőmérsékletét, pH-ját (az izoelektromos pont elérése), polaritását (szerves oldószerrel) és ezek lassú változtatását. A lassú változások miatt a kristályosítás sokszor napokig, sőt hetekig is eltarthat. A parányi mennyiségek miatt ezeket a kísérleteket cseppnyi térfogatokban, mikroszkóp alatt

végzik. A lassú és fokozatos változások előidézésére gyakran használnak természetes folyamatokat, így diffúziót, kapillárisban vagy gélben, illetve gőzdiffúziót.



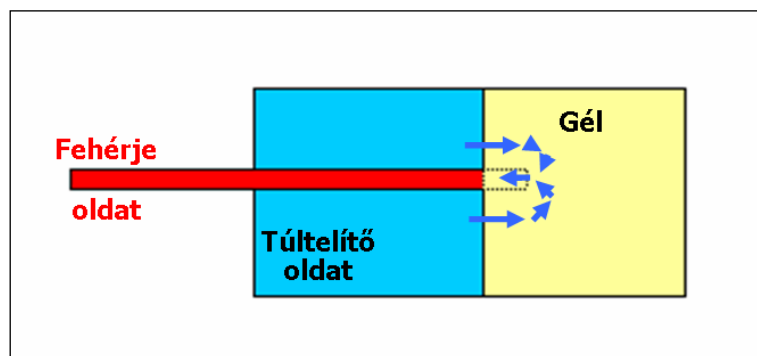
4.4.2.5.1. ábra: Az inzulin kristályosítási lehetőségei

1. dialízis: akkor alkalmazható, ha a fehérje már kis ionerősségnél kiválik. Legegyszerűbb kivitelezése, ha sóoldatot borító dializáló membránra egy csepp fehérjeoldatot cseppentünk. A túltelítés fokozatosan jön létre.
2. Ellenirányú kapilláris diffúzió A fehérje oldatát kapillárisba szívatják fel, aztán ennek végét a kicsapószer oldatába merítik. A két oldat lassú, diffúziós keveredése fokozatosan változtatja meg az olthatóságot (4.4.2.5.2. ábra).



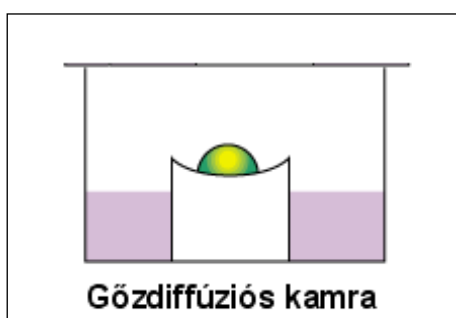
4.4.2.5.2. ábra: Fehérjekristályok kapillárisban

3. Géldiffúzió: a fenti elvet módosíthatjuk olyan módon is, hogy a kicsapószer bejutását a kapillárisba tovább lassítjuk azzal, hogy egy gélrétegen kell átdiffundálnia (4.4.2.5.3. ábra).



4.4.2.5.3. ábra: Géldiffúziós tútelítés

Gőzdiffúzió: a fehérjeoldat egy cseppjét oldószergőzzel telített kamrába helyezik. A víz és az oldószer (pl. aceton) a légtéren keresztül átdiffundálnak a másik folyadékba, a koncentrációk lassan kiegyenlítődnek, ennek során megvalósul az oldószeres tútelítés.



4.4.2.5.4. ábra: Gőzdiffúziós kamra

5. A VÉGTISZTÍTÁS MŰVELETEI

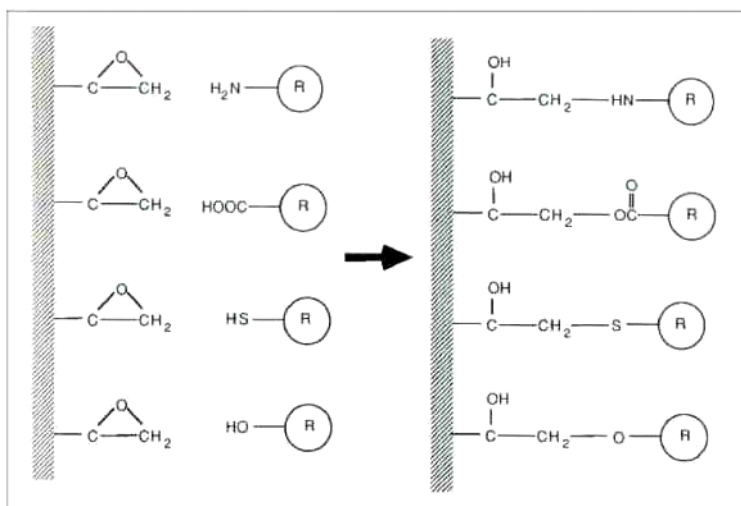
5.1. Affintechnikák

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 elérik 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 (5.1.1. táblázat).

5.1.1. táblázat: Affinkölcsönhatásra képes reakciópartnerek

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

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 (5.1.1. ábra).

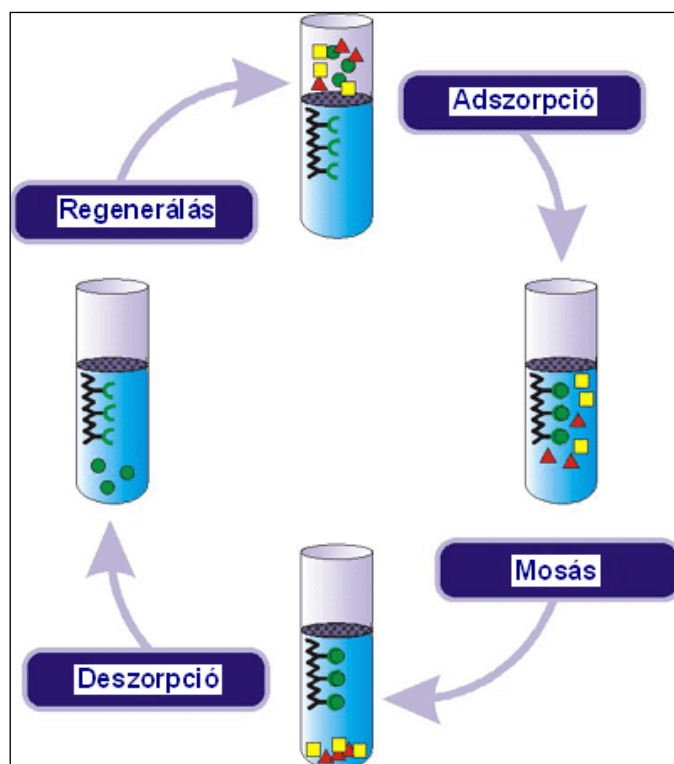


5.1.1. ábra: Különböző ligandumok kötése epoxihordozóhoz

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. A 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 fehérjeoldatot kivezetjük a rendszerből, a ligandumok pedig újra felhasználhatók (5.1.2. ábra).



5.1.2. ábra: Az affinválasztások jellemző lépései

5.1.1. Affinkromatográfia

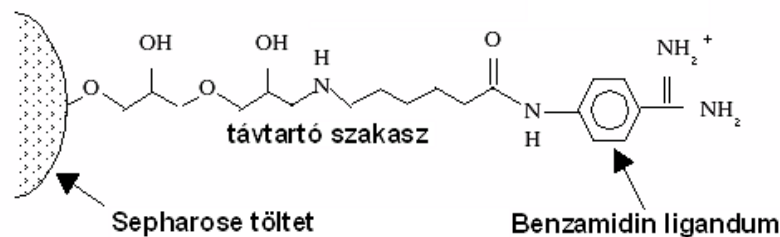
Az elv klasszikus – és hosszú időn keresztül egyedüli – alkalmazása az affinkromatográfia volt. 1968 óta, amikor az affinkromatográfia kifejezést először használták, sok száz különböző ligandumot azonosítottak és alkalmaztak kromatográfias célokra. Még ma is az affinkölcsönhatáson alapuló eljárások nagyobb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

Egy szakirodalmi áttekintés szerint az affinkromatográfia a második legelterjedtebb kromatográfias technika az ioncsere után. Gyakran mindkét módszer szerepel a közleményekben, így a gyakoriság elérheti a 60%-ot is. A széles körű 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 szerkezetanalógok 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 triazinvázat 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. Felléphet 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 (5.1.1.1. 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).

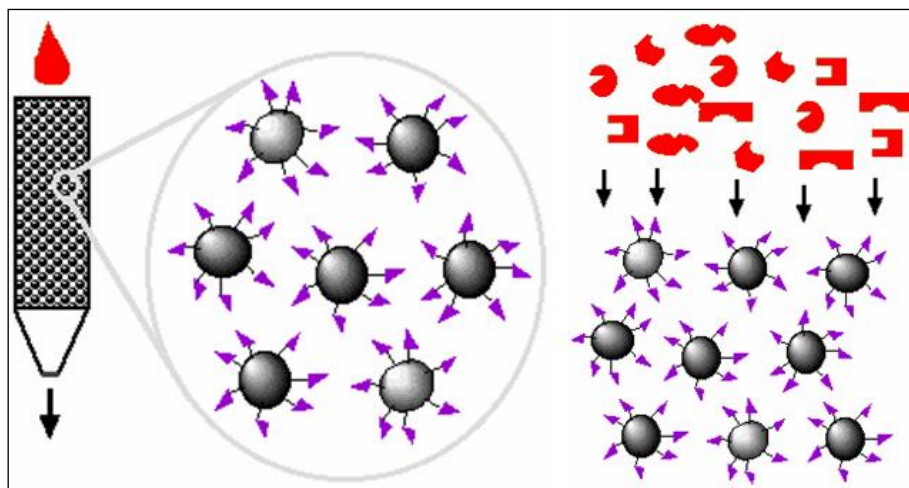
A diffúzió sebességmeghatározó voltát a töltet porozitásának megfelelő kialakításával lehet megszüntetni. A fehérjemolekulák viszonylag nagy mérete miatt a töltet pórusméretének is kellően nagyoknak és egyenletesnek kell lennie. Ez egyúttal megakadályozza azt is, hogy az affinkromatográfia mellett kizárásos 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 többit 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 affinkomplekképzés, ami a sztérikus és diffúziós korlátok megszüntetését jelenti. Jelentőségét még fokozza az egyszerű léptéknövelés.

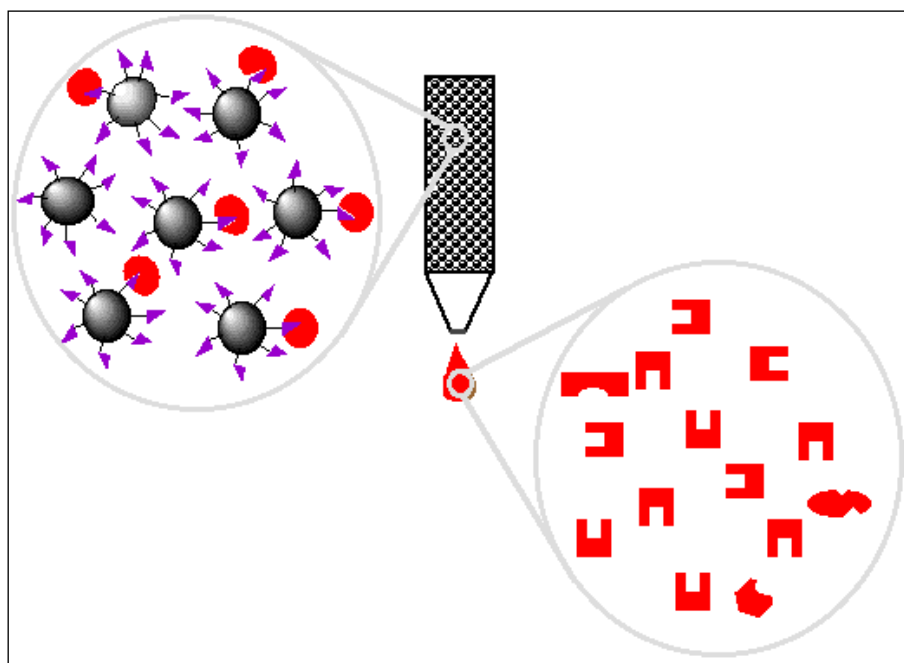
A tárgyalt műveletek tehát megtartják az affinkölcsönhatás nagy specifitását, ugyanakkor az elválasztás gyors, léptéknövelhető és könnyen irányítható. Nagy előnyük továbbá, hogy a feldolgozási sorban a végső tisztítás helyett már az első, elválasztási szakaszban is alkalmazhatók. Az alkalmazási példák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

A hagyományos affinkromatográfiában a termék szilárd hordozóhoz kovalens kötéssel rögzített ligandumhoz kapcsolódik (5.1.1.2. ábra).



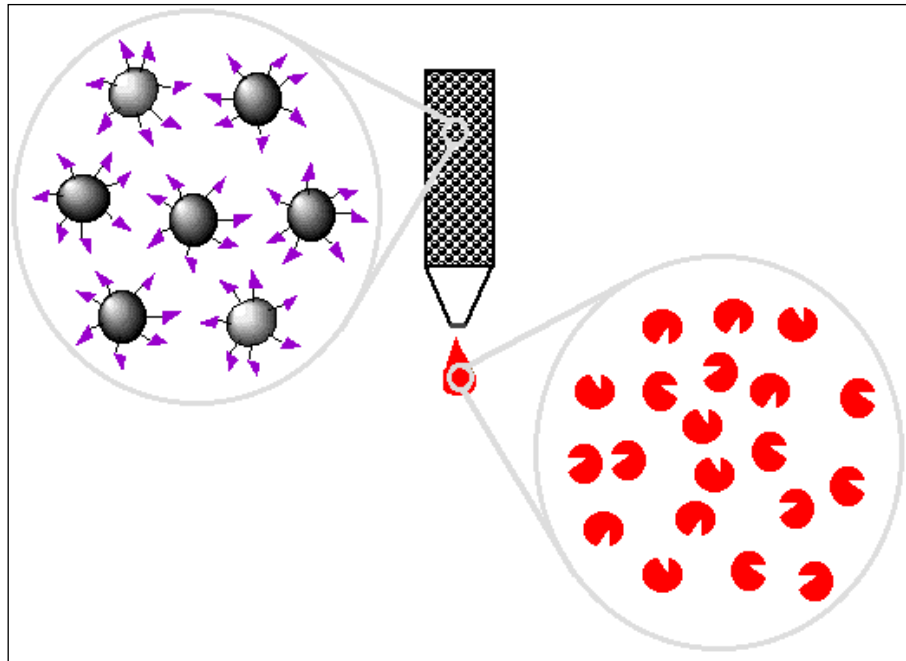
5.1.1.2. ábra: Affinkromatográfia-1

Az oldatban jelen lévő egyéb szennyező fehérjék kötődés nélkül áthaladnak a kolonnán (5.1.1.3. 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 (5.1.1.4. 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 a 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. videó). A festékkromatográfiáról részletesen az [5.1.5. fejezetben](#) esik szó.



5.1.1.1. videó: 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 affinadszorpció) értékelését tömören összefoglalva a következőket állapíthatjuk meg:

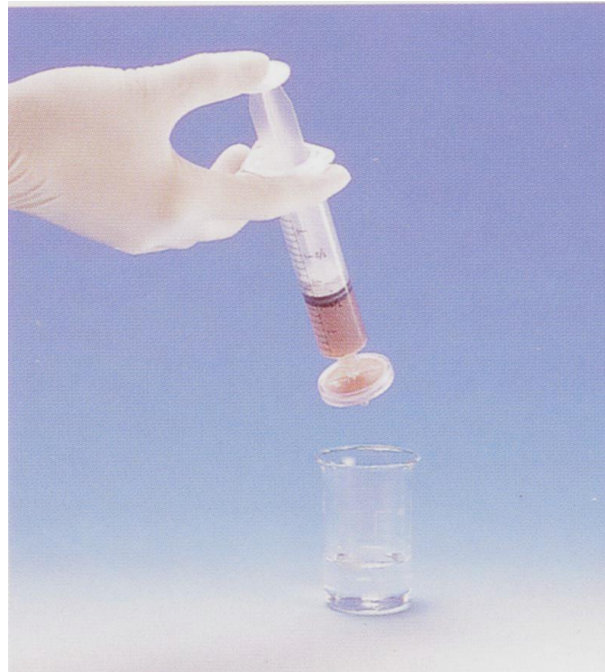
Előnyök:

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

Hátrányok:

- lassúság – a nagyméretű fehérjemolekulák 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 (5.1.1.5. 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.

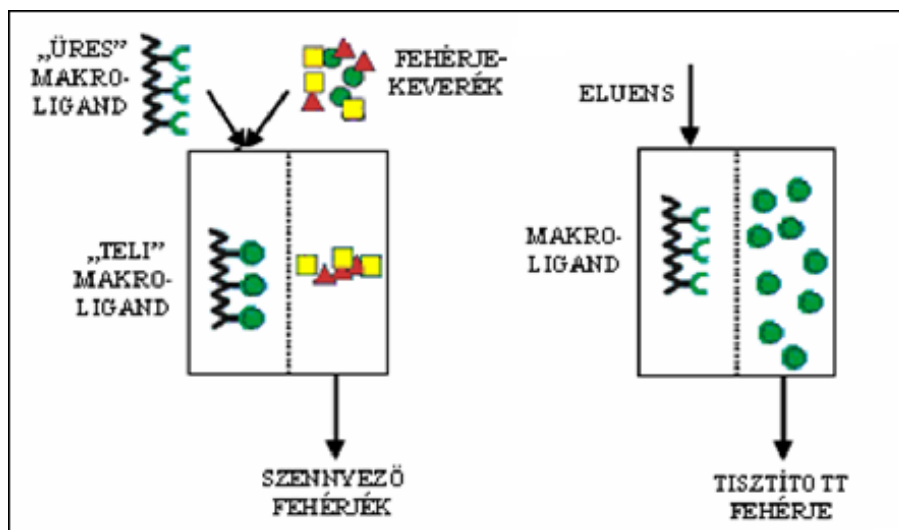


5.1.1.5. ábra: Festékligandumokkal borított szűrőmembrán

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 fehérjeoldattal 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 (5.1.2.1. 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 molsúlyú, 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 levet 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 szénhidrátláncain 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 (Ms = 102 kD) és az előlt sejtek (átlagos átmérő 5 µm) 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 keményítőszemcsék felületére. A feltárt élesztősejttömegből 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). Makroligandként 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 µm 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 vízoldható akrilamid polimerhez kötött ligandumok jobban beváltak. A beépített ligandumok mennyiségére vonatkoztatva a megkötött tripszin aránya nagy (120 g/g), ez gyakorlatilag százszázalékos kihasználást jelent, és jóval nagyobb érték, mint amit szilárd hordozóval értek. Ráadásul a homogén fázisban végbemenő reakció sokkal gyorsabb, a komplexképzés gyakorlatilag pillanatszerű. A tripszin–ligand kötődés 0,5 M argininoldattal 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 elektroforetikusán homogénnek bizonyult.

Nagy lendületet adott a további fejlesztéseknek, hogy az affinszűréssel jó elválasztás és nagy kihozatal érhető el, valamint az, hogy tisztítatlan és nagy viszkozitású oldatok is feldolgozhatók. Ez a technika a fermentálé 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 paramétereiket és hosszabb élettartamra számíthatunk. Ezeknek a feltételeknek elsősorban a szintetikus ligandumok felelnek meg, a biokémiai eredetű ligandumok általában érzékenyebbek és élettartamuk rövidebb.

Az affinszűrés 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.

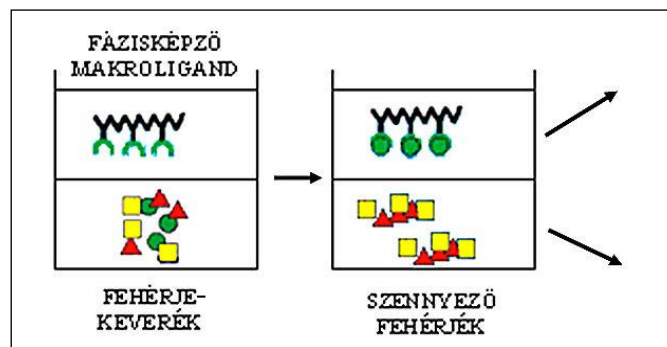
Külön ki kell emelni, hogy az eltömődés a biológiai levekkel végrehajtott membránműveletek egyik legnagyobb veszélye. Az affin-ultraszűrés esetében külön figyelembe kell venni a makroligand és a membrán esetleges kölcsönhatását. A makromolekulák adszorbeálódhatnak a membránszűrő felületére, ezáltal sajátos áteresztési paraméterekkel rendelkező, ún. dinamikus membrán jön létre, aminek következtében a fluxus jelentősen csökken. A probléma más membránműveleteknél 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. Affinextrakció

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 (5.1.3.1. ábra).

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.



5.1.3.1. ábra: Az affinextrakció elve

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. Ez 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 ligandumkoncentráció 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 jelen lévő sók általában csökkentik az affinmegoszlás 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 affinmegoszlás 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 affinextrakciója nem tervezhető pontosan, de a fenti szempontok figyelembevételével tervezett, módszeres kísérletekkel optimálható.

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 sóadagolás. Az elválasztott makroligandos fázishoz minimum 15% szilárd foszfátsót 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, sóoldatfázisban 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 affinkölcsönhatás 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 szeparátorcentrifugák 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 affinextrakcióját 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 sejtörmelékét 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 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) kapcsolnak, az így létrehozott makroliganddal a kihozatal 92%-ra növekedett.

Humán vérszérumból az albuminfrakció 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 pékélesztő (*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 kapcsolnak, ennek segítségével 450 000 egységnyi formiát-dehidrogenáz enzimet nyertek ki.

5.1.3.3. Lehetőségek és korlátok

Az affinextrakció 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 makroligandok jelenleg a kereskedelemben nem kaphatók, előállításuk az alkalmazó feladata. Beszerezhetőek viszont olyan szubsztituált polimerek, amelyekhez egyszerűbben kapcsolhatók 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. Affinkicsapás

Az affinkicsapás során a szelektív ligandum–fehérje kölcsönhatást arra használják fel, hogy a létrejött komplex magától, vagy enyhe külső behatásra kicsapódjon, ezáltal a bonyolult fehérjeelválasztási probléma szilárd–folyadék fázis-szétválasztási műveletté egyszerűsödik. A megfogalmazott feladat két, elvileg különböző úton valósítható meg. Az egyik út két, megfelelő hosszúságú molekulánccal 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 affinprecipitációnak nevezik azt az eljárást is, amelyben az oldott fehérjék gélben mozognak koncentrációgradiens (diffúzió) vagy elektromos tér (elektroforézis) hatására, ahol is affinkölcsönhatásra képes partnerrel találkozáva kicsapódnak, a mozgás megáll, és az így létrejött zónák festési eljárásokkal láthatóvá tehetők. 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 szterikus 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 kosubsztrát) befolyásolják egymás aktivitását. Tejsav-dehidrogenáz esetében pl. a szubsztrát (piruvát) jelenlétében a ligandum kötés nagyságrendekkel erősebbé válik.

