

SEJTFELTÁRÁS

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

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

Milyen erős a sejtfal?

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

Mekkora ez?

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

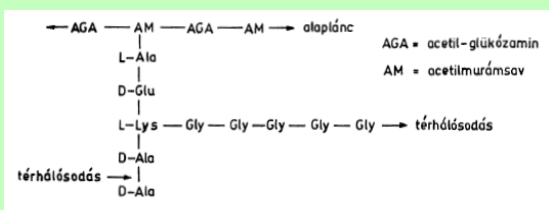


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

A SEJTFAL

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

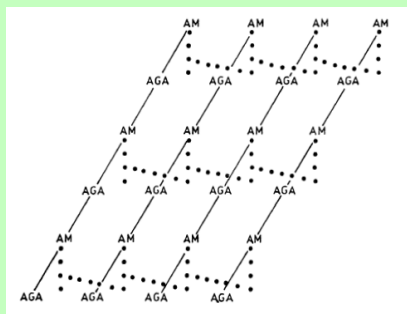


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

A SEJTFAL

Térhálósodás:
a peptid oldalláncokon keresztül
(penicillin!)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

AZ ÉLESZTŐK SEJTFALA

Glükán- és mannán-fehérje komplex rétegek

The diagram illustrates the cell wall of yeast (Saccharomyces cerevisiae). It shows a cytoplasm (CITOPLAZMA) containing proteins (PROT) and enzymes (ENZIM). The cell wall is composed of several layers: an inner layer of mannose (M) and glucose (G) units, a middle layer of proteins (PROT) cross-linked with disulfide bonds (S-S), and an outer layer of mannose (M) and glucose (G) units. The outermost layer is labeled MANNÁN and the innermost layer is labeled GLUKÁN. The entire structure is bounded by a MEMBRÁN (membrane).

4

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A PENÉSZEK SEJTFALA

Több réteg, változatos kémiai összetétel:

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

The diagram shows the cell wall of Neurospora crassa, a filamentous fungus. It consists of several distinct layers, labeled (a) through (d). Layer (a) is the outermost layer, (b) is a network of glycoproteins with protruding glucan particles, (c) is a layer of chitin, and (d) is the innermost layer containing a network of microfibrils.

A *Neurospora crassa* sejtfalának vázlatos szerkezete.
Az egyes rétegek:
(a) külső α- és β-glukan réteg.
(b) glükoprotein hálózat, benyúló glükán részecskék
(c) túlnyomórészt fehérjéből álló réteg
(d) kitines réteg, fehérjébe ágyazott mikrofilumok

5

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

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

$$\frac{dP_1}{dt} = -kP_1$$

P_1 a sejten belül lévő termék koncentrációja

Sztérválasztással integrálva a P_1 időben exponenciálisan csökken.

$$\int_{P_{10}}^{P_1} \frac{dP_1}{P_1} = - \int_0^t k dt$$

Praktikusan inkább a kinyert termékmennyiséget fejezzük ki:

$$R = P_{10} - P_1$$

6

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

A kinyert termék mennyisége ekkor így alakul:

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

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

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

ahol:
S – specifikus aktivitás

7

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

Az inaktíválódás is exponenciálisan megy végbe:

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

Az eredő termékkihozatal a két tényező kombinációjával fejezhető ki:

$$R_e = RS$$

azaz:

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

A konstansokat összevonva:

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

8

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

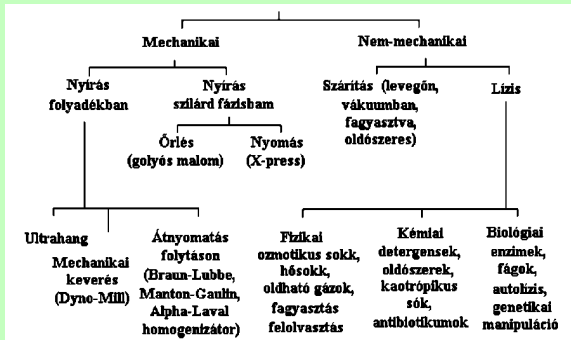
A SEJTFELTÁRÁS KINETIKÁJA

Kísérleti eredmények: van optimális feltárási idő

9

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A SEJTFELTÁRÁS MÓDSZEREI



ULTRAHANGOS FELTÁRÁS

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

Csak laborban.