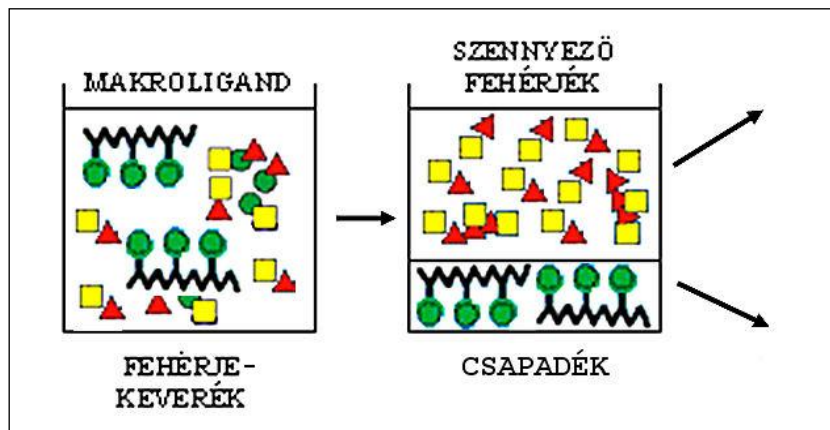
Fontos paraméter a ligandum–kötőhely arány is. Elvileg a sztöchiometriai egyenlőség esetén maximális a csapadékképzés, a gyakorlatban a sok alegységből álló enzimeknél (pl. glutamát-dehidrogenáz (GDH), amely hexamer) már jóval kisebb mennyiség is elegendő. A kicsapódott komplex megbontására a szabad 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 legföljebb 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 színezékmolekulát kapcsoltak össze, hanem p-amino-benzolszulfonsav csoport bevitelével (szintén nukleotid-analóg) alakították ki a második ligandumként működő szerkezetet. A NAD-dependens enzimek közül vizsgálatok folytak a már említett GDH kicsapására is. Lektin jellegű bis-ligandumként alkalmazható az N,N'-bis-3-(dihidroxi-boril-benzil)-adipamid. A bórsavvegyületek komplexképzésre hajlamosak a szénhidrátok vicinális hidroxil csoportjaival.

5.1.4.2. Affinkicsapás heteropolifunkciós ligandumokkal

A módszer alapja egy kettős tulajdonságú makromolekula. Az egyik funkciója az, hogy affinkölcsönhatásokra 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 (5.1.4.2.1. 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 affinkicsapás legnagyobb előnye a gyorsaságában rejlik, ami a nagyobb léptékeknél szembetűnő. 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 kolonnaátmérő 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 kromatográfias 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 affinkölcsönhatás 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

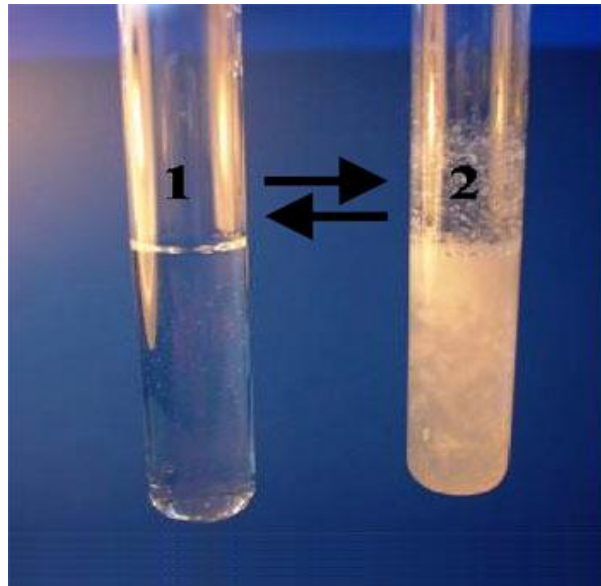
A fehérjefeldolgozásnál a keresett enzim moláris koncentrációja általában nagyon kicsi, sokszor a 10^{-5} -t sem éri el. Ennek ellensúlyozására a teljes enzimmennyiség megkötéséhez nagy ligandumkoncentrációra lenne szükség, ennek beállítása azonban nehézségekbe ütközik. A hordozó makromolekulára csak korlátozottan lehet ligandumokat felvinni, az össztömegnek 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. Affinkölcsönhatásoknál ilyen erős kötődés egyáltalán nem ritka.

A kicsapás körülményei Az affinkicsapás 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 vízoldható 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. Aminocsoportjai 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 vízoldható polimer rendszer precipitál: a poli-(N-izopropil-akrilamid). A kritikus hőmérsékletküszöb 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 kicsapathatók, 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 kisózást önmagában sehol sem alkalmazták. Részletesen vizsgálták viszont a poli-(N-izopropil-akrilamid) viselkedését a hőmérséklet-változás és a sókoncentráció függvényében. Megállapították, hogy minden százaléknyi 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, keresztköteket létrehozó ágensek alkalmazása. A ligandumokat hordozó polimerlánc kölcsönhatásba léphet más molekulákkal is, ami térhálósodáshoz és ezáltal csapadék-képződéshez 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 affinkicsapásnál 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 affinkicsapásos eljárások hatásfoka meglepően jó, a különböző szerzők 80–95%-os visszanyerésről számoltak be.

Lehetőségek és korlátok: Az eddigiek alapján látható, hogy az affinkicsapás 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 affinkicsapás a fehérjék és egyéb biológiai anyagok nagyobb léptékű tisztításában szélesebb körben is

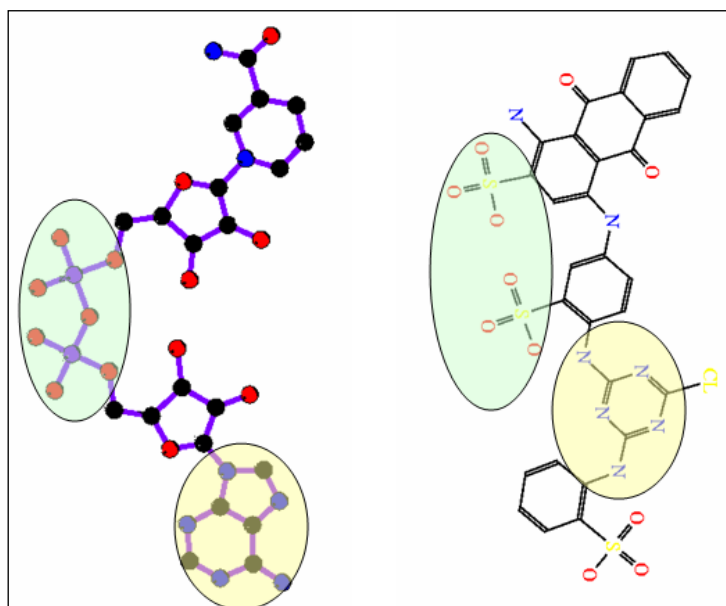
elterjed, de a fejlesztés az affinszűréssel és az affinextrakcióval összehasonlítva mindmáig lassabb, pedig a technikának számos előnye van.

- 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, robusztus, hosszú élettartamú ligandumokat találjanak az elválasztásokhoz.

A ligandumfejlesztés egyik útja a festékligandumok 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 nukleotidanalógok. Szerkezeti hasonlóságuk az adenint tartalmazó molekulákkal jól felismerhető (5.1.5.1. ábra).

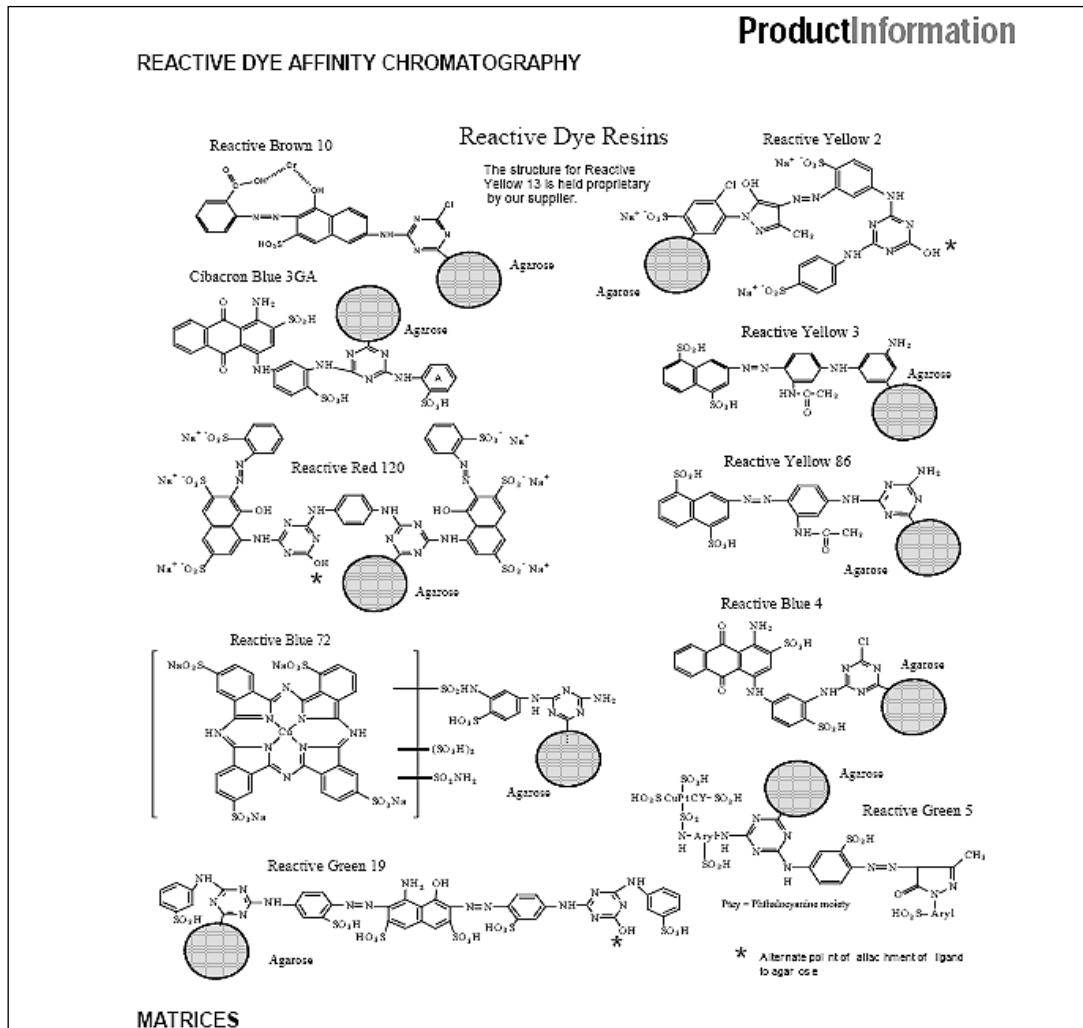


5.1.5.1. ábra: NAD és a Cibacron Blue F3G-A szerkezetének összehasonlítása

Mindkét vegyületben található egy öt nitrogénatomot tartalmazó heterociklusos részlet, valamint két erős savcsoport (a NAD-ban két foszforsav, a festékmolekulában két szulfonsavcsoport).

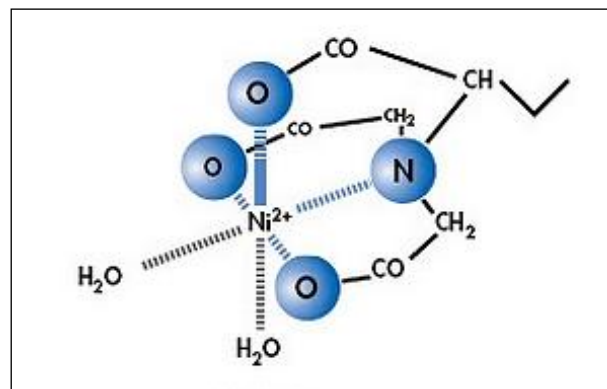
Ezekben a ligandumokon mindazon enzimek megkötődhetnek, amelyeknek NAD (vagy ATP) kötőhelye van, tehát elsősorban az oxidoreduktázok, ligázok, kinázok, foszfortranszferázok, foszfo-diészterázok, nukleinsav szintázok és nukleázok. A festékligandumok nem specifikusak egy bizonyos enzimre, alkalmazásukat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

- a kötődés paramétereinek optimalálásával (pH, ionerősség, koncentrációk, polaritás).
- a megfelelő festékligandum kiválasztásával (a Cibacron sorozat, és a Procion sorozat több tucat különböző molekulát tartalmaz, ezek közül néhányat mutat be az alábbi katalógusoldal, 5.1.5.2. ábra).



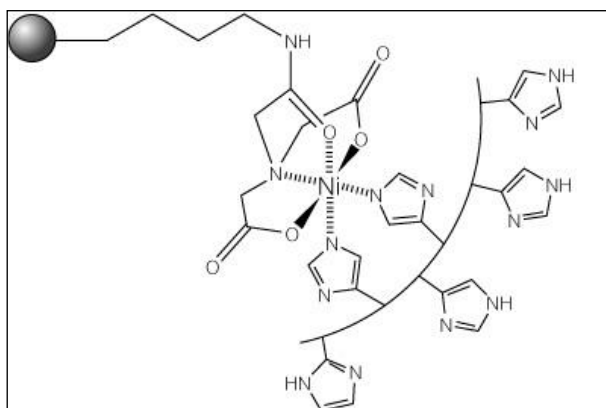
5.1.5.2. ábra: Festékligandumok kémiai szerkezete (katalógusoldal)

A ligandumfejlesztés 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 (5.1.5.3. ábra).



5.1.5.3. ábra: Ni-nitrilo-triacetsav ligandum

A Ni^{2+} ion hat lehetséges kötése közül négygel az imino-ecetsav oxigén- és nitrogénatomjaihoz kapcsolódik, a fennmaradó kettővel képes további kötésekre. Ide kapcsolódhat a hisztidinek nitrogénje (5.1.5.4. ábra).



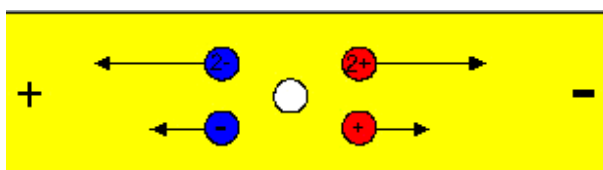
5.1.5.4. ábra: A $(\text{His})_n$ lánc és a Ni ligandum kapcsolódása

A természetben előforduló fehérjék között nem gyakori a poli-His szekvencia előfordulása. A rekombináns fehérjék előállításánál viszont módunk van a fehérjék aminosavsorrendjének szinte tetszés szerinti megváltoztatására (fehérjemérnökség – 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 kromatográfias oszlopon. Ez az eljárás iskolapéldája annak, hogy a fehérjemérnökség 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 emlőssejt – 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 mozgatóerő függ a molekula nettó elektromos töltésétől (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 alakítja 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 mozgékonyág) foglaltuk össze. A mozgékonyág szempontjából fontos jellemző a 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:

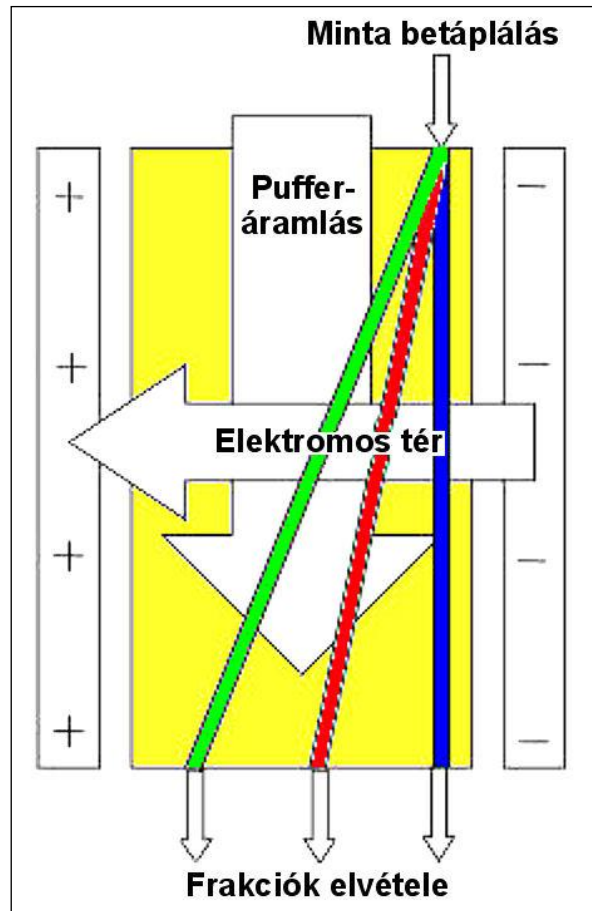
- free flow elektroforézis
- gélelektroforézis
- kapilláris elektroforézis

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 mintakomponensek nettó elektromos töltése a legfontosabb a mozgékonyágot meghatározó tényezők közül.

A „szabadon folyó” kifejezés azt is jelenti, hogy a puffer folyamatosan áramlik, és az elválasztás is folyamatos. Az elválasztandó fehérjeoldatot 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 mintakomponensek töltésüknek megfelelően elmozdulnak az egyik vagy a másik elektród felé (5.2.1.1. 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.

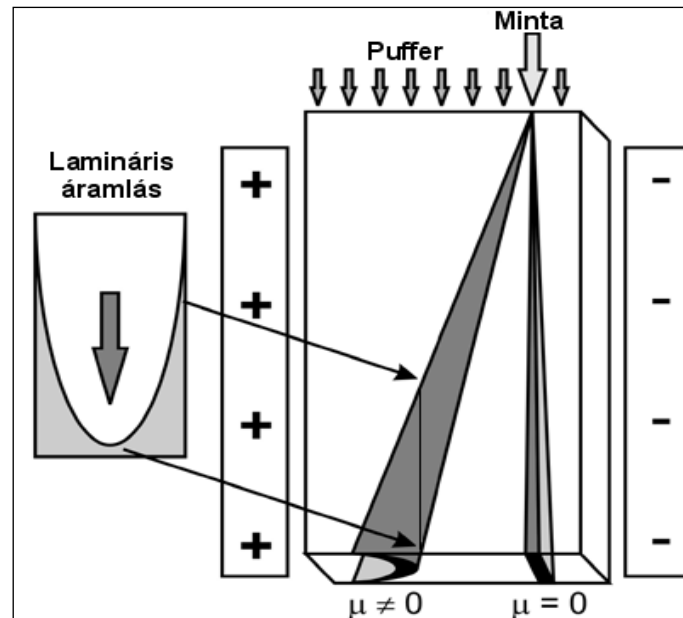
A FFE-technika fejlődése során tisztázták az áramlást befolyásoló tényezőket. A jelenséget leíró dimenziómentes kritérium a Grashof-szám:

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

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

A cella tartalmának összekeveredése akkor fordul elő, amikor a Grashof-szám meghalad egy kritikus értéket. Az FFE-készülékek tervezésekor a d_n csökkentésével a Grashof-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 egy helyben 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 (5.2.1.2. 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 sűrűséggradiensek 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 hőfokkülönbséget, azaz rontja az áramlási képet. A jó elválasztáshoz szükséges térerősség 100–150 V/cm, a kamrára kötött feszültség tehát ezervoltos 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 glicerindagolás ebből a szempontból is előnyös. A diffúziós sávszélesedésben szerepe van még a tartózkodási időnek is. Általában 2–5 perces tartózkodási időt állítanak be, ez alatt 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 kettős réteget alkothatnak, és ez az ionréteg nagy térerősség hatására a katód felé „csúszik”, és vízmolekulákat 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.

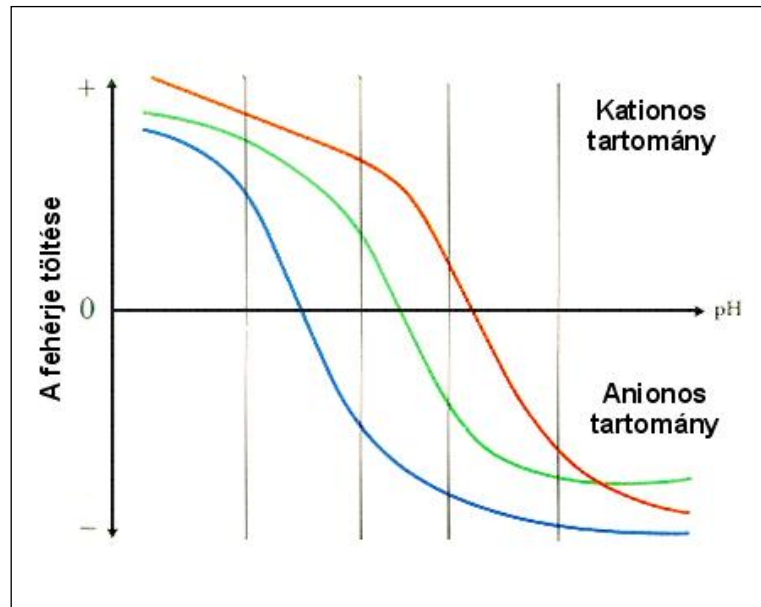
5. A vizsgált fehérje kicsapódása, melyet a szeparációs puffer összeférhetlenségi reakciói, pl. pH, ionerősség és bizonyos ionok okozhatnak.
6. A hordozó pufferben oldott gázok, mely buborékok keletkezéséhez vezethet a szeparációs kamrában. Ezek megzavarják a homogén áramlási képet. Védekezésül a használt puffereket ugyanúgy gázmentesíteni kell, mint a HPLC oldószereket (ultrahanggal vagy hélium átbuborékolásával).
7. A hordozó puffer és a minta közötti sűrűség- vagy viszkozitáskülönbségek a komponensek rossz keveredését és ennek következtében a sávok kiszélesedését okozzák. Célszerű a mintát is a hordozó pufferben – azonos glicerintartalommal – feloldani.

Az 5.2.1.1. táblázat a zavaró hatások következményét és azok lehetséges kiküszöbölését tartalmazza.

5.2.1.1. táblázat: FFE-elválasztás technikai problémái és kiküszöbölésük

Zavaró hatás	Okozott hiba	Tennivalók
Szabad áramlás	Sávkiszélesedés	– a Gr szám csökkentése – a hordozó puffer elektromos vezetéseinek csökkentése
Diffúzió	Sávkiszélesedés	– hőmérséklet csökkentése – a hordozó folyadék viszkozitásának növelése
Elektrooszmózis	Sávkiszélesedés	– a készülék falának bevonása
Adszorpció	Fehérjevesztés	– a készülék falának bevonása – detergensek alkalmazása
Kicsapódás	Fehérjevesztés Sávkiszélesedés	– a pufferrendszer megváltoztatása – detergensek alkalmazása – stabilizátor
A hordozó puffer gázosodása	Áramlás instabilitása	– a hordozó pufferbe N ₂ , He bekeverése – a hordozópuffer vákuumkezelése
Sűrűségkülönbség	Áramlás instabilitása Sávkiszélesedés	– más puffer választása – semleges anyagok adagolása

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 (5.2.1.3. 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.

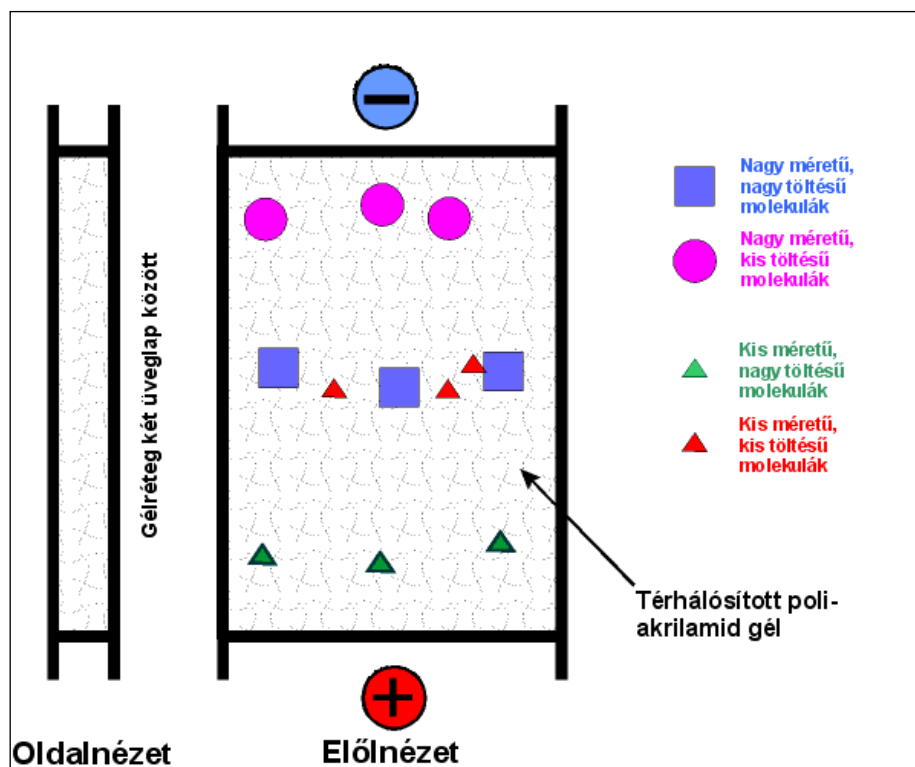
Hátránya ugyanakkor, hogy bonyolult és drága készülék, ami nem léptéknövelhető, egy cella csak 40–200 mg/óra fehérjét képes szétválasztani. A léptéknövelés egyedüli lehetősége, hogy egy kiszolgálóberendezés (tápegység, szivattyúk) több cellát is tud működtetni egy időben.

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 poliakrilamid, illetve agaróz.

A molekulák (jellemzően fehérje vagy DNS) mozgására ugyanazok a már tárgyalt törvényszerűségek hatnak, mint az előzőekben, de a 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, amittől minden fehérje, amelyre fennáll a $\text{pH} > \text{pI}$ 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 (5.2.2.1. 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.



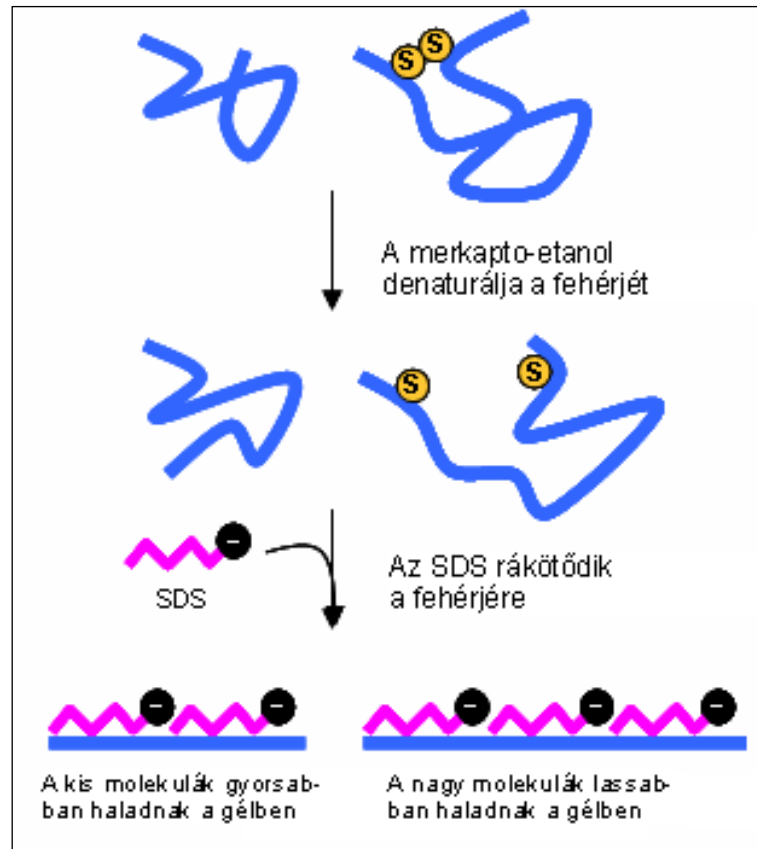
5.2.2.1. ábra: Elválasztás gélelektroforézissel

5.2.2.1. Mintaelőkészítés

A vizsgálandó fehérjéket a géltre való felvitel előtt „maszkírozzák” és „denaturálják”. A minta-előkészítés során beállítják a minta sűrűségét/viszkozitását, glicerin vagy cukoroldat hozzáadásával. A gélben vándorló fehérjék szintelenek, még akkor sem láthatók, ha a gélt 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 fehérjefrakciók előtt.

A denaturálás ebben az esetben azt jelenti, hogy a fehérje molekulaszervezetét rögzítő diszulfid hidakat redukáló tiolvegyületekkel felbontjuk. Erre a célra merkaptó-etanol vagy ditio-treitolt használunk.

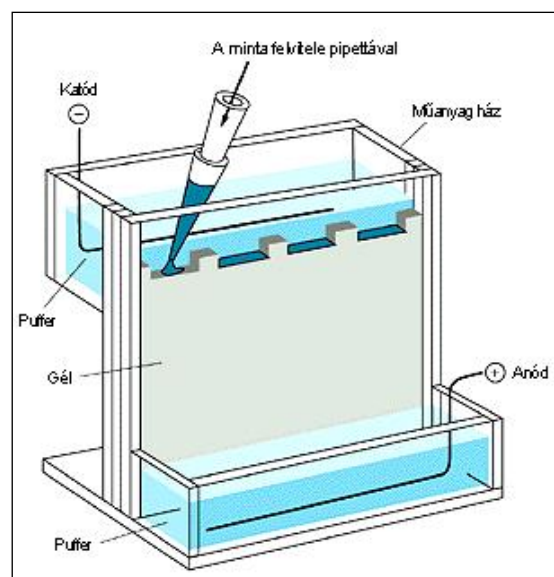
A maszkírozás SDS (nátrium-dodecilszulfáttal) történik. Az SDS anionos detergens, a fehérje-molekulák felületére kötődik. A pozitív ionos csoportokkal ionpárt alakít ki, ezzel leárményolja ezeket. A negatív ionos csoportokat szabadon hagyja, a fehérje felszínén lévő apoláris felületekhez pedig az alkiláncával 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 (5.2.2.1.1. ábra). Mindennek eredményeképpen minden fehérje anionos jellegűvé válik, mindegyik fehérjefrakció 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 elektrolitkádakon keresztül jut el a gél teljes szélességében (5.2.2.2.1. ábra).



5.2.2.2.1. ábra: Géltartó egység

A hajtóerőt szolgáltató térerősséget egyenáramú tápegység biztosítja (50–500 V). A feszültséget a programozható szabályozóegység 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 hűtőegység is, mivel az átfolyó áram hőhatása túlmelegítheti a gélt.



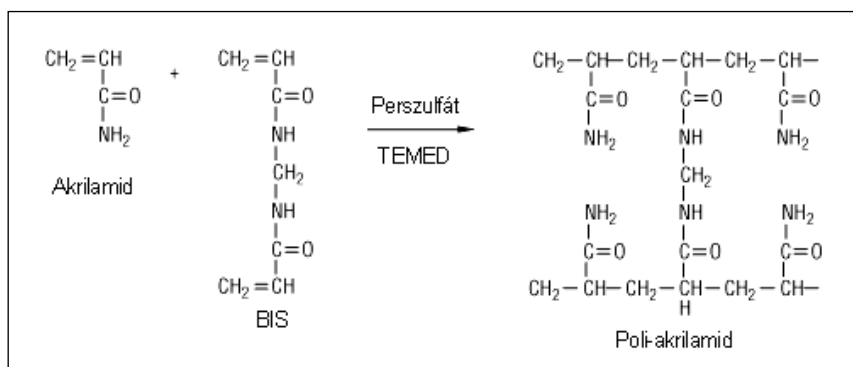
5.2.2.2. ábra: Gélelektroforézis-berendezés (katalógusfotó)

A hőteljesítmény függ a géltbe zárt puffer összetételétől. A koncentráltabb sóoldat jobban vezeti az áramot, a nagyobb áramerősség pedig melegedést okoz. 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 kereszt-kötéseket képez a lineáris láncok között. A bis-akrilamid részarányával (pl. 4, 8, 12%) jellemezhetjük a gél térhálóságát, azaz közegellenállását. A gélelőállításra 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 átbuborékolatással oldhatjuk meg.



5.2.2.3.1. ábra: A poli-akrilamid gél kialakítása

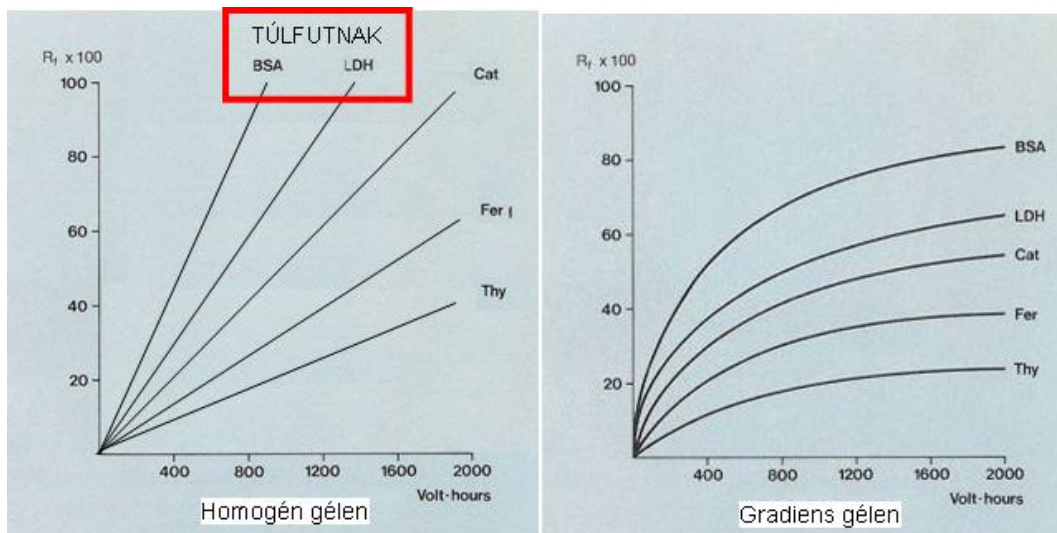
A gél mérete 4*4 cm-től 20*20 cm-ig terjed, szokásos vastagsága 1–5 mm. Használunk ún. preparatív géleket is, ezek vastagsága eléri a 10 mm-t is. A gél tetején ún. mintatartó „zseb”-eket

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 géltre 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 (térhálósítottsága) 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% térhálósítás, a gradiens géleknél két adatot adnak meg, pl. az 5–15%-os gélben a térhálósítás 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 (5.2.2.3.2. 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 géllal.



5.2.2.3.2. ábra: Futtatás homogén és gradiens géleken

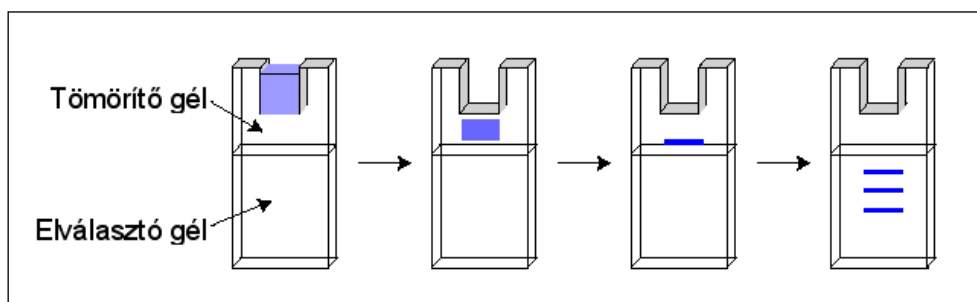
A különböző molekulatömegű fehérjék mozgását a homogén és gradiens gélekben grafikus animáción is bemutatjuk.



5.2.2.3.1. animáció: Elektroforézis homogén és gradiens gélekben

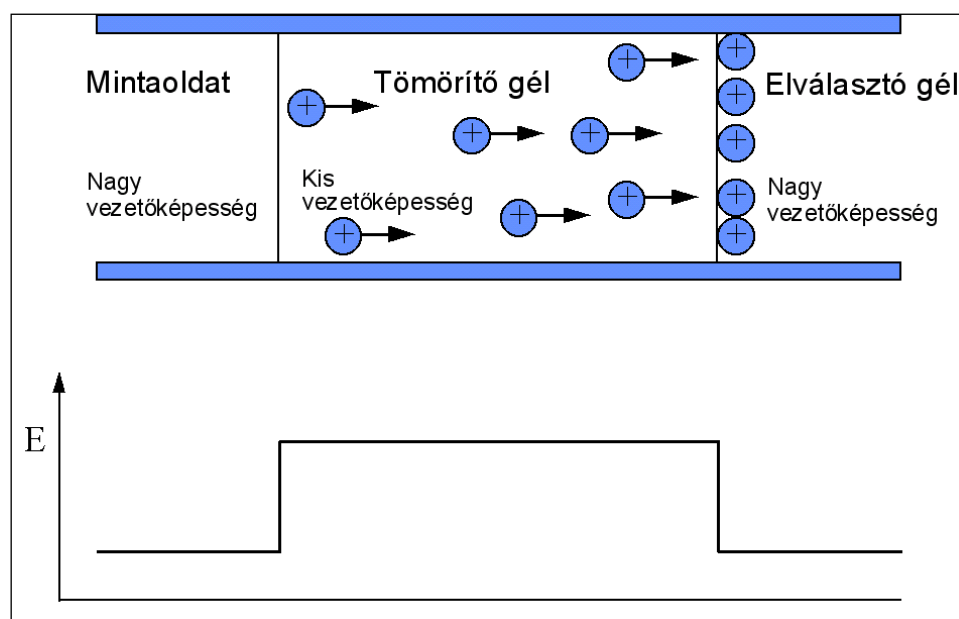
A discontinuous gélekben a sűrűség átmenet nélkül, lépcsősen változik. Ezekben a tényleges futtató gél fölött egy tömörítő gélszakasz van. Célja a viszonylag nagy mintatérfogatban lévő fehérjék

összetömörítése egy keskeny csíkba, hogy azután a futtatás végén is jól elváló, jól észlelhető csíkokat kaphassunk (5.2.2.3.3. ábra).



5.2.2.3.3. ábra: Minta tömörítése discontinuous gélben

A tömörítő gélszakasz annyiban különbözik a futtatótól, hogy a fehérjemolekulák 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 feszültségesés, azaz nagyobb a térerősség (V/cm) is (5.2.2.3.4. 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

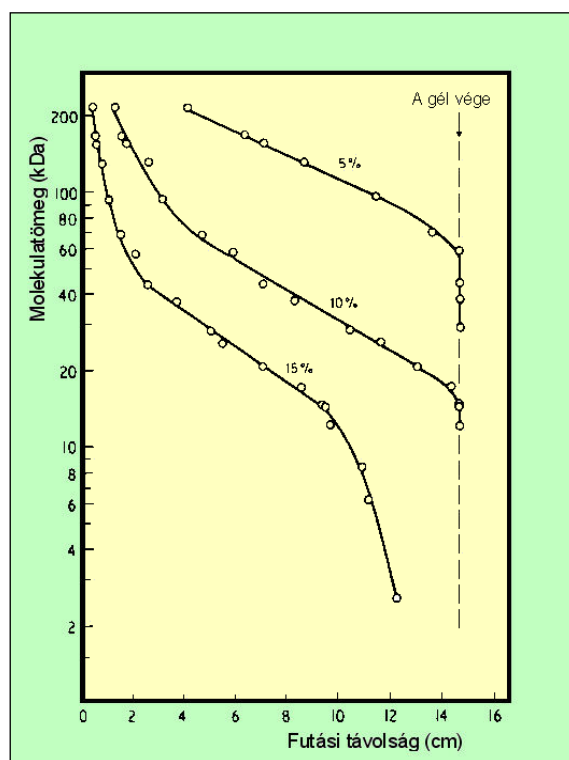
5.2.2.4. A gélek kiértékelése

A futtatás során és végén a mozgó fehérjefoltok szabad szemmel nem láthatók. Ezért is használják a festékmakereket, 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 háttere ettől kitisztul, a megfestett fehérjék sávjai jobban kiemelkednek.

A leggyakrabban használt festékanyag a Coomassie Blue R250. Ez a festék a Bradford-féle oldott fehérje koncentráció mérési módszerhez hasonlóan 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 ezüstoffestés. A módszer kémiai alapja, hogy ezüst-nitrát oldatból a fehérjékre barna fémazüst 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 átvizik a szétválasztott fehérjefrakciókat egy rászorított membránra (pl. cellulóz-acetát, nejlon), majd ezen immunanalitikai reagensekkel mutatnak ki egy vagy néhány kiválasztott komponenst.

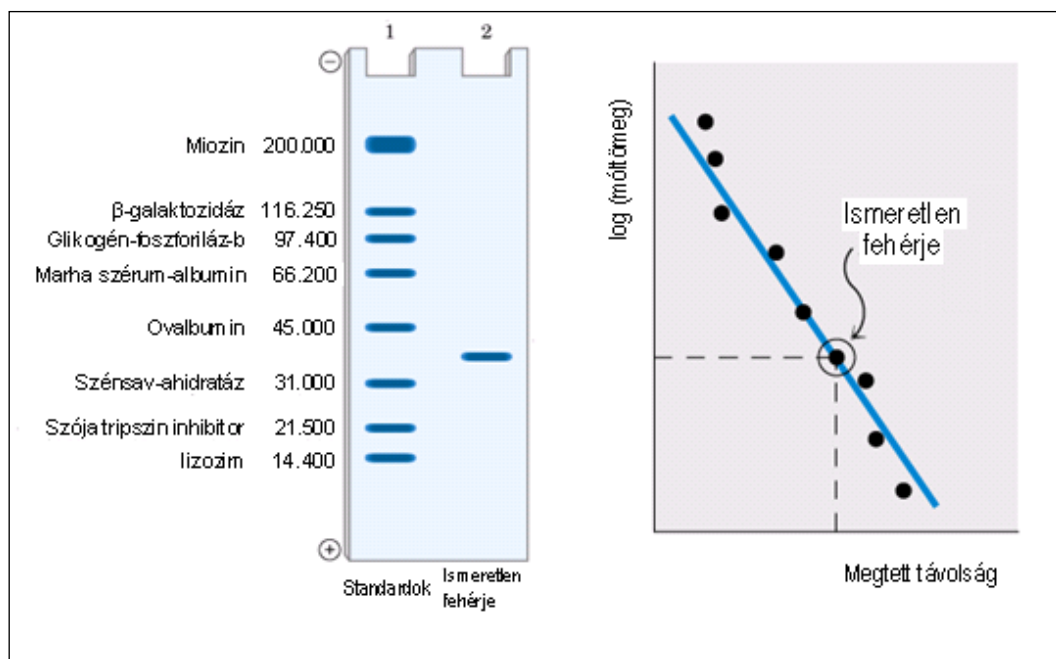
Az előhívott géleket nehézkes tárolni, mert kiszáradnak, repedeznek, felkunkorodnak, azaz néhány hét alatt tönkremennek. Ezért a kiértékeléssel egyidejűleg célszerű lefotózni/beszkenyelni. A tartósság javítható, ha a gélt glicerínbe áztatjuk (nem fog elpárologni, kiszáradni), és átlátszó fóliával borítva kemény lapra szorítjuk. Az így tartósított gél egy-két évig is eltartható. A svéd Phast System 4x4 cm-es géleit diakeretbe lehet foglalni, így kivetíthetők és tartósíthatók.



5.2.2.4.1. ábra: A futási távolság és a molekulaméret kapcsolata

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 (5.2.2.4.1. ábra).

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 sávorsorozat („kalibrációs létra”) segítségével intrapolálva becsülhetjük az ismeretlen fehérje mólsúlyát (5.2.2.4.2. ábra).



5.2.2.4.2. ábra: Molekulatömeg meghatározása kalibrációs sorozat segítségével

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

5.2.3. Kapilláris elektroforézis

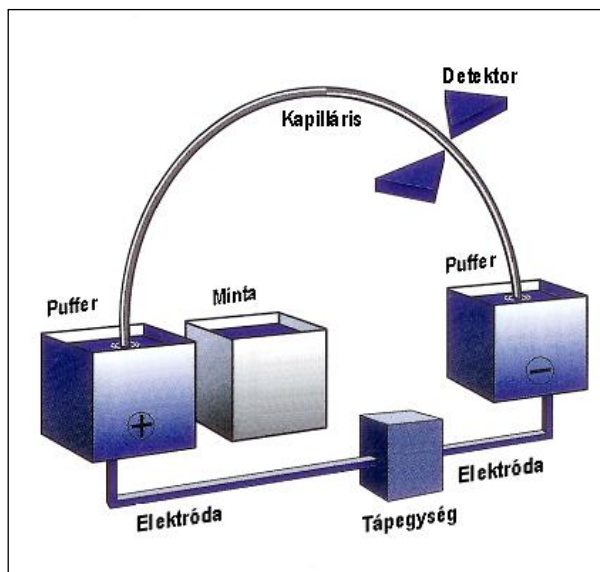
A kapilláris elektroforézisnél az elválasztási közeg egy kis átmérőjű kapillárisban áramló puffer. Az elektroforézist kapillárisban kivitelezve lehetővé válik nagy elektromos térerősség alkalmazása is, mert

- 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 konvekciók, 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 (5.2.3.1. ábra).

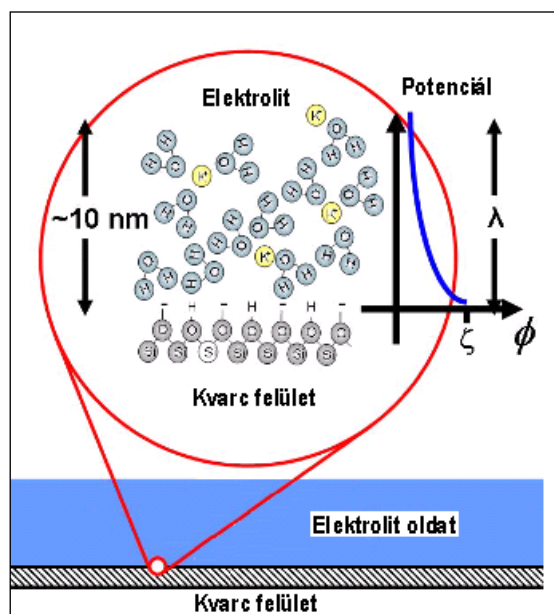
A mintaadagolás úgy történik, hogy a Pt elektródot és a kvarckapilláris pozitív végét egy mechanika egy rövid időre a mintatartóba helyezi. A minta nyomáskülönbség (hidrodinamikusan adagolás) vagy nagyfeszültségű impulzus hatására (elektrokinetikus adagolás) kerül a kapillárisba. Az automata mintaadagolóval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



5.2.3.1. ábra: Kapillaris-elektroforézis készülék felépítése

A kapillaris anyaga az esetek többségében kvarcüveg, mert az átengedi a fényt, így az UV-spektrofotometriás detektorok könnyen a rendszerbe építhetők. A kvarc átterjeszti 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)

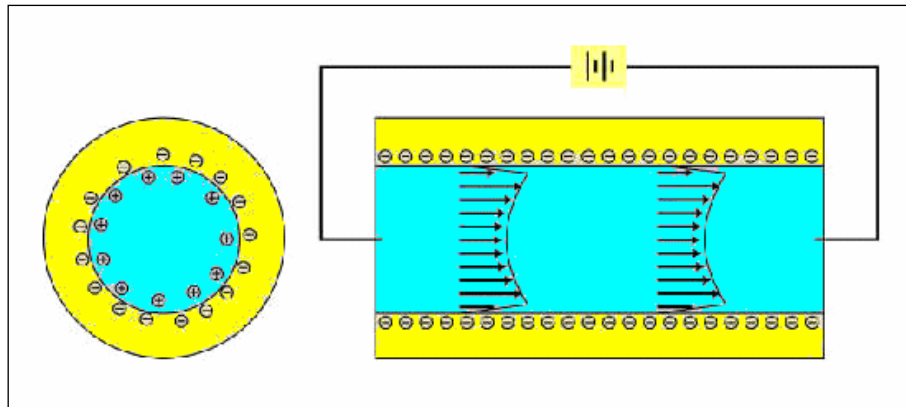


5.2.3.1.1. ábra: A felületi potenciál kialakulása töltött felületen

A kvarc, illetve szilikátüveg kapillaris felülete negatív töltésű ionos csoportokat tartalmaz, melyek vonzzák a pozitív töltésű ellenionokat. A kapillaris fala közelében kettős réteg alakul ki. A kettős réteg egyik pólusa a kapillaris 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 kapillarisra 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

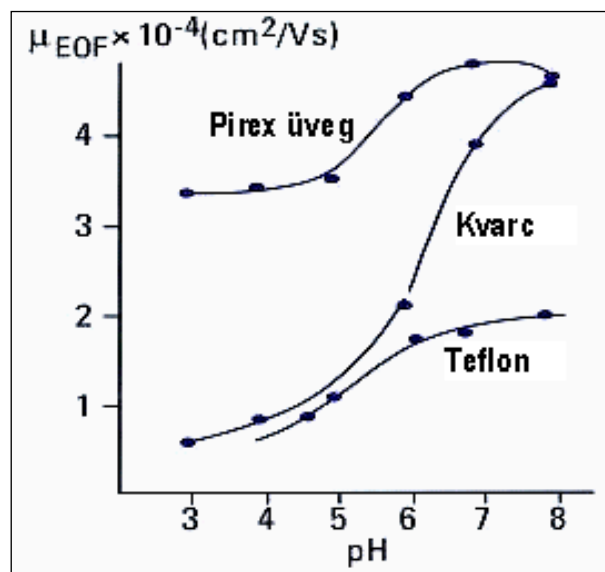
rendelkező részecskékkel együtt az oldószer-molekulák is vándorolnak, s így annak ellenére, hogy az anód- és a katód rész között nincs nyomáskülönbség, áramlás jön létre. Ezt az oldószermozgást nevezik elektroosmotikus áramlásnak (5.2.3.1.1. ábra).

A nyomás hatására létrejövő kapilláris áramlás sebességprofilja parabola alakú, a 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 (5.2.3.1.2. ábra). Emiatt nem jelentkezik a sebességkülönbség által létrehozott sávkiszéledés 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 (5.2.3.1.3. 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 kapillárishoz 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:

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

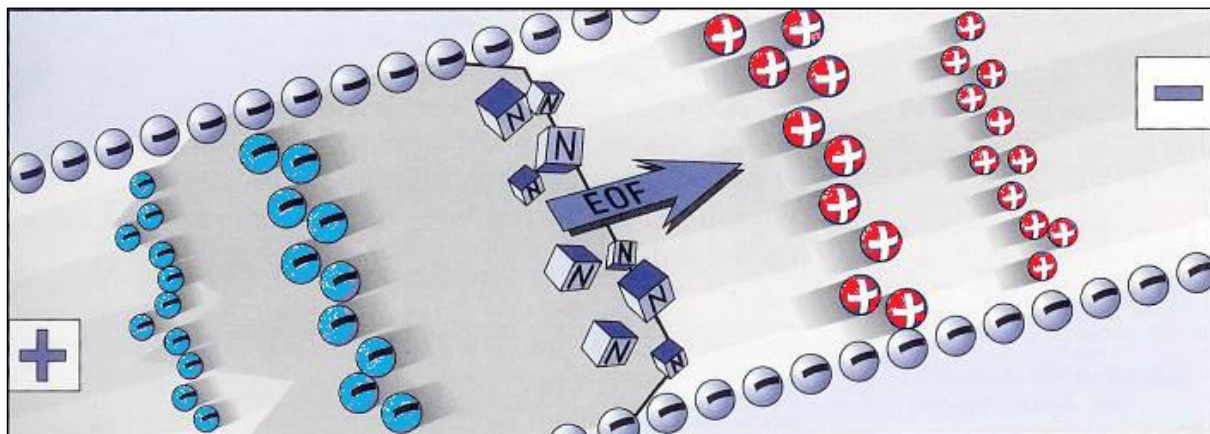
A kapillárisban a töltéssel nem rendelkező molekulák az elektroosztatikus áramlással együtt mozognak, ezeknél nincs elválasztás. Az ionos anyagok viszont vándorolnak a folyadékban. A mozgás mechanizmusa és matematikai leírása pontosan megegyezik a szabad folyású elektroforézisnél leírtakkal, a sebesség:

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

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 oldószeráramlás sebessége összeadódik. A pozitív töltésű részecskék esetében a sebességek összeadódnak, a negatív töltésűeknél, amelyeket a télerő „visszafelé” húz, viszont kivonódik (5.2.3.2.1. 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 retenció időhöz. A valóságban az elektroforézisnél nincs retenció, mert nincs semmiféle szorpciós folyamat, ami megkötné a molekulákat. A kromatográfiánál elképzelhetetlen, hogy valami gyorsabban haladjon, mint az oldószerfront, az elektroforézisnél viszont minden pozitív ion így viselkedik.

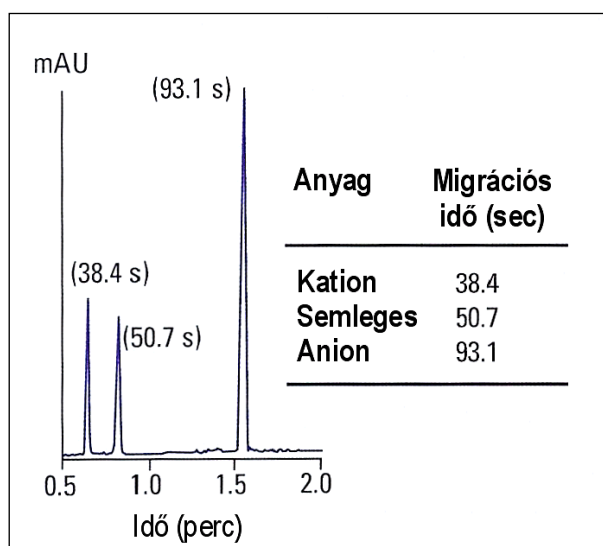
A migrációs idő azt az időtartamot jelöli, mely alatt az oldott anyag eljut a kapilláris elejétől (a minta bevitel) a detektorablakig. Ez a töltött molekula vándorlási idejét mondja meg egy adott semleges molekulához viszonyítva. Az ionos anyag sebességét út/idő formában ($v = l/t$) felírva kifejezhetjük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

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

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 elektroosmotikus 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.

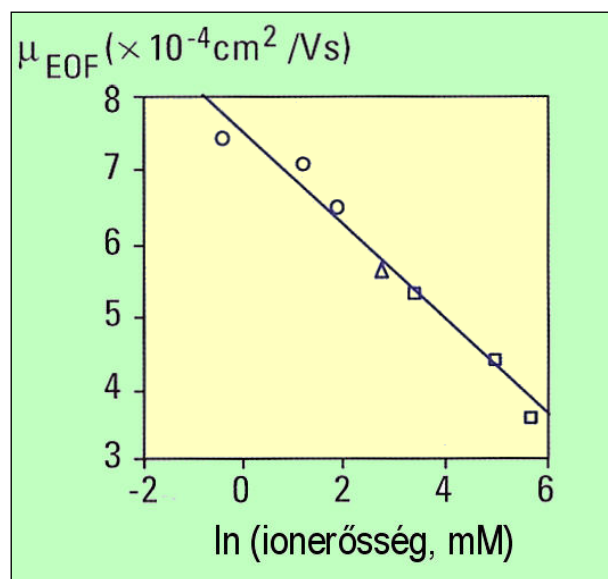
Hőmérséklet: Az elválasztásokat általában 25 °C-on (közel szobahőmérsékleten) végzik. A kapilláris folyadékűtése általában elegendő a Joule-hő elvetésére még nagyobb koncentrációjú puffer és nagy átmérőjű kapilláris esetén is. Túlmelegedés esetén célszerű vékonyabb kapillárisot használni (a hő nagyobb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

Viszkozitás: Mind az elektroforetikus mobilitás, mind az elektroosmotikus 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 hőmérsékletet növelni, de az előzőek 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 (5.2.3.3.1. 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: ionpárképzéssel lefedik a kvarcfelület 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.

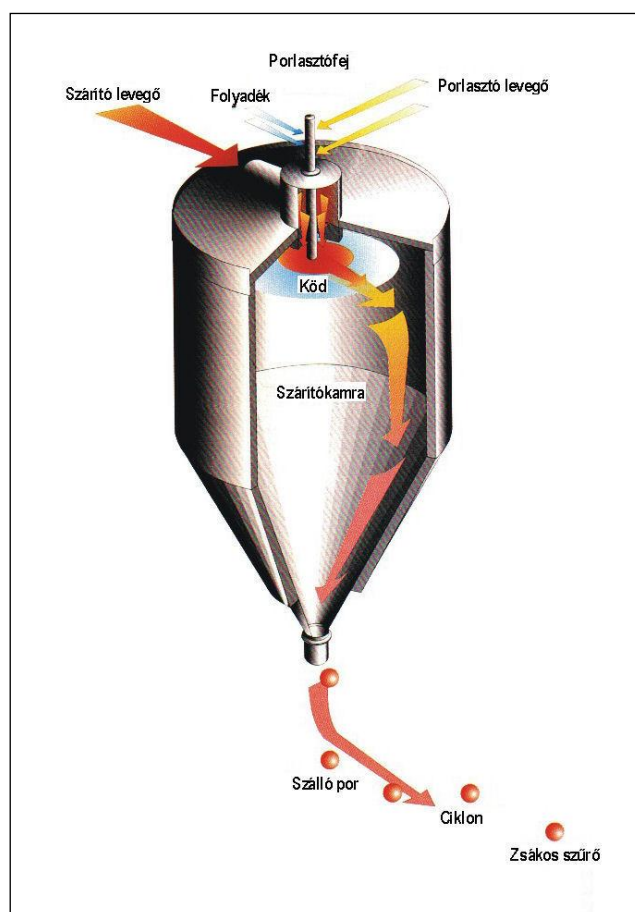
5.3. Porlasztva szárítás

A feldolgozási műveletsor legvégén, amikor már a piaci igényeknek, előírásoknak megfelelő állapotba hozzuk a terméket, kerül sor a szárításra. Szinte minden anyag specifikációja tartalmaz a víztartalomra vonatkozó megkötést. 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 kíméletes, 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 osztják. A porlasztófejen 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 (5.3.1. ábra).



5.3.1. ábra: A porlasztva szárító felépítése

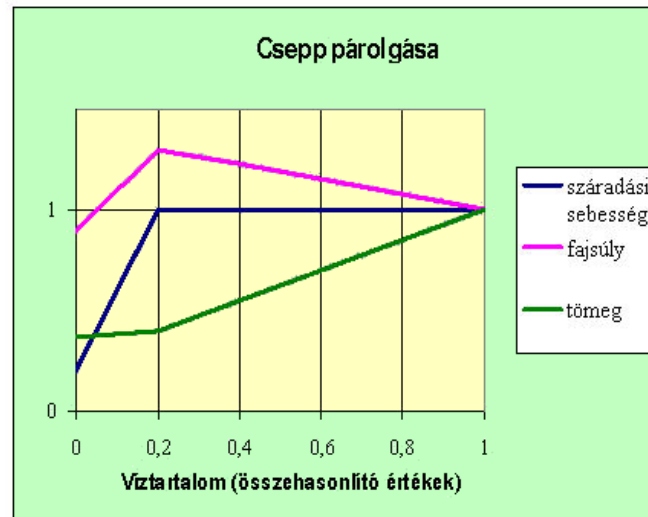
A szárítás különböző módszerei között a porlasztás előnye, hogy:

- az apró cseppekre osztott anyagnak nagy a fajlagos felülete
- emiatt gyorsan elpárolog a folyadék
- emiatt rövid a kontaktidő, az anyag hőterhelése kicsi
- ezáltal kíméletesen 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 párologása két szakaszra osztható:

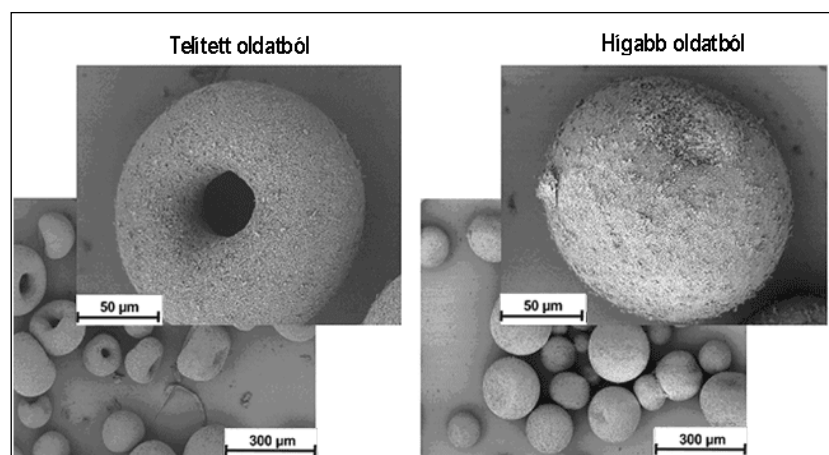
Amíg folyadékfilm borítja a felületet, addig közel állandó a párologási sebesség, a tömeg a vízvesztés miatt csökken, a fajsúly növekszik, ha az oldott anyagok sűrűsége nagyobb, mint a vízé (5.3.2. ábra, összehasonlító értékek).

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

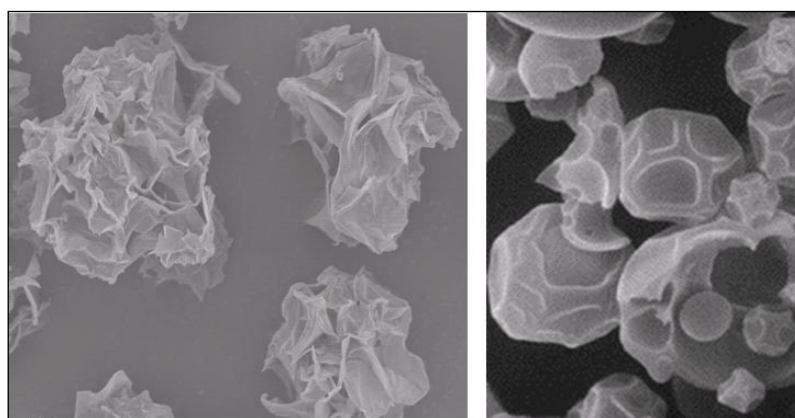


5.3.2. ábra: Fizikai paraméterek változása a párolgás során

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 (5.3.3. és 5.3.4. ábra).



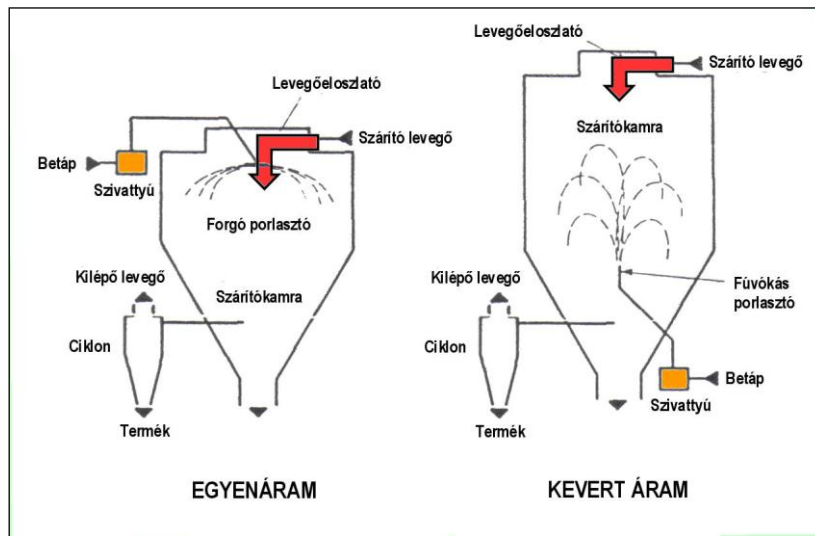
5.3.3. ábra: Bepárolt cseppekből képződő szemcsék



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 (5.3.5. 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 venniük, mert

- méretük miatt ezek párolognak el utoljára,
- ezek ülednek 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 porlasztófejek kialakítása

A szárítás első, és kritikus lépése a diszperzió létrehozása. A folyadékot többféle, különböző elven működő elosztóval vihetjük be a szárítótérbe. A porlasztófejek 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 porlasztónyílás tengelye körül légmag képződik, a forgásban lévő folyadék a nyílásból kilépve kúppalást alakú, összefüggő folyadékhártyát alkot. Állandó sebesség és térfogatáram mellett a kúpos szétterülettel a folyadékfilm vastagsága egyre vékonyodik, és végül cseppekre szakad. A legnagyobb

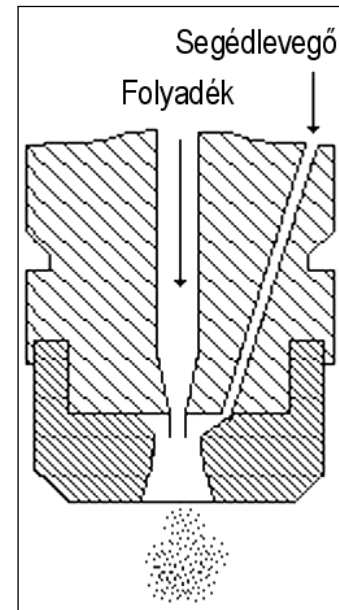
cseppek mérete az anyagi és geometriai jellemzőkön túl a kilépési sebesség négyzetével fordítottan arányos (Bär-egyenlet):

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

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 folyadéknyomást 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 fúvókaátmérő 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 lehetőleg a tárcsa közepére történik, ahonnan a centrifugális erő hatására lefut, vékony filmet képezve. Ha a tárcsán szabálytalan film képződik, akkor 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).

Dimenzióanalízissel levezetve a különböző típusú porlasztófejek működési egyenletei típustól függetlenül egyformává válnak:

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

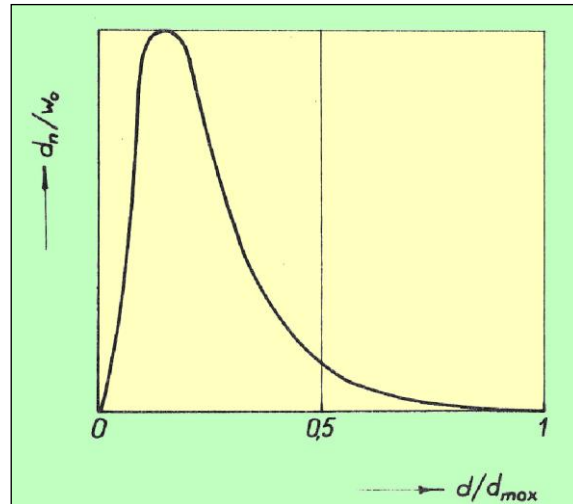
ahol D – jellemző méret (fúvóka átmérő, filmvastagság, rés nyílása), és

$$\operatorname{Re} = \frac{vD\rho_f}{\mu_f}$$

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

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 (5.3.1.4. 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 ($d < 80 \mu\text{m}$, $Re < 0,9$) 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 hőmérsékleten, intenzívebb transzportok esetén korrekciós tényezővel 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 sűrűségkülönbség 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 modellt a Grafton-egyenlet, amely a határreteg vastagságát veszi figyelembe korrekciós tényező gyanánt:

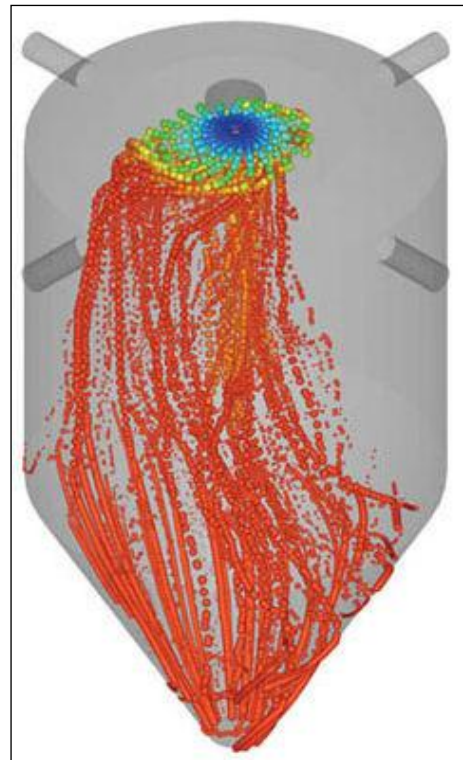
$$\text{Nu} = \text{Sc}^{1/3} \frac{2d}{\delta}$$

ahol d – a csepp átmérője
 δ – a határreteg vastagsága.

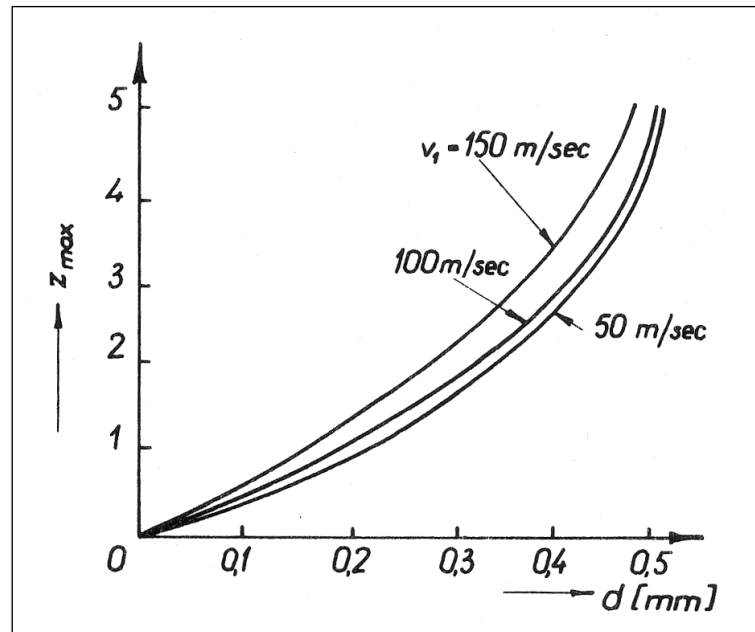
A turbulens áramlások következtében ebben a szakaszban a párolgás sokkal intenzívebb, mint az ülepedésnél. Az egész folyamatra vonatkoztatva sokszor a víz ~90%-a ebben a szakaszban lép ki. Ennek megfelelően a készülék kialakítását, a művelet kivitelezését erre a részfolyamatra célszerű optimálni. A hő és a pára átlépése a csepp felületén csak egy lépése a teljes transzportnak. Ha a csepp nem érintkezik kellő mennyiségű szárítóközeggel 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 szárítótorny 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 5.3.2.1. 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 fűvókás 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, fékezőhatást erősíti. A két hatás eredőjeként a fékezési szakasz hossza közel négyzetesen függ a csepp átmérőjétől (5.3.2.2. ábra).



5.3.2.2. ábra: A cseppátmérő hatása a fékezési szakasz hosszára

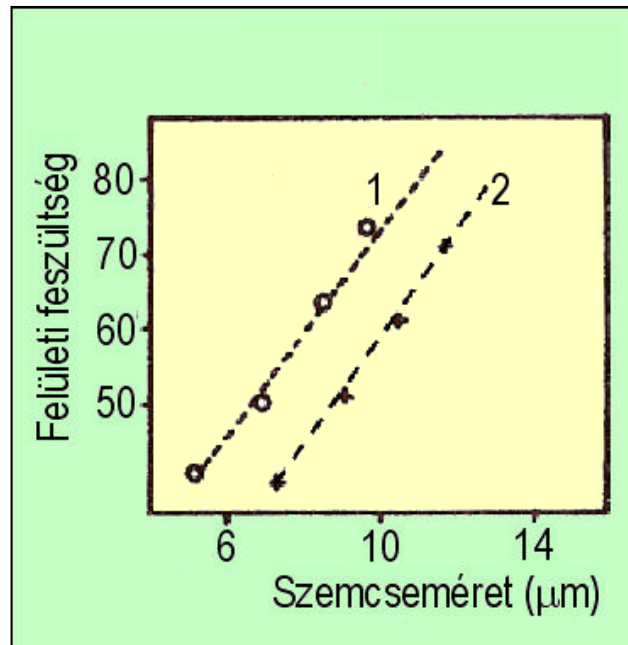
Tehát ennél a megközelítésnél is a legnagyobb átmérőjű cseppre kell méretezni, ennek röppályájához kell igazítani a készülék sugarát.

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 gyakoriságfüggvényével. 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.

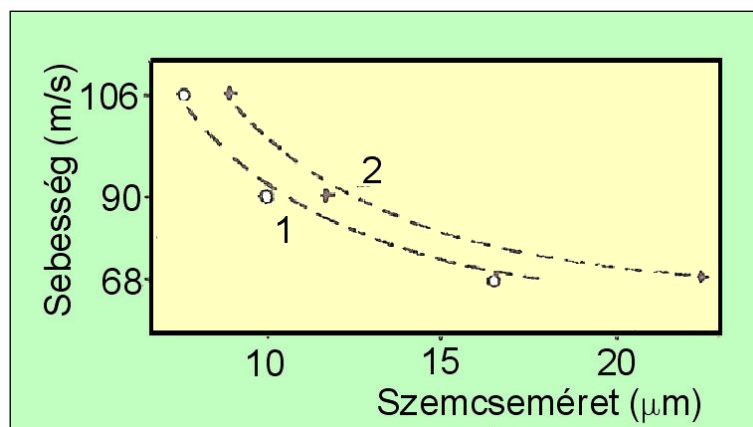
$$d_{max} = \frac{8K\sigma_f}{\rho_f v_0^2}$$

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 (5.3.3.1. 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.



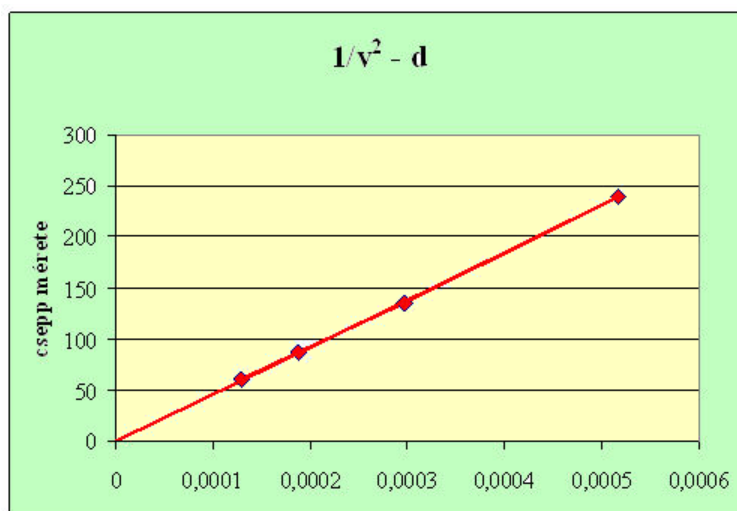
5.3.3.1. ábra: A szemcseméret és a felületi feszültség kapcsolata

A Bär-egyenletben szereplő másik technikai jellemző a *sebesség*. Ez alatt a 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 (5.3.3.2. és 5.3.3.3. 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.

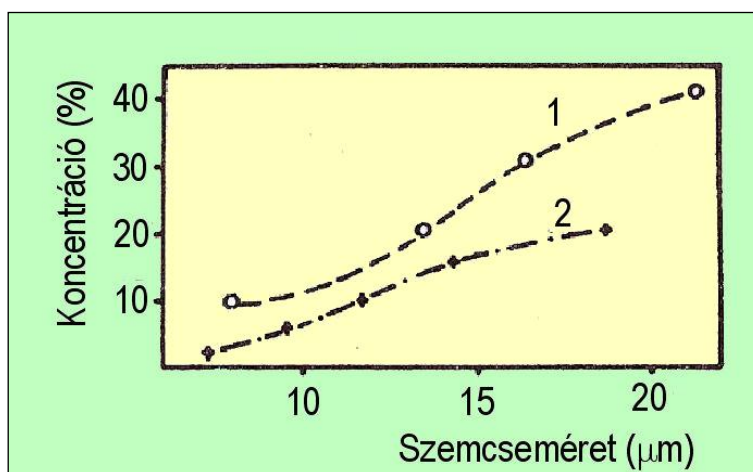


5.3.3.3. ábra Linearizált kapcsolat a sebesség és a cseppméret között

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 (5.3.3.4. 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, a 100 °C-ot, illetve a „[nedves hőmérő hőmérsékletét](#)„.

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

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

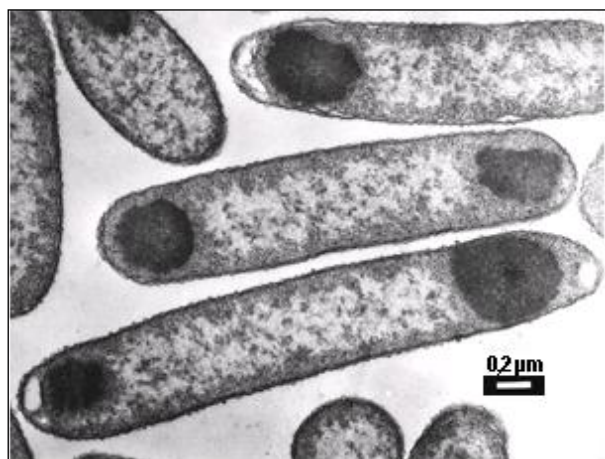
A bevitt hő mennyisége a levegő térfogatáramától (ez általában rögzített, beépített érték) és a belépő hőmérséklettől (ez szabályozható) függ. A kilépő levegő hőmérséklete terheléstől függ – minél nagyobb mennyiségű vizet kell elpárologtatni, annál alacsonyabb lesz. Technológiailag tehát az alacsony 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 tapasztalati 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 kísérleti úton határozhatók meg.

6. ZÁRVÁNYTESTEK FELDOLGOZÁSA

6.1. A zárványtestek

A zárványtest kifejezést az angol „inclusion body” szókapcsolat fordításaként használjuk. Jelentése a sejteken belül, zárványok formájában keletkező, szilárd halmazállapotú fehérjeszemcse. Kompakt, legömbölyített alakú testek. Fénytörésük eltér a citoplazmától, ezért fáziskontraszt-mikroszkóppal észlelhetők. Sűrűségük viszonylag nagy, ezért sejteltávolítás után centrifugálással gyorsan ülepedhetnek.



6.1.1. ábra: Zárványtestek *E. coli*-ban

Anyagukban általában homogének, 90-95 százalékban egyféle fehérjéből állnak. Technológiai szempontból csak a prokariótákban előforduló zárványtestek érdekesek, emberi sejtekben csak nagyon ritka genetikai rendellenességek következtében fordulnak elő.

A genetikailag manipulált organizmusokkal előállított, röviden „rekombináns” fehérjék termelésének két alapvető lehetősége adódik. A manipulált prokarióta sejtekkel (pl. *E. coli*) kialakított technológiának számos előnye van:

- gyorsan szaporodnak a sejtek,
- nagy sejtkoncentráció érhető el
- egyszerű és olcsó táptalaj
- gyorsan és nagy koncentrációban keletkezik a fehérje.

Hátrányai ugyanakkor, hogy csak az aminosavsorrend kialakítása reprodukálható biztosan. A fehérjék „érése”, a poszttranszlációs modifikációk viszont nem, vagy nem megfelelően mennek végbe. Így hibás lehet:

- a diszulfid-hidak kialakulása
- a harmadlagos szerkezet, a „folding” kialakulása
- kémiai módosítások, glikozilálás, metilezés
- az „éretlen” fehérjék gyakran rosszul oldódnak, a citoplazmából kiválva oldhatatlan zárványtesteket alkotnak
- ezekből a fehérjék kinyerése és aktiválása külön lépéseket igényel.

A másik technológiai út a bioszintézis végrehajtása manipulált állati sejtekkel. Ezek tenyésztésével érett szerkezetű, glikozilált, fiziológiailag aktív fehérjét állíthatunk elő, nem képződnek fehérje-zárványok, ezek feldolgozásával sem kell foglalkozni. Viszont ennek az alternatívának is megvannak a maga hátrányai:

- a szöveti sejtek lassan szaporodnak,

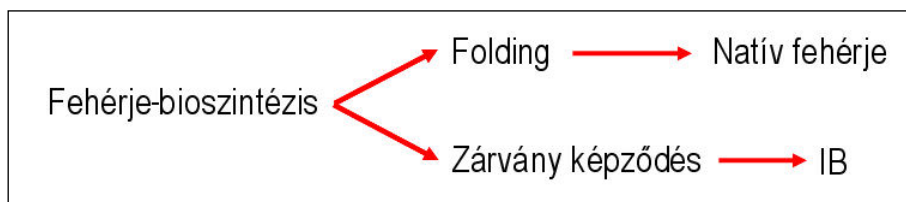
- kisebb az elérhető sejtkoncentráció,
- a megtermelt fehérje mennyisége is viszonylag kevés,
- drága, nehezen kezelhető tápoldatot igényelnek.

Sokszor nehéz választani a két lehetőség közül. Előfordul, hogy ugyanazon termék piacán két versengő cég egyike prokariótával, a másik eukarióta sejtekkel termelt hatóanyaggal jelenik meg.

A zárványtestek kialakulása tehát a prokarióta sejtekben gyakran előfordul, a fehérjék izolálásánál komoly problémákat vet fel, ezért érdemes vele külön foglalkozni. Ez a fejezet némileg eltér a tárgy egyéb témaköreitől, mert nem egyetlen műveletet tárgyal, hanem egy sajátos célú műveletsort.

6.1.1. A zárványtestek kialakulása

A kifejezett fehérjék között sem lehet bizonyossággal előre jelezni, hogy mely fehérjékből lesz zárványtest, és melyekből nem. A vizsgálatok szerint képződésük nem hozható összefüggésbe sem genetikai paraméterekkel (host, vektor, génkörnyezet), sem a fehérje tulajdonságaival (méret, oldhatóság, szerkezet). Annyit lehet csak megfogalmazni, hogy a sok diszulfidhidat tartalmazó fehérjék általában hajlamosabbak a zárványképzésre. A fehérjezárványok képződése kinetikai okokra vezethető vissza. A riboszómák felületén végbemenő fehérjeszintézis létrehozza a megfelelő aminosav-sorrendű polipeptidláncot (elsődleges szerkezet), de az aktív (natív) állapot eléréséhez ennek fel kell vennie a megfelelő másodlagos és harmadlagos szerkezetet, beleértve az intramolekuláris diszulfidhidak kialakulását is. Ezt a folyamatot nevezik „folding”-nak (legelfogadhatóbb fordítása talán a „hajtogatás”). A folyamat többé-kevésbé spontán módon is végbemegy, hiszen a rendezett, natív fehérje energiaállapota alacsonyabb, mint a frissen keletkezett, kigombolyított fehérjeláncé. Az átalakulást számos esetben katalizálják a chaperonok (dajkafehérjék). A fehérjeképződés és a folding normális körülmények között egyensúlyban van, a létrejött fehérjemennyiség túlnyomórészt átalakul natív formává. Ha viszont valamilyen oknál fogva több fehérje képződik, mint amennyit a folding folyamata át tud alakítani, akkor a felszaporodó „hajtogatatlan” (unfolded) fehérje zárványtestté alakul (6.1.1.1. ábra). Ezt a mechanizmust igazolja az a megfigyelés is, hogy ha a prokarióta organizmus saját fehérjéjének termelését fokozzuk (pl. géntöbbszörözéssel), akkor a mikroorganizmus saját fehérjéjéből is kialakulhat zárványtest.



6.1.1.1. ábra: A folding és a zárványképződés alternatív utak

A fehérjezárványok jellemzően a citoplazmában alakulnak ki. Az *E. coli* citoplazmájában ugyanis a közeg redukzív, ami nem kedvez a diszulfidhidak kialakulásának, azaz a foldingnak. A *coli* citoplazma-fehérjéinek jelentős részében nincs is diszulfidhid. A sejten belül oxidatív környezetet a periplazmikus térben találunk, itt megy végbe a keresztkötést tartalmazó fehérjék foldingja.

A fehérjezárványok kialakulása bonyolultabbá teszi az izolálási technológiát, de ugyanakkor vannak előnyei is. A szemcsék csaknem tiszta célfehérjéből állnak, homogenitásuk több mint 90 százalék, ezzel az előtisztítás feleslegessé válik. Ebben a tömör állapotban nem hatnak a proteázok, nem kell a termék elbontásától tartani. A zárványban lévő fehérjék inaktívak, így a sejten belül nem tudják kifejteni esetleges káros hatásukat.

6.1.2. A feldolgozási technológia

A zárványtestekbe tömörült fehérje kinyerése és aktiválása általában a következő sorrendi séma szerint folyik:

1. sejtfeltárás → sejtörmelék, benne a zárványtestek
2. centrifugálás, tisztítás → „IB paszta”

- | | |
|------------------|----------------------------|
| 3. oldatba vitel | → oldott, unfolded fehérje |
| 4. folding | → oldott, aktív fehérje |

A következőkben eszerint tekintjük át a technológia lépéseit.

6.1.2.1. Sejtfeltárás

A sejtfeltárás műveleteivel a 3. fejezetben már részletesen foglalkoztunk. A baktériumok sejtfala változó erősségű, a Gram-pozitív törzseké ellenállóbb, a Gram-negatívaké valamivel gyengébb. Ipari méretekben lizozimos kezelést, és/vagy nagynyomású homogenizátort alkalmaznak. A feltárás a zárványtesteket nem károsítja, nem aprítja.

6.1.2.2. Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek tömör, nagyobb sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A sejttörmelékek és a fehérjeszemcsék kis mérettartományba esnek, ülepítésükhöz nagyobb g-értékekre van szükség (~10 000–20 000 g). A zárványok anyaga eléggé tiszta, csak a felületükön hordoznak szennyezéseket. Ezeket a felülúszó elvétele után pufferrel célszerű lemosni, majd újracentrifugálni. Az alappuffer (pH ~ 8) sókat (pl. 0,2 M NaCl-ot), és felületaktív anyagot (p. Triton X100-at) is tartalmaz. A fémionok megkötésére EDTA-t, redukív közeg fenntartására ditio-treitolt (DTT), a mikrobiális romlás kivédésére NaN_3 -ot adagolnak.

6.1.2.3. Oldás, szolubilizálás

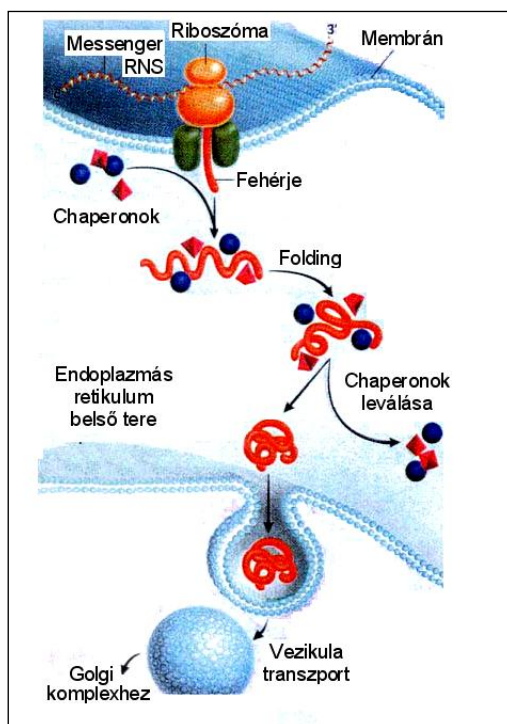
A zárványtestek kiválását éppen az okozza, hogy a nyers fehérjék a citoplazma sós vizes közegében rosszul oldódnak. Ha fel akarjuk ezeket oldani, ebben az esetben a közeg polaritásának változtatásával, csökkentésével (oldószer) vagy növelésével (sók) nem megyünk semmire. A fehérjék oldását ún. kaotróp oldószerekkel segíthetjük elő. A kaotróp anyagok (tipikusan a karbamid, illetve a guanidin), hidrogénkötések kiépítésére hajlamosak. A vízben szinte korlátlanul oldódnak, nagy koncentrációban (40-50 %) a szintén hidrogénhidak kialakítására képes vízmolekulákkal együtt sajátos tulajdonságú oldószert alkotnak. Ebben egyrészt a kaotróp molekulák közbeépülésével megszűnik a hidrogénkötésekkel összekapcsolódó vízmolekulák térhálós, végtelenített szövege (kao-tróp = káoszt elősegítő). Másrészt a fehérjemolekuláknak lehetőségük van hidrátburok helyett „kaotróp burkot” megkötni felületükön, és ezzel oldatba vihetők olyan anyagok is, amelyek vizes közegben oldhatatlanok.

A szolubilizáló elegy fő komponense 8 M karbamid vagy 6 M guanidin-hidroklorid. A közeget pH~8 körül pufferolják. Ez az oldat is tartalmaz EDTA-t, és itt is erősen redukáló potenciált alakítanak ki SH-vegyületekkel (ditiotreitolt, ditioeritrol, redukált glutation, merkapto-etanol, cisztein, cisztamin), amely megakadályozza a diszulfidhidak idő előtti kialakulását. A fehérjeszuszpenzió koncentrációját ~5 g/l-re állítják be. Az oldási folyamat szobahőmérsékleten néhány óra (1–4 óra) alatt végbemegy. Felmerülhet a kérdés, hogy miképpen lehetne elválasztani az oldódás során kiszabaduló szennyező fehérjéket. Ez a lépés azonban nem szükséges, mert a következő lépésben többszázszorosan meghígítják az oldatot, aminek következtében a szennyezők koncentrációja elhanyagolható szintre csökken.

6.1.2.4. Folding

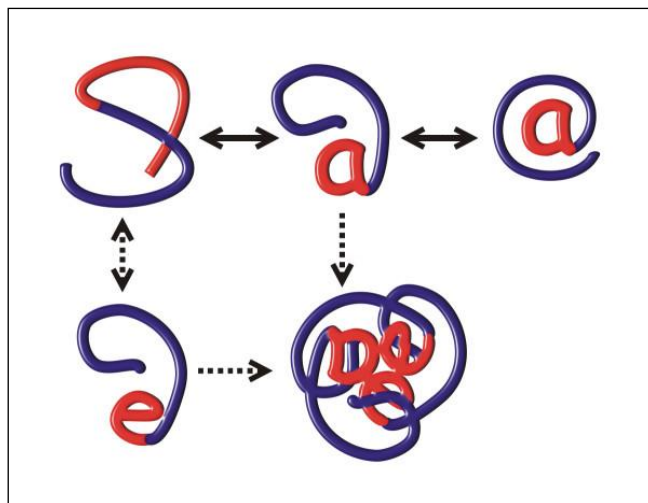
Ebben a témakörben folding („hajtogatás”) alatt a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetének megfelelő kialakulását értjük. A térbeli szerkezetet az intramolekuláris elsődleges és másodlagos kémiai kötések rögzítik. Az intermolekuláris (két vagy több fehérjemolekulát összekötő) kapcsolatok hibás szerkezetet, inaktív fehérjéket eredményeznek. A háromdimenziós szerkezetet kovalens kötések (diszulfidhidak) és gyengébb kölcsönhatások (hidrogénhidak, ionpár-kölcsönhatások és van der Waals-erők) stabilizálják.

A sejtekben a folding természetes folyamata az endoplazmás retikulumban megy végbe. A belső kötések kialakulását dajkafehérjék (chaperonok) katalizálják, amelyek átmenetileg összekapcsolódnak a formálódó fehérjével, majd a megfelelő alak kialakulása után leválnak róla (6.1.2.4.1. ábra). Ezzel párhuzamosan a fehérje N-glikozilálásának első lépései is lejártszódnak. A fehérjemolekulák ezek után szállító (transzport) vezikulákban lépnek ki a lumenből, és továbbítódnak a Golgi-komplexbe, ahol glikozilálásuk folytatódik, érésük befejeződik.



6.1.2.4.1. ábra: A folding az endoplazmás retikulumban megy végbe

Ugyanezt a folding reakciósort a technológia során *in vitro*, azaz készülékben, endoplazmás retikulum és dajkafehérjék nélkül kell megvalósítani. Ez sokkal nehezebb feladat. A natív szerkezet kialakulása soklépéses folyamat, amely többféle melléreakcióban is „félrecsúszhat”, inaktív termékeket eredményezve. A „téves” reakciók lehetnek intra- és intermolekulárisak (6.1.2.4.2. ábra).



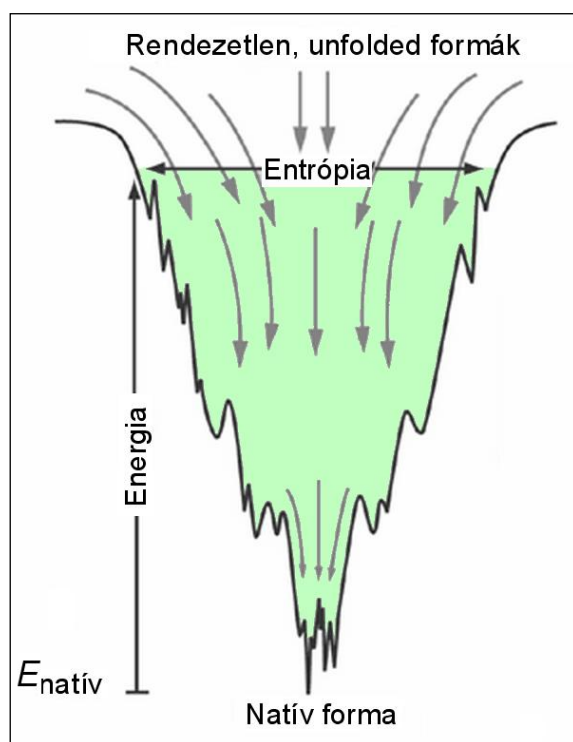
6.1.2.4.2. ábra: A folding folyamata és melléreakciói

A monomolekuláris reakciók többé-kevésbé reverzibilisek, az aggregátumképzés viszont nem. Emiatt elsődleges cél a molekulák távoltartása, találkozásuk megakadályozása. A legegyszerűbb megoldás az erős hígítás, a híg oldatokban a fehérjék találkozási valószínűsége kicsi. A szolubilizálásnál beállított ~5 g/l koncentrációjú oldatot 500–1000-szeresen felhígítják. A kisebb koncentráció hatása a reakciósebességre kvantitatívan is kifejezhető. A sebességeket felírva a foldingra (F) és az aggregációra (A) a következő összefüggéseket kapjuk:

$$v_F = \frac{dc}{dt} = -k_F c \qquad v_A = \frac{dc}{dt} = -k_A c^2$$

A negatív előjel arra utal, hogy a kiindulási fehérjekoncentráció a reakció során csökken. Az aggregáció (minimum) bimolekuláris (másodrendű) folyamat, emiatt szerepel a koncentráció a második hatványon. Ha tehát a hígítással a koncentrációt ezerszeresen csökkentjük, a folding sebessége ezredrészére csökken, az aggregációé viszont egymilliomod részére. A folding lelassul ugyan, de a bimolekuláris reakciók gyakorlatilag megszűnnek. A folding kialakulására emiatt hosszabb, 24–48 órás reakcióidőt adnak. A fehérjeoldatot lassan, keverés közben, nagy mennyiségű foldingpufferbe engedik. A beadagolást sokszor több ponton, illetve több részletben hajtják végre. A bevétel késleltetése nem csak a tökéletes elkeveredést szolgálja, hiszen az néhány másodperc alatt bekövetkezik. Ha a betáplálás során több időt hagyunk, akkor a már bevitt fehérje egy része felveszi a natív formát, ezzel csökkenti az intermolekuláris reakcióra képes molekulák koncentrációját.

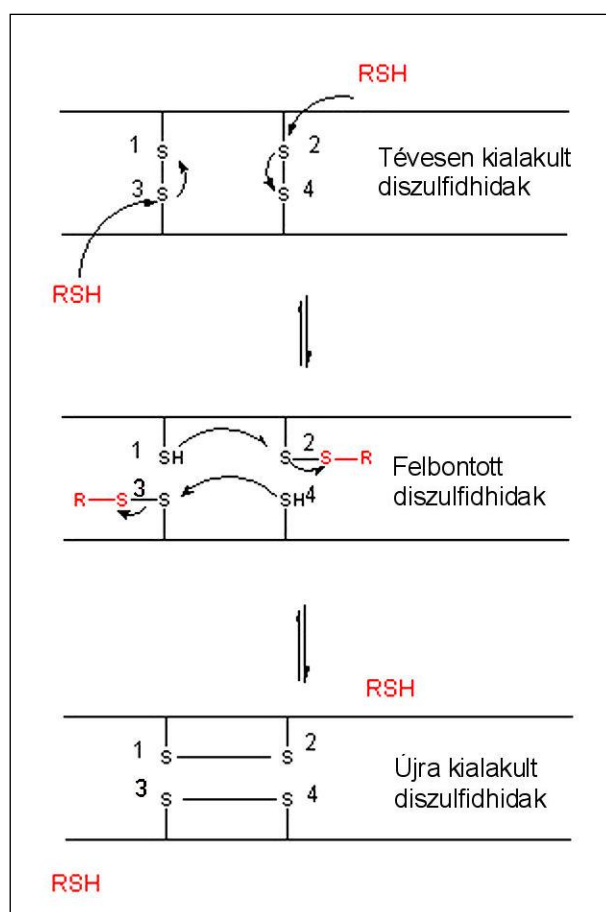
Egy adott fehérjelánc a hajtogatás során nagyon sokféle konformációt fölvehet, ezek közül csak egy „az igazi”, a natív, aktív fehérje. A sokféle szerkezet energiaszintje is különböző. Sok vizsgálattal alátámasztott feltételezés, hogy a natív állapot az energiaminimumnak megfelelő szerkezet. A feltételezés azon alapul, hogy ha a természetben, a sejtekben működő aktív, natív fehérjéknek lenne egy még alacsonyabb energianívójú alakja, akkor a fehérjék spontán módon „átcsúsznának” ebbe a másik – kevésbé aktív – formába, amelyben kevésbé hatékonyan működnének. A rosszabb hatékonyságú működést viszont a természetes szelekció, az evolúciós verseny kiszelektálja, kihalásra ítéli. Az *in vitro* folding során tehát a fehérjéket az energiaminimum felé kell mozgatni, ami látszólag könnyű, önként végbemenő folyamat. A nehézséget az jelenti, hogy a nagyon sok hajtogatási forma energiaszintjei bonyolult energiafelületeket alkotnak (6.1.2.4.3. ábra), aminek számos lokális minimuma lehet, ahol a molekula „megrekedhet”. Ennek kivédésére a tudomány által sok helyen alkalmazott módszert alkalmazzuk: ismételt kis energia-„lökésekkel” perturbáljuk a rendszert, átsegítjük a lokális energiagátakon. Ezzel elérjük, hogy a molekulák túlnyomó többsége az energiaminimumra vagy legalább annak közvetlen közelébe kerüljön. Ilyen perturbációs energiaközlés történhet a hőmozgással, illetve dinamikus kémiai rendszerekkel. A foldingreakciót nem szokták melegíteni, általában 4–20 °C között végzik.



6.1.2.4.3. ábra: A fehérjehajtogatási formák energia- és entrópiaviszonyai

A folding kialakításánál kritikus folyamat a diszulfidhidak (kovalens kötések, nagyobb energiát képviselnek) megfelelő kialakítása. Ha egy fehérjemolekulában csak két hozzáférhető cisztein van, akkor nincs esély hibás kénhíd létrejöttére. Ha viszont több is van (n), akkor a lehetséges hidak száma $n \cdot (n-1) / 2$ – ekkor már nagy az esély a „téves” kapcsolódásra. Extrém példa a rekombináns fehérjeként

gyártott szöveti plazminogén aktivátor (tPA), amelyben 16 diszulfidhíd fordul elő. A kénhidak létrehozásához az eddigiektől eltérően oxidáló közegre van szükség, ezt ditio-vegyületekkel érjük el. De mivel gyakran előfordul, hogy az adott SH-csoport elsősre nem a megfelelő partnerrel alkot kötést, biztosítani kell a felbontás és újrakötés lehetőségét is. Ehhez redukáló, SH-vegyületek jelenlétére is szükség van. Erre a célra „redox-puffert” alkalmaznak, amiben az adott kénvegyület oxidált és redukált alakja egymás mellett van jelen – a fő reakcióiránynak megfelelően oxidáló túlsúllyal. Ilyen vegyületpárok például a glutation (oxidált > redukált forma), a cisztein < cisztin és a β -merkaptó-etanol < diszulfidja. A dinamikus kötés-felbomlás-újrakötés folyamat végeredményeképpen a kialakul az energiaminimum vagy ahhoz közeli állapot (6.1.2.4.4. ábra).



6.1.2.4.4. ábra: A diszulfidhidak újrakapcsolódása

A folding puffer alapja általában 0,1–0,2 M Tris, a pH változatlanul 7,5–8,5 közötti érték. A kénvegyületek koncentrációja 1–10 mM. Az oldat az eddigiekhez hasonlóan tartalmaz detergenseket, pl. Triton-X-et, és 2–10 mM EDTA-t. Konzerválószerként a sejteket elpusztító azid helyett ~0,1 mM PMSF-ot (fenil-metil-szulfonil-fluorid, proteáz inhibitor) használnak. Emellett chaperon-hatású anyagokkal is kiegészítik az összetételt, így arginint adnak 0,4–1 M koncentrációban. Kisebb koncentrációban kaotróp anyagokat is alkalmaznak. Egyes speciális esetekben olyan amfifil molekulák pozitív chaperon hatását mutatták ki, mint az alkil-karbamid, PEG, lauril-maltozid, CHAPS, ciklodextrinek.

6.1.2.5. Speciális foldingtechnikák

A leírt általánosan használt hígítási módszer mellett számos, eltérő elven működő technikát is leírtak. Kialakítható a folding gélkromatográfia közben is. A foldingpufferrel eluálva, a kaotróp anyagok kihígulnak és lemaradnak az oszlopban. A legelső frakcióban a nagyméretű aggregátumok jelennek meg, azután a monomer fehérjék, végül a kaotrópok. Ideális esetben a nyers, a natív és a misfolded (rosszul hajtogatott) formákat is el lehet választani, bár ezek molekulatömege egyforma.

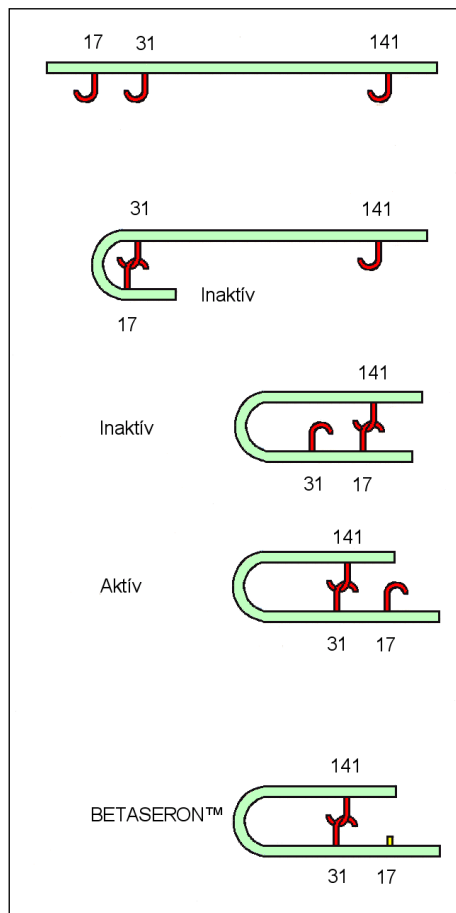
A fehérjék találkozását hígítás helyett meg lehet akadályozni úgy is, hogy a lánc egyik végét szilárd felülethez kötik (*matrix assisted folding*). Ha a kötés csak egy rövid szakaszt érint (poli-His vég, poli-Arg vég), akkor a molekulalánc többi része a pufferben felveszi a natív alakot. Külön lépés a kész fehérje leválasztása a töltet felületéről.

Más kromatográfiai tölteten is végbemehet a folding. *Adszorpciós kromatográfia* során (pl. HIC) a fehérjemolekula a sokszor ismétlődő szorpció-deszorpció során „átgyúródik”, felveszi a minimális energiájú formáját.

A hígítós puffercsere helyett az oldószerváltás megoldható dialízissel is. A kaotróp anyagok fokozatosan eltávoznak, a kénvegyületek belépnek a folyadékba. A dialízis és a folding egyaránt lassú folyamatok, párhuzamosan megvalósíthatók.

6.1.2.6. A folding befolyásolása fehérjemérnökséggel

A foldingot, különösen a diszulfidhidak kialakulását egy vagy néhány kritikus aminosav kicserélésével meg lehet változtatni. A ciszteinek beépítésével, vagy cseréjével a kötési lehetőségek megváltoznak. Jó példa erre a BETASERONTM fehérje kialakítása. A béta-interferon (immunfehérje) eredetileg három ciszteint tartalmaz (17, 31 és 141 aminosav), ezek közül kettő (31 és 141) diszulfidhidat képez. Amikor rekombináns fehérjeként állították elő, problémát okozott, hogy az SH-csoportok statisztikusan kapcsolódtak össze, és a három lehetséges szerkezetből csak egy volt aktív. A hibás szerkezetű termékek kialakulásának megakadályozására a gén módosításával a 17 pozícióban álló ciszteint kicserélték szerinre. A szerin kémiaiailag hasonló tulajdonságú aminosav, oldalláncán SH-csoport helyett hasonló polaritású OH-csoportot tartalmaz, így a fehérje tulajdonságait legfeljebb minimális mértékben változtatja meg. Keresztkötések létesítésére a szerin viszont alkalmatlan, így csakis a megmaradt két cisztein között jöhet létre a kötés, így nem keletkeznek melléktermékek (6.1.2.6.1. ábra).



6.1.2.6.1. ábra: A béta interferon lehetséges diszulfidhidjai

7. ESETTANULMÁNY-1: CITROMSAV GYÁRTÁSA

7.1. A citromsav

A szerves savak elsődleges anyagcseretermékek, az energiatermeléshez vagy a növekedéshez kötött bioszintézissel képződnek. Minden nagy rendszertani egységben (baktériumok, élesztők, fonalas gombák) vannak savtermelők. A savtermelés általában hiányos anyagcserét jelez – az oxidáció nem megy teljesen végig szén-dioxidig és vízig. Anaeroboknál nem az oxidáció hiányos, hanem speciális, kis energianyereségű reakciók fordulnak elő (homofermentatívak, homoacetogének).

A citromsav hárombázisú szerves sav. Viszonylag erős sav, de mégsem korrozív. Komplexképzésre hajlamos, megkötí a fémionokat. Nagy a pufferkapacitása, a három savcsoport miatt három pK-értéke van, azaz széles pH-tartományban használható pufferként. Biológiailag bontható, kellemesen savanyú ízű anyag. Éves termelése kb. másfél millió tonna. Ennek kb. 60%-át az élelmiszeriparban használják fel (űdítők, borok, lekvárok, édességek készítésénél).

7.2. A citromsav gyártása

A termelő törzsekkel, a bioszintézis lépéseivel és szabályozásával a Biotermék technológia tárgy foglalkozik. Itt csak a technológiára, azon belül is a feldolgozási technológiára koncentrálnak. A folyamat lépései:

1. kiveszünk egy törzskonzervert az üzemi készletből
2. szaporítás kémcsőben
3. szaporítás rázott lombikban
4. szaporítás laboratóriumi fermentorban
5. oltóanyag szaporítása inokulum fermentorban
6. a termelő fermentor beoltása
7. sejtszaporítás, citromsavtermelés (jellemzően szakaszos)
8. a micélium elválasztása
9. oxalát és ferrocianid eltávolítása
10. kalcium-citrát kicsapása és elválasztása
11. feltárás kénsavval
12. színtelenítés és ionmentesítés
13. koncentráció
14. kristályosítás, kristályszeperálás
15. szárítás
16. aprítás
17. osztályozás
18. csomagolás

A folyamat egészét és részleteit interaktív kép-a-képben animációval szemléltetjük.



7.2.1. animáció: Citromsav-animáció

A felületeken a piros keretbe foglalt részletekre kattintva szemléltető és magyarázó anyagok nyílnak meg.

7.2.1. Upstream processing (1–7. pontok)

Az előállításához szüksége szénforrás valamely cukor (glükóz, fruktóz, szacharóz, ill. keményítő, melasz, hulladék szénhidrát). Léteznek eljárások n-alkánokra (C_9 – C_{30}), illetve alkoholokra, de ezek nem terjedtek el. Szacharózon az elméleti hozam 123%, de a valóságban a sejttömegképződés miatt maximum 92% érhető el. Az általánosan használt melaszt beadagolás előtt szűrni, és ioncserével vasmentesíteni kell. A tápoldatot folyamatos sterilizálón átvezetve csíramentesítik. Az optimális tápoldat összetételében fontos a Fe, Cu, Zn és Mn megfelelő koncentrációja is. A maradék vasionok megkötésére legtöbbször K-ferrocianidot használnak, ennek eltávolítása viszont külön lépés a feldolgozás során.

A pH szempontjából rendhagyó, hogy a citromsav az egyetlen fermentált sav, amit nem kell menet közben a fermentorban semlegesíteni, az alacsony pH nem árt sem a mikroorganizmusnak, sem a termékképzésnek. Intenzív levegőztetésre van szükség.

7.2.2. A micélium elválasztása

A citromsavtermelő törzsek *Aspergillusok* (*A. niger*, *A. wentii*), azaz fonalas gombák. Miceliális növekedésűek, a fermentáléban gombafonalak tömege jelenik meg. A technológia szempontjából lényeges, hogy ez a biomassza milyen morfológiájú. A szűrhetőség szempontjából ideális a pelletes szerkezet. A pellet jelentése szemcse, azaz a fonalak kis gömböket alkotnak. A pelletek jellemző mérete 1-2 mm, bár laboratóriumban, rázatott tenyészetben akár ~1 cm-es csomók is előfordulnak. A szemcsés szerkezet előnyös egyrészt a levegőztetés szempontjából, másrészt a szűrhetőség is sokkal kedvezőbb, a szuszpenzió newtoni folyadékként viselkedik.

A micéliumokat általában vákuum dobszűrővel választják el. Ha szűrősegédanyagra is szükség van, az ásványi anyagok helyett gyakran növényi melléktermékeket (pelyva, szalmatörök) használnak.

7.2.3. Oxalátmentesítés

A citromsav-fermentáció során a leggyakrabban vezetett fermentációs technológia mellett is mindig képződik kis mennyiségű oxálsav is. A szűrt fermentlé első kezelése ennek elválasztására szolgál. Az elválasztás elve azon alapul, hogy a kalcium-oxalát rosszul oldódik vízben, így az oxálsav mésztejjel reagáltatva lecsapható. A gondot az jelenti, hogy ugyanez igaz a citrátra is, abból is csapadék képződik. A megoldás a kalcium-hidroxid fokozatos hozzáadása, amivel „megtitráljuk” a fermentlevet. Kevés $Ca(OH)_2$ bevitelével az oxalát leválik, míg az egybázisú kalcium-citrát (a hárombázisúval ellentétben) elég jól oldódik.

A lúg hatására a vasat elvonó hexaciano-ferrát komplex is kicsapódik. Ez gyakran látható is, mert ez a vegyület a fehér csapadékot kékes színűre festi.

A csapadék kiszűrésére dobszűrőt, nyomószűrőt vagy Funda-szűrőt alkalmaznak.

7.2.4. A citromsav kicsapása

A citromsav elválasztásának klasszikus módja a kicsapás kalcium-citrát formájában. Ehhez további mésztejet adagolnak az oldatba, ami teljes mértékben semlegesíti a savat, trikalcium-citrát képződik. A kicsapás mentét befolyásoló technológiai paraméterek:

- a citromsav koncentrációja,
- a hőmérséklet,
- a pH, és
- a $Ca(OH)_2$ -adagolás üteme

A citromsav-koncentráció adott, ezen nem gazdaságos változtatni. A hőmérséklet hatása egyedi. A legtöbb anyag oldhatósága javul magasabb hőmérsékleten. A kalcium-citrát oldhatósága viszont maximumos függvény, magasabb hőmérsékleten újra csökken (7.2.4.1. táblázat).

7.2.4.1. táblázat: A trikálcium-citrát oldhatósága a hőmérséklet függvényében

Hőmérséklet °C	oldhatóság g/100 ml
18 °C	0,085
25 °C	0,096
40 °C	0,085
90 °C	0,058 !

A maximális kihozatal érdekében a csapadékos levet forrón, 90 °C-on szűrik. Ezt elősegíti az, hogy a mész beoldásánál, illetve a közömbösítésnél jelentős mennyiségű hő szabadul fel, ami felmelegíti az oldatot. A szűrlet hőtartalmát hőcserélőkkel vissza lehet nyerni, és hasznosítani. A lecsapás hatásfoka semleges közegben a legjobb, ezért a 7 körüli pH beállítására törekednek, túlzott lúgosítás újra javítja az oldhatóságot. A reakcióhoz CaO-ra nézve 18–25%-os oldatot használnak, lassan beadagolva. Így nagyobb kristályok keletkeznek, amelyek kevesebb szennyezést visznek magukkal. A csapadékot a klasszikus vákuum dobszűrőn választják el.

7.2.5. Feltárás kénsavval

Gyengébb savat sójából egy erősebb savval lehet felszabadítani. A citromsavgyártási technológia esetében a kénsav a legmegfelelőbb, mert a melléktermékként keletkező gipsz oldhatatlan, könnyen elválasztható a citromsav oldattól. Sósav vagy salétromsav használata esetén a kalcium-klorid, illetve kalcium-nitrát oldatban maradna, és ez megnehezítené a citromsav kinyerését. A feltárás tömény (60–70%-os) kénsavval történik. Ez a koncentráció még nem oxidálja a szerves anyagokat, és ugyanakkor nem hígítjuk meg vele túlságosan az oldatot. A kénsavat a sztöchiometrikushoz képest kis feleslegben (+1-2 g/l) adagolják. A képződő gipszet ismét csak vákuum dobszűrőn szűrik le. A melléktermékként képződő kristályvizes gipsz mennyisége igen nagy, 1 tonna citromsav előállításával mintegy 1,4 tonna gipsz képződik. Hasznosítása, illetve elhelyezése egyre nagyobb problémát jelent.

7.2.6. Tisztítás adszorpcióval

A feltárással kapott citromsav oldat még színanyagokat és ásványi ionokat tartalmaz. Ezekről oszlopokban végrehajtott adszorpcióval szabadulhatunk meg. A színanyagokat aktív szénnel töltött oszlopon lehet megkötni. Az ásványi sók ionjait ioncserélő gyantákkal lehet eltávolítani, „flow through” technikával, azaz nem a főkomponenst kötjük meg a kolonnán, hanem a szennyezéseket. A termék átáramlik az oszlopon, nincs szükség elúcióra. Ipari léptékben nem egy-egy oszlopot telepítenek, hanem több tucat vagy akár száz, egyenként néhány köbméteres kolonnát kapcsolnak össze egy teleppé. Ezek egy része dolgozik, más részét egyidejűleg regenerálják, így lehet biztosítani a folyamatos üzemmenetet.

7.2.7. Koncentráció bepárlással

A tisztított citromsav oldat koncentrációja 200–250 g/l ez még nem kristályosítható, tovább kell töményíteni. A koncentráció célszerű művelete ennél a termékénél a bepárlás. A biológiai anyagok esetében ritkán alkalmaznak bepárlást, mert a legtöbb ilyen anyag hőérzékeny. E tananyagban nem is tárgyaltuk a bepárlás műveletét, amellyel részletesen a Vegyipari műveletek tárgy foglalkozik. A citromsav-technológiánál is kíméletesen, azaz alacsony hőmérsékleten, rövid tartózkodási idővel történik a bepárlás. Többfokozatú, többtestes vákuumbepárlót használnak, ahol az utolsó fokozatban a tömény oldat hőmérséklete nem haladja meg a 40 °C-ot.

7.2.8. Kristályosítás

A betöményített oldat lehűtve már túltelítetté válik, belőle a citromsav kristályosítható. A művelet kritikus pontja a hőmérséklet. 36,5 °C alatt ugyanis a sav egy kristályvízzel, e fölött pedig vízmentesen kristályosodik. A citromsav-monohidrát jobban kezelhető, stabilabb és nem utolsósorban esztétikusabb anyag, ezért ennek létrehozására törekednek. A vákuumbepárlás után a ~40 °C-os oldatot 20-

25 °C-ra hűtik, ebből válnak ki a kristályvizes kristályok. A citromsavgyártás olyan nagy léptékben folyik, hogy érdemes folyamatos kristályosítókat alkalmazni. Ezekben az állandósított körülmények hatására állandó tisztaságú és állandó méreteloszlású kristályok jönnek létre. A kristályok elválasztása és mosása általában szűrőcentrifugában történik. Az anyalúg még jelentős mennyiségű terméket tartalmaz, ezt visszavezetik a technológiába, a tisztítási lépések elé, és újra feldolgozzák.

7.2.9. Szárítás

A szűrőből kikerülő mosott kristályok felülete nedves. Ezt a maradék folyadékot szárítással távolítják el. Ez a folyamat is tulajdonképpen bepárlás, pontosabban a felületen lévő folyadék szárazra párolása. Alapvető különbség, hogy a szárításnál a hőközlésre meleg levegőt alkalmaznak. A művelet során újra jelentkezik a kristályvízvesztés veszélye. A száradó anyag hőmérséklete nem haladhatja meg a 36,5 °C-ot. Emiatt vagy vákuumszáritókat használnak, vagy igen nagy mennyiségű, közel szoba-hőmérsékletű levegővel szárítanak.

7.3. Fejlesztési irányok

Ebben a fejezetben a citromsav fermentlé klasszikus feldolgozási technológiáját mutattuk be. Ahogyan ez látható, az eljárás sok vegyszert és energiát igényel, és óriási mennyiségű mellékterméket bocsát ki. Emiatt állandó a nyomás, hogy alternatív technológiai megoldásokat dolgozzanak ki. Ígéretesek például a membránműveletek. A sejtek elválasztására mikroszűrést, a nagy molekulájú szennyezések eltávolítására ultraszűrést, a citromsav oldat koncentráálására reverz ozmózist vagy nanoszűrést lehet alkalmazni. Az új feldolgozási műveletek elterjedésének gátja, hogy a citromsav igen nagy mennyiségben gyártott olcsó tömegtermék, a legkisebb többletköltség is veszélyezteti a versenyképességet.

8. ESETTANULMÁNY-2: MONOKLONÁLIS ANTITESTEK GYÁRTÁSA

8.1. A monoklonális antitestek (MAB)

Az antitestek a szervezet molekuláris immunválaszának részei. A szervezetbe behatoló idegen anyagokkal, az antigénekkal lépnek kölcsönhatásba. Azokat az anyagokat nevezzük antigéneknél, melyek a gerincesek szervezetében antitestek (ellenanyagok) termelését, illetve immunválaszt indítanak el. Az elnevezés Detre László magyar mikrobiológustól származik, vélhetőleg az anti(testet) generál szavakból. A modern definíció szerint minden olyan anyag antigén, amit az adaptív immunrendszer felismer. Szorosabb értelemben, immunogén az az anyag, ami választ képes kiváltani az immunrendszerből, míg az antigének olyan anyagok, amik specifikus antitestekhez kötődnek. Az antigének általában fehérjék vagy poliszacharidok, ezek a baktériumok, vírusok és más mikroorganizmusok testét felépítő anyagok vagy toxinok is lehetnek. A nem mikrobiális külső eredetű (exogén) antigének közé tartozhatnak a pollen, idegen (pl. tej-, tojás-) fehérje, átültetett szövetek vagy szervek fehérjéi, beleértve a vérátömlesztéskor bejutott vérsejtek felszínén található glikoproteineket is.

Az antitestek olyan fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer termel annak érdekében, hogy felismerje és semlegesítse a szervezetbe került idegen anyagokat, mint például a baktériumokat vagy a vírusokat. Minden egyes ellenanyag egy idegen molekula egyedi részét (epitóp) ismeri fel és kötődik hozzá. Az ellenanyagok az immunrendszer humorális immunválasza során keletkeznek. Az immunglobulinok olyan glikoproteinek az immunglobulin szupercsaládban, amelyek ellenanyagként funkcionálnak. Az ellenanyag és immunglobulin elnevezéseket gyakran egymás helyettesítésére használják. Előfordulnak a vérben és a szöveti folyadékokban csakúgy, mint számos váladékban. Szerkezetüket tekintve globulinok (a vérfehérje-elektroforézis γ -régiójában található). Az ellenanyagokat az immunrendszer B sejtjeiből származó plazmasejtek termelik és választják ki. A folyamat során a B sejtek a nekik megfelelő antigént megkötik, aktiválódnak és plazmasejtté differenciálódnak. Az aktiválódáshoz rendszerint a T helper sejtek támogatása is szükséges.

Az immunglobulinok nagy molekulaméretű plazmafehérjék, melyekhez gyakran N-terminális cukorláncok kapcsolódnak az aminosav-oldalláncokhoz. Az antitest monomer formában egy „Y”-alakú molekula, amely két egyforma nehéz láncból és két egyforma könnyű láncból áll. Az egyes láncokat egymással diszulfidhidak kötik össze.

A szervezet ellenanyag-diverzitása hatalmas, gyakorlatilag minden egyes fehér vérsejt eltérő antitestet szintetizál. Így a vérünkben 10^7 – 10^9 nagyságrendű különböző epitóppal reagáló antitest van jelen. Emiatt ezt a természetes együttest poliklonális antitestnek nevezzük. Ezt tartalmazza a gamma-globulin-injekció is.

Monoklonalitásról akkor beszélhetünk, ha az ellenanyag-molekulák egyetlen B-limfocita klón termékei. Homogének (fehérjekémia, antigénspecifitás, affinitás, izotípus) szempontjából. Egyetlen antigén egyetlen epitópjával képesek kötődni, a két molekuláris felület komplementer megfeleltetése nagyon specifikus. Affinitásuk nagy, azaz a reverzibilis kötődési reakció egyensúlya igen erősen a kötés irányába tolódik el. Ez azt is eredményezi, hogy a kötődés igen kis koncentrációk mellett is létrejön. Előnye a poliklonális ellenanyaggal szemben, hogy a meghatározott specificitású és izotípusú ellenanyagok nagy mennyiségben és azonos minőségben („pharmacology-grade”) állíthatók elő. Jelentős szerepük a biokémia, a molekuláris genetika és a gyógyászat területein van. Nagy előnyük, hogy kiszámítható hatással és kevés mellékhatással rendelkeznek.

A monoklonális antitestek (MAB vagy Moab) a monospecifikus antitestek, amelyek azonosak, hiszen egyféle immunrendszerbeli sejtklónok termékei, egyetlen sejtöstől származnak.

8.2. A monoklonális antitestek gyártása

Az antitestek előállítását állati sejtek tenyésztésével folyik. A megfelelő sejtvonalak létrehozásával, az állati sejtek tenyésztésének kérdéseivel a Biotermék technológia tárgy foglalkozik. Itt csak a technológiára, azon belül is a feldolgozási technológiára koncentrálnak. A folyamat lépései:

1. Kiveszünk egy, a megfelelő sejtvonalat tartalmazó ampullát a Working Cell Bank-ból
2. Felolvasztás
3. Szaporítás lombikban
4. Szaporítás forgó palackban
5. Oltóanyag szaporítása inokulum fermentorban
6. A termelő fermentor beoltása
7. Sejtszaporítás, MAB-termelés (lehet rátáplálásos, félfolytonos, folytonos, sejtviisszatartással)
8. A lefejtett léből a sejtek és törmelékek elválasztása
9. Az antitestek kinyerése Protein A-affinkromatográfiával
10. Az antitestek tisztítása kationcserélő kromatográfiával
11. Tisztítás anioncserével
12. Vírusmentesítés
13. Koncentráció ultraszűrővel
14. Formulázó anyagok hozzáadása
15. Szűrés
16. Liofilizálás

A folyamat egészét és részleteit interaktív kép-a-képben animációval szemléltetjük.



8.2.1. animáció: MAB kép-a-képben

A felületeken a piros keretbe foglalt részletekre kattintva szemléltető és magyarázó anyagok nyílnak meg.

8.2.1. Upstream processing (1–7. pontok)

E tananyagban csak a feldolgozási témakörökkel foglalkozunk, ezért a fermentációs folyamatról csak néhány technológiai jellegű adatot foglalunk össze.

Az állati sejtek között kevés olyan van, amelyik a mikrobákhoz hasonlóan, szubmerz, szuszpenziós tenyészetben szaporítható. A tenyésztés előnyei miatt viszont a biotechnológusok erre a néhány sejt típusra építik szinte valamennyi technológiát. Ezek a fermentációs eljárások azonban jelentősen különböznek a mikrobák világában megszokottaktól.

A sejtek oxigénigénye messze elmarad a baktériumok és gombák igényeitől (0,01–0,05 vvm). Ez nem igényel intenzív keverést, ami előnyös, mert a keverésnél fellépő nyírófeszültségek könnyen károsíthatják a sejtfal nélküli állati sejteket, ezért csak a legalacsonyabb, a sejtek kiülepedését még éppen megakadályozó alacsony fordulatszámot alkalmazzák (20–50 fordulat/perc). A pH értéke a vérre jellemző 7,4. A fermentáció során a pH csökken a sejtek savtermelése miatt, de ezt ellensúlyozzák a tápoldat puffer-rendszerei. Sok sejt vonal igényel a tápoldatban vérfehérjéket, ezek viszont körülményessé teszik a feldolgozást. Ezért általános a törekvés, hogy a sejt vonalakat olyan irányba manipulálják, hogy azok legalább a termelő fázisban szérumfehérjék nélkül is működőképesek legyenek.

Fermentációs műveleti szempontból a MAB-termelés ritkán szakaszos, sokkal gyakoribb a rátáplálásos technika (ezzel lehet a legnagyobb termék koncentrációkat elérni), a félfolytonos és folytonos sejtviisszatartásos rendszer. Az állati sejtek igen lassan szaporodnak, így nehéz nagy sejtszámot elérni. Ezért van jelentősége a sejtek viisszatartásának a reaktorban. Ez megvalósítható ülepítéssel, szűréssel, speciális leválasztó berendezésekkel.

Az emlőssejt-fermentorok legnagyobb mérete nem haladja meg a néhány ezer litert, részben az emlőssejtek érzékenysége, részben a drága tápoldatok miatt.

A sejtenyészetek felülúszói csak kis koncentrációban tartalmazzák az ellenanyagokat (100–200 µg/ml), bár az elméleti határ a sejtek potenciáljából számolva 6 g/liter lenne. A feldolgozás során sokszoros koncentrálás szükséges.

8.2.2. Sejtek elválasztása (8. pont)

A rátáplálásos szakaszos tenyésztésnél a teljes fermentlevet kell feldolgozni a sejtekkel együtt. A sejtvisszatartásos rendszereknél csak kisebb koncentrációban kerülnek át a sejtek az elvett folyadékba. De mindegyiknél figyelembe kell venni, hogy a MAB-termelés során nagyon sok sejt elpusztul, és ezek törmelékei, pl. a sejtmembrán, a fehérjék (HCP = host cell protein, a termelő sejt saját fehérjéi, leggyakrabban hörcsögfehérjék), a DNS, az RNS és esetleg vírusrészecskék, mind szennyezik a lefejtett levét. Ezek eltávolítására az ismert szilárd-folyadék elválasztási műveleteket alkalmazzák.

Centrifugálás: a nehezebb részecskék, a sejtek és törmelékeik leülepednek, míg a könnyebb részecskék, pl. a lipidcseppek felszállnak a folyadék felszínére. Az oldott anyagok, így a MAB is a felülúszóban maradnak.

A sejtek leválaszthatók mikroszűréssel is. Az állati sejtek mérete több tíz mikron, így pl. egy 0,65 µm-es pórusméretű szűrővel a sejtek és a szétesett sejtek darabjai jól leválaszthatók. Mélységi (dead-end) szűrés esetén a membrán felületén a sejtekből szűrőlepeny alakulna ki, ezért a lé cirkuláltatásával keresztáramú (cross flow) szűrést alakítanak ki. Ezzel a technikával nem lehet a teljes folyadékmennyiséget kivonni a betöményített sejtés léből, ezért célszerű a hatóanyagot sóoldattal (PBS = phosphate buffered saline = foszfáttal pufferolt sóoldat) kimosni, azaz diaszűrést alkalmazni.

8.2.3. Kinyerés Protein A-affinkromatográfiával (9. pont)

A szűrt, homogén oldatban az ellenanyagon kívül még sokféle oldott szennyezés van. Az antitestek kivonásának hatékony és szelektív módja, hogy a célterméket olyan affinkromatográfiás tölteten kötik meg, amelynek liganduma a *Staphylococcus* Protein A-fehérje. Ez az antitestek közös, Fc régiójához kapcsolódik, azaz minden antitestet megköt, más fehérjéket viszont nem.

Előnyei:

- Szelektíven és nagy affinitással köti az antitesteket
- Nagy a kapacitása (15–30 g MAB/liter töltet)

Hátrányai:

- Drága: 8000–10 000 USD/liter (300 l-es oszlop esetén 10 000 USD/l-rel számolva egy töltet ára 3 millió \$, amivel 20–50 kromatográfia végezhető el.)
- Toxikus (megzavarja az immunrendszert)
- A ligandum leválhat, szennyezheti az oldatot
- Az oszlop tisztítása nehézkes (érzékeny a szokásos NaOH-koncentrációkra)

A szennyezett oldatot pH=7-en felviszik az affin kolonnára. Az antitestek Fc régiójukkal megkötődnek a Protein A-ligandumokon, az egyéb oldott anyagok kimosódnak az oszlopból. A megkötött fehérjéket citrát pufferrel végrehajtott gradiens elúcióval (pH 7-ről → pH 3,8-ra) oldják le a töltetről. A Protein A szelektivitásának köszönhetően az így kapott oldat (fehérje)tisztasága a 98%-ot is eléri.

8.2.4. Tisztítás kationcserélő kromatográfiával (10. pont)

A kapott oldat még mindig tartalmazhat oldott szennyezéseket. Ezek eredhetnek az állati sejtekből (HCP), lehetnek dezaminálódott, töredezett vagy aggregálódott MAB-molekulák, amelyeket az affinkromatográfia nem különített el. Sőt az affinkromatográfia során bekerülhetnek leváló Protein A-ligandumok is. Az erős kationcserélő gyantán gyengén savas közegben (pH = 4,5–5,0) az ellenanyag megkötődik, a szennyezések kimoshatók az oszlopból. A főtermék leoldását gradiens elúcióval valósítják meg. Egyes eljárásokban pH-gradienst (pH 5,0 → 7,4), másokban sógradienst (NaCl 0 → 1,0 M) alkalmaznak.

8.2.5. Tisztítás anioncserélő gyantán (11. pont)

A kationcserével el lehet távolítani a fehérjeszennyezések nagy részét, de még mindig maradhatnak savas karakterű molekulák, elsősorban nukleinsavak. Ezek származhatnak a termelő állati sejt kromoszómáiból, illetve esetleges vírusfertőzésből. Ezek eltávolításának jellemző lépése az anioncserélős tisztítás. A gyantán az antitest nem kötődik meg, a nukleinsavak viszont igen. Az adszorpciót semleges közegben (pH ~ 7,0) hajtják végre, elúcióra nincs szükség, a szennyezések a gyanta regenerálásával távoznak.

8.2.6. Vírusmentesítés (12. pont)

A gyártási eljárásokba beépített vírusinaktiváló/eltávolító eljárások lehetnek fizikai, kémiai vagy fotokémiai eljárások. A legrégebbi fizikai módszer a pasztőrizálás, számos vírus elpusztítására alkalmas a +60 °C-os, 10 órás hőkezelés. A totális vírusmentesítés a pusztulási kinetika ismeretében nem lehetséges. Az egyes műveletek hatékonyságát a víruskoncentráció csökkenésével, pontosabban annak logaritmusával jellemzik. Például „6 log” csökkenés egymilliószoros vírusszámcsökkenést jelent, azaz $N_0/N_{végső} = 10^6$.

S/D módszer (szolvens/detergens módszer)

Szolvensként leggyakrabban tri-n-butyl-foszfátot (TNBP), detergensként Triton X-100-at vagy Tween készítményeket használnak. Ezekkel elegendő a 4 órás hőkezelés 30 °C-on a vírusok túlnyomó részének inaktiválására. Ezután a bevitt vegyszereket természetesen el kell távolítani, ezt steril növényi olajos extrakcióval célszerű megvalósítani.

Megfelelő körülmények között végrehajtott ultraszűrés is alkalmas lehet a vírusrészecskék eltávolítására.

8.2.7. Koncentráció ultraszűréssel (13. pont)

A fermentorból lefejtett lé 100–200 mg/liter koncentrációban tartalmazza az antitesteket. A diaszűrés során ez a koncentráció csökken, az affinkromatográfia viszont több nagyságrenddel növeli koncentrációt. A kromatográfias és inaktiválási lépések során az oldat újra egyre hígabb lesz, nem éri el a kiszerezési koncentrációt. A felhasználásnál a szokásos dózis 10–50 mg, 1–5 ml térfogatban. Ez azt jelenti, hogy az oldatot be kell töményíteni 10–20 g/l koncentrációra. A betöményítés kíméletes, és egyúttal tisztítással is járó technikája a koncentráció ultraszűréssel. A MAB molekulatömege 180–190 kDa, ezt visszatartó membránnal töményíthető. Ezen ugyanakkor átmennek az esetleges kis molekulájú szennyező komponensek, például a pirogén toxinok.

8.2.8. Formulázó anyagok hozzáadása (14. pont)

A kiszerezett készítmény nemcsak a hatóanyagot tartalmazza, hanem az optimális hatás kifejtéséhez szükséges, önmagukban hatástalan komponenseket is. A monoklonális ellenanyag fehérjén kívül célszerű bevinni:

- Puffer rendszert, a pH állandó értéken tartására. Liofilizálás esetén előnyös, ha a puffer nem tartalmaz illékony komponenst, mert annak egy része a vákuumban elveszhet. Stabil például a foszfát puffer.
- Ionerősség beállítására és az ozmolaritás beállítására ásványi sókat, legegyszerűbben NaCl-ot.
- Fagyasztás vagy liofilezés esetén védőanyagok: pl. szacharóz, mannit, esetleg glicerin
- Töltőanyag gyanánt pl. glicint is adagolnak.

Erre a célra már különösen nagy tisztaságú anyagokat használnak, hiszen a végtisztítás fázisában vagyunk, további tisztítás már nem következik.

8.2.9. Mélységi szűrés (15. pont)

A segédanyagok beoldása után még egy utolsó mélységi szűrés következik, amely eltávolítja az esetlegesen bekerült mechanikai szennyezéseket.

8.2.10. Dozírozás, liofilezés (16. pont)

A szűrt oldatot ampullákba dozírozzák. Egyes MAB-készítményeket oldat formájában dobnak piacra, másokat liofilizálnak, és porampulla formájában szállítják. A fehérjék tárolási stabilitását minden esetben alaposan vizsgálják, és a stabilizáló közeget optimalják.

8.3. Tendenciák a MAB-feldolgozási technológiákban

A monoklonális ellenanyagok piaca robbanásszerűen bővül, sokféleségében, mennyiségében és árbevételében egyaránt. Ez a növekedés egyfajta feszültséget okozott a technológián belül. Az Upstream technológiák, az ellenanyag előállítása az utóbbi néhány évben körülbelül három nagyságrenddel növekedett, elsősorban a fermentlevek végső titerének emelkedése révén. Ugyanakkor a Downstream processing, a feldolgozás kapacitása csak kb. egy nagyságrenddel, a tízszeresére növekedett, ami nehézségeket okoz a gyártás fejlesztésében.

9. SZÓSZEDET

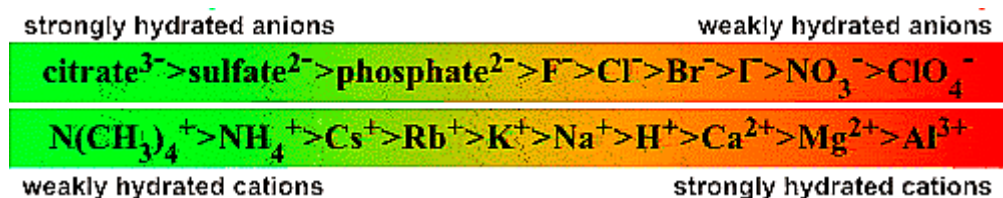
Diatómaföld – kovaföld, a tengerben élő egysejtű kovamoszatok (*Diatomae*) szilikáthéjának lerakódásával keletkező üledékes kőzet. Apró, egyenletes szemcsemérete és nagy porozitása miatt ideális hő- és hangszigetelő. Tűzálló, kémiaiilag ellenálló. A biológiai iparban szűrősegédanyagként használják, mert a szűrőrétegben, illetve az előrétegben nyomás alatt is megtartja a szerkezetét, nem nyomódik össze.

Gél – alaktartó kolloid rendszer, amelyben egy diszpergált fázis (pl. térhálós fehérje vagy szénhidrát) nagy mennyiségű folyadékot (biológiai rendszereknél vizet) köt meg. Mindkét alkotó a gél egészében folytonos (difform rendszer), a térhálós váz egyetlen „molekulagubancnak” tekinthető. A folyadékfázis is folytonos, a gélben diffundáló kis molekulák számára egyetlen összefüggő teret képez. Az élelmiszeriparban jól ismert gélek a kocsonya (zselatingél), a gyümölcskocsonya (pektingél). A biotechnológiai gyakorlatban használatos az agar-agar (táptalaj), és az alginátgél (sejtek, illetve enzimek bezárására). A gélelektroforézis nevének megfelelően gélesített közegben működik, a térhálósító anyag lehet poli-akrilamid vagy agaróz.

Globulinok – a fehérjék egy csoportja, amely vízben alig, sóoldatokban viszont jól oldódik. A név megtévesztő, mert a globuláris jelző szó szerinti fordításban (közel) gömb alakút jelent, de valójában oldhatósági kategória.

HLB – hidrofíli-lipofíli balansz, számérték, ami a detergens jellegű molekulák hidrofíli és lipofíli tulajdonságának viszonyát fejezi ki. Értéke 10 és 40 között változik. A skála két szélén található detergensnek elsősorban o/v, illetve v/o típusú emulziókat hoznak létre, illetve stabilizálnak.

Hofmeister-sorozat – 1888-ban Franz Hofmeister megállapította, hogy a sók befolyásolják fehérjék vízzoldhatóságát. Ezt a hatást mennyiségileg összehasonlítva sorba állította az ionokat (1. ábra).



9.1. ábra: Az ionok Hofmeister-sorozata

Az ionok hatása elsősorban a hidratáltság nagyságától függ. A kicsapás szempontjából az erősen hidratált anionok és a gyengén hidratált kationok sói a leghatékonyabbak (salting out). A skála jobboldalán található ionokból álló sók viszont javítják az oldhatóságot (salting in).

Hollow fiber – szó szerinti fordításban üreges szál. Olyan, cső alakú membrán, aminek belső átmérője 0,5–2 mm, falvastagsága néhány tized mm. Anyaga puha, nem öntartó. Két végét ragasztással rögzítik, a kettő közötti szakasz rugalmasan mozoghat. Előnye a nagy fajlagos felület, egy modulba sok, akár száz csövecskét is beépíthetnek párhuzamosan.

Nedves hőmérő hőmérséklete – megadja az egyensúlyi hőmérsékletet, amelyet akkor kapunk meg, ha a folyadék kis mennyisége nagy térben párolog, telítetlen levegő esetén a száraz és nedves hőmérőn leolvasott hőmérsékleti értékektől a rendszer relatív páratartalma kiszámítható.

A „nedves” hőmérő folyadék tartályát egy nedves muszlindarab veszi körül. A nedves hőmérő a környezeténél alacsonyabb hőmérsékletet mér, hiszen a párolgás hőt von el tőle. A hőmérő folyadék tartálya körül egy kis ventilátor állandó levegőáramot hoz létre. Ez a párolgást intenzívebbé teszi, az egyensúlyi hőmérséklet hamarabb beáll. Az állandó párolgás állandó hőelvonást jelent, amit a

rendszer a környezetéből pótol. A kialakuló egyensúlyi hőmérséklet az áramló levegő relatív páratartalmától és hőmérsékletétől függ. (100%-os páratartalomnál nincs párolgás, azaz nincs hőmérsékletcsökkenés). A környezeti hőmérsékletet egy „száraz” hőmérő segítségével mérjük, a két hőmérséklet ismeretében a relatív nedvességtartalom egy táblázatból leolvasható.

Perlit – vulkáni kőzet, ami hevítés hatására vizet veszít és kiterjed, térfogata akár hússzorosára is növekedhet. A hevített perlit porózus, laza anyag, térfogatsúlya csak 120–140 kg/m³. Kémiaiilag inert, fehér, rideg anyag, jól őrlhető. Porozitása miatt jó hő- és hangszigetelő, elsősorban az építőiparban használják. A biológiai iparban szűrősegédanyagként használják, mert a szűrőrétegben, illetve az előrétegben nyomás alatt is megtartja a szerkezetét, nem nyomódik össze.

Primer metabolit – a sejt működése szempontjából elsődleges fontosságú anyagcseretermék, vagy köztitermék, amely elsősorban az energiatermeléssel és a makromolekulák szintézisével kapcsolatos anyagokat jelenti. Ezek a növekedési fázisban keletkeznek.

Szinterezés – porkohászati eljárás. A szilárd alapanyagot finom porrá őrlik, majd ebből a porból formába préssel kialakítják a kívánt alakú testet. Ezt azután lágyuláspontig (az olvadáspont alatti hőmérsékletig) hevítik, amikor a szemcsék a felületükön meglágyulnak és összetapadnak. Így porózus szerkezet keletkezik, ami szűrőként átengedheti a folyadékokat és a gázokat. Az alapanyag lehet fém, de lehet kerámia, porcelán, magnezit is. A biológiai iparban mikroszűrő, esetleg ultraszűrő membránok kialakítására használják.

ÁBRÁK, ANIMÁCIÓK, VIDEÓK, TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

Ábrák

2.1.1.1. ábra: A „dead end” és „cross flow” szűrés elve	10
2.1.3.1. ábra: pH hatása a szűrési sebességre	14
2.1.3.2. ábra: Szűrősegédanyag-adagolás hatása.....	16
2.1.4.1.1. ábra: Előkezelés vizsgálata.....	17
2.1.4.3.1. ábra: Összeállítás laboratóriumi szűrési kísérletekhez	18
2.1.4.3.2. ábra: A szűrőtányér részei	19
2.1.5.1. ábra: Szűrők.....	20
2.1.5.2. ábra: Nyomószűrők	20
2.1.5.1.1. ábra: Vákuum dobszűrő.....	21
2.1.5.1.2. ábra: Szűrőlepeny leválasztása	22
2.1.5.1.3. ábra: A mosás hatékonysága	24
2.1.5.2.1. ábra: Szűrőcentrifuga vázlata	25
2.1.5.2.2. ábra: Szűrőcentrifuga fő méretei	26
2.1.5.2.3. ábra: Alul nyitott szűrőcentrifuga.....	28
2.1.6.1. ábra: Mikroszűrő	29
2.2.1.1. ábra: Az ülepedő részecskére ható erők	31
2.2.2.1.1. ábra: Csőcentrifuga.....	32
2.2.2.1.2. ábra: Csőcentrifuga (katalógusfotó)	34
2.2.2.2.1. ábra: Kosaras centrifuga	34
2.2.2.3.1. ábra: Ülepítő és szétválasztó centrifugák	35
2.2.2.3.2. ábra: A fázisok mozgása lemezes centrifugában	36
2.2.2.3.3. ábra: A részecskék mozgása lemezes centrifugában	36
2.2.2.4.1. ábra: Anyagáramlás a dekanter centrifugában.....	38
2.2.2.4.2. ábra: Dekanter centrifuga rotorja.....	39
2.2.2.4.3. ábra: Szűréssel kombinált dekanter	39
2.2.2.4.4. ábra: Háromfázisú dekanter.....	40
2.2.2.4.5. ábra: Trikanter	40
2.3.1. ábra: Szűrési diagram	42
3.1.1. ábra: A sejtfeltárás helye a feldolgozási technológiában.....	47
3.1.2. ábra: A sejtfeltárás módszereinek „családfája”	47
3.2.1.1. ábra: A peptidoglükán polimer felépítése és térhálósodása.....	49
3.2.1.2. ábra: Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfalának vázlatos keresztmetszeti képe	50
3.2.2.1. ábra: Az élesztősejtfal vázlatos felépítése: külső réteg foszfodiészter kötésekkel (P) összekötött mannátt (M) tartalmaz, a belső rész keresztkötésekkel rögzített glükánból (G) áll..	50

3.2.3.1. ábra: A <i>Neurospora crassa</i> sejtfalának vázlatos szerkezete. (a) külső α - és β -glükán réteg, (b) glükoprotein hálózat, benyúló glükánrészekkel, (c) túlnyomórészt fehérjéből álló réteg, (d) kitines réteg, fehérjébe ágyazott mikrofibrillumok.....	52
3.3.3.1. ábra: A kinyert enzimaktivitás alakulása a sejteltárás során.	56
3.4.1. ábra: Kézi homogenizálók, potterek (katalógusfotó)	57
3.4.1.1. ábra: Laboratóriumi ultrahangos sejteltáró berendezés (katalógusfotó)	58
3.4.1.2. ábra: Fehérjekiráramlás <i>Bacillus</i> -sejtekből.....	59
3.4.1.3. ábra: Különböző enzimek kilépése élesztőből ultrahangos feltárás során.....	59
3.4.2.1. ábra: Gyöngymalom tipikus felépítése (vázlat).....	60
3.4.2.2. ábra Asztali gyöngymalom (katalógusfotó)	60
3.4.2.3. ábra: A sejt koncentráció hatása az üzemi hőmérsékletre	61
3.4.2.4. ábra: Folytonos üzemű gyöngymalom (vázlat)	62
3.4.2.5. ábra: Gyöngymalmok méretingsora (katalógus)	63
3.4.3.1. ábra: A homogenizáló szelep vázlatos felépítése	64
3.4.3.2. ábra: Egy- és kétfokozatú homogenizáló szelep hosszmetsete.....	64
3.4.3.1.1. ábra: Péklesztő feltárásának nyomásfüggése.....	65
3.4.3.1.2. ábra: Fehérjekinyerés nagynyomású homogenizátorral	66
3.4.3.1.3. ábra: A fehérjekibocsátás és az enzimbomlás függése a nyomáseséstől.....	66
3.4.3.1.4. ábra: Nagynyomású szivattyúk jelleggörbéi	67
3.4.3.1.5. ábra: Háromhengeres dugattyús szivattyú.....	68
3.4.3.1.6. ábra: Homogenizáló szelepek kialakítása.....	68
3.4.4. 1. ábra: Szakaszos üzemű homogenizátor (French press)	69
3.4.5.1. ábra: Az X-press (vázlat).....	70
3.4.5.2. ábra: A víz-jég fázisdiagram	70
3.4.5.3. ábra: Az X-Press feltárókamrája (katalógusfotó)	71
3.4.6.1. ábra: A nagynyomású homogenizátor hőeffektusa	73
3.5.1.2.1. ábra: Acetonpor élesztőből.....	74
3.5.1.3.1. ábra: Dekompressziós bombák (katalógusfotó)	75
4.1.4.2.1. ábra: A pH hatása a megoszlási hányadosra.....	84
4.1.4.2.2. ábra: A penicillinmolekula szerkezete.....	85
4.1.5.1.1. ábra: Oldószerek és oldatok polaritási sora	86
4.1.5.1.2. ábra: Vizes kétfázisú rendszer fázisdiagramja.....	87
4.1.5.3.1. ábra: FEM rendszer működési elve	89
4.1.5.3.2. ábra: v/o/v típusú emulzió	89
4.1.5.3.3. ábra: Ipari FEM-rendszer	90
4.1.5.3.4. ábra: Immobilizált folyadékmembrán	91
4.1.5.3.5. ábra: Üregszál modul	92
4.2.1. ábra: Adszorpció.....	93

4.2.2. ábra: Freundlich- és Langmuir-izotermák	93
4.2.3. ábra: Méretkizárás porózus adszorbensnél.....	94
4.2.1.1. ábra: A fa szerkezete még felismerhető az aktív szénen	95
4.2.1.2. ábra: Az aktív szenet elszenesedett növényi sejtfalak alkotják	95
4.2.1.3. ábra: Ionizálható csoportok ioncserélő gyantán	96
4.2.1.4. ábra: A leggyakoribb ioncserélő gyantatípusok	96
4.2.1.5. ábra: Titrálási görbék.....	97
4.2.1.6. ábra: A zeolitok szerkezete.....	97
4.2.1.7. ábra: Ionok hatása a zeolitok pórusméretére	98
4.2.2.1.1. ábra: Az adszorpció munkavonala.....	99
4.2.2.2.1. ábra: Folytonos reaktor szűrővel	99
4.2.2.3.1. ábra: Adszorpció töltött oszlopban.....	101
4.2.2.3.2. ábra: Az áttörési profil kialakulása.....	102
4.2.2.3.3. ábra: Adszorpciós oszlopok telepe	103
4.3.2.3.1. ábra: A dialízis elve	106
4.3.2.4.1. ábra: Az elektrodialízis elve	107
4.3.2.5.1. ábra: A bipoláris elektrodialízis elve.....	109
4.3.2.6.1. ábra: A membránműveletek mérettartománya	109
4.3.2.6.2. ábra: Az ultraszűrő membrán keresztmetszete és a különböző részecskék méretviszonyai	110
4.3.2.6.3. ábra: A reverz ozmózis és az ultraszűrés összehasonlítása	111
4.3.2.6.4. ábra: Az ozmózis megfordítása nyomással	111
4.3.3.1. ábra: Az ideális diffúziós koncentrácioprofil	113
4.3.3.1.1. ábra: Koncentrációs polarizáció	116
4.3.3.2.1. ábra: Gélpolarizáció	117
4.3.4.1.1. ábra: Nyomásmérési pontok membránszűrőnél	118
4.3.4.1.2. ábra: A nyomáskülönbség hatása a membránszűrés sebességére	119
4.3.4.2.1. ábra: Az áramlási viszonyok hatása	119
4.3.4.3.1. ábra: A fehérjekoncentráció hatása a membránszűrés sebességére	120
4.3.4.4.1. ábra: Az új membrán tulajdonságainak változása	121
4.3.4.4.2. ábra: A membrán „előéletének” hatása	121
4.3.5.1.1. ábra: Vágási görbék.....	123
4.3.5.1.2. ábra: Membránszűrő berendezés folyamatábrája	123
4.3.5.2.1. ábra: Koncentráló membránszűrés folyamatábrája	124
4.3.5.4.1. ábra: A membránszűrés munkavonala.....	128
4.3.5.4.2. ábra: Teljes és szűrt fermentlé membránszűrésének összehasonlítása	129
4.3.5.5.1. ábra: A diaszűrés folyamatábrája	129
4.3.5.5.2. ábra: A koncentrációk változása diaszűrés során	131

4.3.5.7.1. ábra: A folyamatos ultraszűrés elve	132
4.3.5.7.2. ábra: Háromlépcsős ultraszűrés sémája.....	133
4.3.6.1.1. ábra: Anizotróp membrán metszete	134
4.3.6.1.2. ábra: Üregesszál-membrán keresztmetszete, belső felületén az aktív szűrőréteg (katalógusfotó).....	135
4.3.6.3.1. ábra: Keretes síkmembránok	136
4.3.6.3.2. ábra: Keretes membránszűrő (katalógusfotó).....	136
4.3.6.3.3. ábra: Spirálmodul belső felépítése.....	137
4.3.6.3.4. ábra: Csőmembránok elrendezése	138
4.3.6.3.5. ábra: Csőmembránmodul – analóg a csőköteges hőcserélővel	138
4.3.6.3.6. ábra: Szétszerelt üregesszál-ultraszűrő modul.....	138
4.3.6.3.7. ábra: Nagyméretű üregesszál modulok sejtek kiszűrésére	139
4.3.6.3.8. ábra: Kerámiamodul aktív és hordozó rétege	140
4.3.6.3.9. ábra: Szinterezett nikkemembrán elektronmikroszkópos képe	140
4.3.6.3.10. ábra: Kerámia membrántestek (katalógusfotó).....	141
4.3.6.3.11. ábra: Házba épített kerámia membránszűrők (katalógusfotó)	141
4.3.7.1. ábra: A gáz-folyadék határfelület kapillárisban	142
4.3.7.2. ábra: A buborékpont meghatározás térfogatáram-görbéje	143
4.4.1.1.1. ábra: A fehérjék töltése a pH függvényében	145
4.4.1.1.2. ábra: Fehérje oldhatósága a pH függvényében.....	145
4.4.1.2.1. ábra: Etanosos vérplazma frakcionálási eljárások	146
4.4.1.3.1. ábra: Beszórás és kisórás jelensége	148
4.4.1.5.1. ábra: Vonzási és taszítási potenciálok	152
4.4.1.5.2. ábra: Ionpárképzés polielektrolitokkal	153
4.4.1.5.3. ábra: Hídképző polimerekkel összekapcsolt csapadékszemcsék.....	153
4.4.2.1.1. ábra: Azonos molekulákból többféle lehetséges kristályalak jöhet létre.....	155
4.4.2.1.2. ábra: A túltelítés tartományai	155
4.4.2.2.1. ábra: A mosás hatékonysága	159
4.4.2.3.1. ábra: Optimált hőfokprofil.....	160
4.4.2.3.2. ábra: Folytonos kristályosító	161
4.4.2.4.1. ábra: Ismételt átkristályosítás	162
4.4.2.4.2. ábra: Frakcionált átkristályosítás.....	163
4.4.2.5.1. ábra: Az inzulin kristályosítási lehetőségei	164
4.4.2.5.2. ábra: Fehérjekristályok kapillárisban	165
4.4.2.5.3. ábra: Géldiffúziós túltelítés	165
4.4.2.5.4. ábra: Gőzdiffúziós kamra	165
5.1.1. ábra: Különböző ligandumok kötése epoxihordozóhoz	166
5.1.2. ábra: Az affinelválasztások jellemző lépései.....	167

5.1.1.1. ábra: Távtartó molekulaszakasz kialakítása	168
5.1.1.2. ábra: Affinkromatográfia-1	169
5.1.1.3. ábra: Affinkromatográfia-2	169
5.1.1.4. ábra: Affinkromatográfia-3	170
5.1.1.5. ábra: Festékligandumokkal borított szűrőmembrán	172
5.1.2.1. ábra: Az affin-ultraszűrés elve.....	172
5.1.3.1. ábra: Az affinextrakció elve	174
5.1.4.2.1. ábra: Az affinkicsapás elve.....	178
5.1.4.2.2. ábra: Kézmeleg hatására kicsapódó N-izopropil-akrilamid	180
5.1.5.1. ábra: NAD és a Cibacron Blue F3G-A szerkezetének összehasonlítása	181
5.1.5.2. ábra: Festékligandumok kémiai szerkezete (katalógusoldal)	182
5.1.5.3. ábra: Ni-nitrilo-triacetsav ligandum	182
5.1.5.4. ábra: A (His) _n lánc és a Ni ligandum kapcsolódása.....	183
5.2.1. ábra: Töltéssel rendelkező részecskék elmozdulása elektromos erőterben	183
5.2.1.1. ábra: A szabadon folyó elektroforézis működési elve.....	185
5.2.1.2. ábra: A lamináris áramlás által okozott sávtorzulás	186
5.2.1.3. ábra: Fehérjék töltése a pH függvényében	188
5.2.2.1. ábra: Elválasztás gélelektroforézissel.....	189
5.2.2.1.1. ábra: Az SDS mintaelőkészítés folyamata	190
5.2.2.2.1. ábra: Géltartó egység.....	190
5.2.2.2.2. ábra: Gélelektroforézis-berendezés (katalógusfotó).....	191
5.2.2.3.1. ábra: A poli-akrilamid gél kialakítása	191
5.2.2.3.2. ábra: Futtatás homogén és gradiens géleken	192
5.2.2.3.3. ábra: Minta tömörítése discontinuous gélben	193
5.2.2.3.4. ábra: A disc gél elektromos tulajdonságai.....	193
5.2.2.4.1. ábra: A futási távolság és a molekulaméret kapcsolata	194
5.2.2.4.2. ábra: Molekulatömeg meghatározása kalibrációs sorozat segítségével.....	195
5.2.3.1. ábra: Kapilláris-elektroforézis készülék felépítése.....	196
5.2.3.1.1. ábra: A felületi potenciál kialakulása töltött felületen.....	196
5.2.3.1.2. ábra: Elektroosztatikus áramlás sebességprofilja.....	197
5.2.3.1.3. ábra: A pH hatása az elektroosztatikus áramlásra.....	197
5.2.3.2.1. ábra: Szétválasztás a kapilláris elektroforézisben	198
5.2.3.2.2. ábra: Kapilláris elektroforézis felvétel	199
5.2.3.3.1. ábra: Az ionerősség hatása az áramlási sebességre	200
5.3.1. ábra: A porlasztva szárító felépítése.....	201
5.3.2. ábra: Fizikai paraméterek változása a párolgás során	202
5.3.3. ábra: Bepárolt cseppekből képződő szemcsék	202

5.3.4. ábra: Szabálytalan alakú szemcsék.....	202
5.3.5. ábra: Egyenáramú és kevert áramú porlasztva szárító berendezések	203
5.3.1.1. ábra: Mechanikus porlasztófej.....	203
5.3.1.2. ábra: Pneumatikus porlasztófej.....	204
5.3.1.3. ábra: Forgótárcsás porlasztófej.....	205
5.3.1.4. ábra: A porlasztott cseppek méreteloszlása	206
5.3.2.1. ábra: A cseppek mozgása tárcsás porlasztóban	207
5.3.2.2. ábra: A cseppátmérő hatása a fékezési szakasz hosszára	208
5.3.3.1. ábra: A szemcseméret és a felületi feszültség kapcsolata.....	209
5.3.3.2. ábra: A kerületi sebesség hatása a szárított por szemcseméretére	209
5.3.3.3. ábra Linearizált kapcsolat a sebesség és a cseppméret között.....	210
5.3.3.4. ábra: A koncentráció hatása a szemcseméretre	210
6.1.1. ábra: Zárványtestek E. coli-ban.....	212
6.1.1.1. ábra: A folding és a zárványképződés alternatív utak	213
6.1.2.4.1. ábra: A folding az endoplazmás retikulumban megy végbe.....	215
6.1.2.4.2. ábra: A folding folyamata és mellékreakciói.....	215
6.1.2.4.3. ábra: A fehérjehajtogatási formák energia- és entrópiaviszonyai.....	216
6.1.2.4.4. ábra: A diszulfidhidak újrapcsolódása.....	217
6.1.2.6.1. ábra: A béta interferon lehetséges diszulfidhídjai	218
9.1. ábra: Az ionok Hofmeister-sorozata.....	228

Animációk

2.2.2.1.1. animáció	33
2.2.2.3.1. animáció	36
3.3.3.1. animáció: A sejtfeltárás kinetikai görbéi.....	56
4.2.2.2.1. animáció: Tranziensek folytonos reaktorban.....	100
4.2.2.3.1. animáció: A koncentrációk alakulása adszorpciós oszlopon.....	102
4.3.1.1. animáció: Anyagtranszportok membránon.....	104
4.3.2.6.1. animáció: A membránszűrések összehasonlítása	110
4.3.3.1.1. animáció: A koncentrációs polarizáció kialakulása.....	115
4.3.5.4.1. animáció: A munkapont végighalad a munkavonalon	128
4.3.5.7.1. animáció: Többlépcsős ultraszűrés méretezése	133
4.4.1.5.1. animáció: A gócnövekedési mechanizmusok összehasonlítása	151
4.4.2.2.1. animáció: A méret- és tömegarányok változása a kristálynövekedés során.....	158
5.1.1.1. animáció: Az affinkromatográfia működése	170
5.2.2.3.1. animáció: Elektroforézis homogén és gradiens gélekben.....	192
7.2.1. animáció: Citromsav-animáció.....	219
8.2.1. animáció: MAB kép-a-képben	224

Videók

2.2.2.3.1. videó: Lemezes centrifuga szétszerelése	35
3.4.1.1. videó: Ultrahangos sejtfeltárók	58
4.1.5.1. videó: Vizes kétfázisú extrakció	87
4.3.5.2.1. videó: Félüzemi ultraszűrő berendezés	125
4.3.6.3.1. videó: Membránmodulok	139
4.4.1.3.1. videó: Kollagén kisózása	149
5.1.1.1. videó: Affinkromatográfia a gyakorlatban	171

Táblázatok

2.1.1.1. táblázat: A szűréseket jellemző fogalompárok	11
2.1.3.1. táblázat: Szűrősegédanyagok jellemzői	15
2.1.3.2. táblázat: Szűrősegédanyagok és felhasználásuk	15
2.1.4.2.1. táblázat: Bacillus subtilis fermentlé szűrési adatai	18
2.1.4.3.1. táblázat: Jellemző szűrési sebességek vákuumszűrésnél	19
2.2.3.1. táblázat: Egyes biológiai rendszerek lecentrifugálásához szükséges Gt értékek (tájékoztató adatok)	41
2.2.3.2. táblázat: Centrifugatípusok összehasonlítása	41
2.3.1. táblázat	41
2.3.2. táblázat	45
2.3.3. táblázat: Szűrletterfogó és szűrési idők a fermentáció során	46
2.3.4. táblázat: Szűrési idők 30 cm³ szűrletnél	46
3.2.3.1. táblázat: Sejtfal szerkezet és gombarendszertan	51
3.4.3.1.1. táblázat: Feltárási hatások különböző tenyészetek esetén	67
3.4.5.1. táblázat: A jég kristálymódosulatainak adatai	71
3.4.6.1. táblázat: A gyöngymalmok energiafelhasználása	72
3.4.6.2. táblázat: A nagynyomású homogenizátorok energiafelhasználása	72
3.5.3.1. táblázat: Sejtfalakat bontó specifikus enzimek	76
3.6.1. táblázat: Különböző típusú mikroorganizmusok relatív érzékenysége	78
4.1.4.1.1. táblázat: Oldószerek polaritási sora	83
4.1.4.2.1. táblázat: Néhány extrakcióval kinyert antibiotikum pK_d értéke	84
4.1.4.2.2. táblázat: A tetrabutil-ammónium sók megoszlása kloroform-víz rendszerben	85
4.3.2.1. táblázat: A membrános elválasztások csoportosítása	105
4.3.5.3.1. táblázat: Sajtgyári savó ultraszűrése	127
4.3.5.5.1. táblázat: Kis molekulatömegű anyagok eltávolítása diaszűrés során	131
4.3.5.6.1. táblázat: Diaszűrés hatása a makromolekulák tisztaságára	132
4.3.5.7.1. táblázat: Sajtgyári savó koncentrációja 35%-ra 180 egyforma szűrőfelületű modulból álló ultraszűrő berendezésen	134

4.4.1.2.1. táblázat: A Cohn-frakciók adatai.....	147
4.4.1.4.1. táblázat: A két enzim hődenaturálódásának kinetikai állandói	150
4.4.1.4.2. táblázat: A két enzim maradék aktivitása 10 perces hőkezelés után	150
4.4.2.2.1. táblázat: A méret- és tömegarányok változása a kristálynövekedés során.....	159
5.1.1. táblázat: Affinkölcsönhatásra képes reakciópartnerek	166
5.2.1.1. táblázat: FFE-elválasztás technikai problémái és kiküszöbölésük	187
7.2.4.1. táblázat: A trikálcium-citrát oldhatósága a hőmérséklet függvényében.....	221