SONOPULS HD 2070

GYÖNGYMALMOK

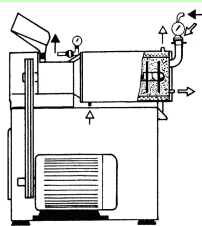
Festékipari pigment-homogenizátorok

0,1-2 mm kopásálló üveggyöngyök

Dörzsölő-koptató hatás

Tárcsás keverők

- SZUSZPENZIÓ
- ⇒ ÜVEGGYÖNGYÖK
- HŐFOKSZABÁLYOZÁS



GYÖNGYMALMOK

Előnyök:

- Folytonosítható
- Léptéknövelhető

Hátrányok:

- Nagy energiafogyasztás (+ hűtés)





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

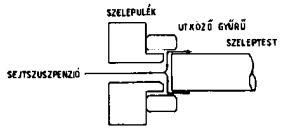
16

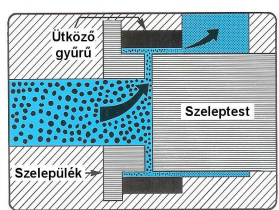
NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK


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

Feltárási mechanizmusok:

- áramlási
- ütközési







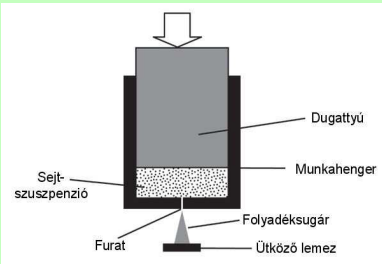
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


17

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Szakaszos megoldás (French press)

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



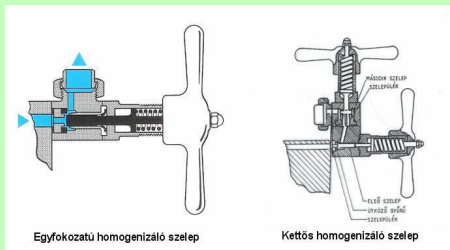


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

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



Egyfokozatú homogenizáló szelep

Kétfős homogenizáló szelep

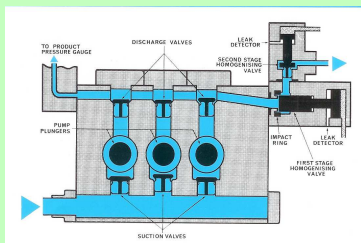
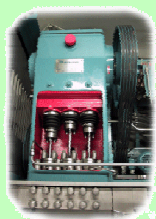


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Milyen szivattyú képes ilyen nyomást létrehozni?
 Csak a dugattyús.
 Az egyenletesebb működés érdekében 3 dugattyú dolgozik, fázistolással

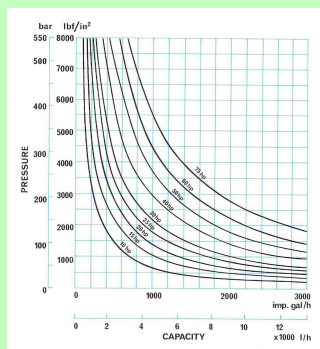


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

NAGYNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

A homogenizátor működési
 jelleggörbéje lényegében azo-
 nos a szivattyúéval.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

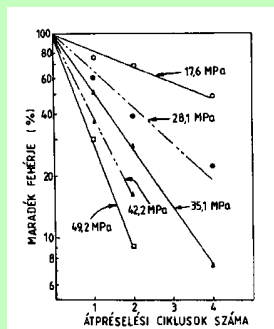
21

NAGNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Rendszerint többszöri átnyomatásra, cirkuláltatásra van szükség (Hűtés!)

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

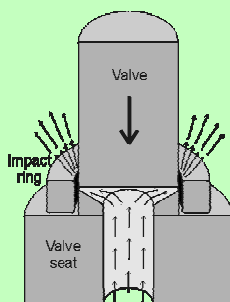
NAGNYOMÁSÚ HOMOGENIZÁTOROK

Előnyök:

- > Folytonosítható
- > Léptéknövelhető

Hátrányok:

- > Nagy energiafogyasztás
- > masszív szerkezet
- > eltömődésveszély



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

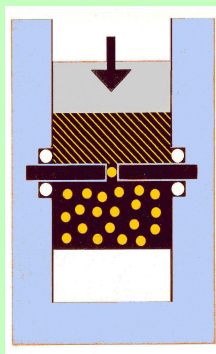
23

X-PRESS

A sejtuszpenziót fagyott állapotban préselik át egy furaton.

Hogyan lehetséges ez?

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

A JÉG FÁZISDIAGRAMJA

Az első hármaspont:
-22 °C, 211,5 MPa

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

25

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

X-PRESS

Előnyök:

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

Hátrányok:

- Szakaszos
- Robosztus szerkezet
- Nem léptéknövelhető

26

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

FIZIKAI MÓDSZEREK

Szárítás:
 A klasszikus hővel való szárítás egyrészt rossz feltárási határfokú, másrészt számos terméket denaturál. Inkább:
 Fagyasztva szárítás (liofilizálás) (védőközeggel - törzseltartás, enélkül - sejtfeltárás) nincs denaturálódás
 Oldószeres szárítás (acetonpor) készítés (kombinálható étterrel)

Fagyasztás – felolvasztás

Hősokk - vízben

27

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

FIZIKAI MÓDSZEREK

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

Oldószerekkel:

- Szárítás acetonnal, majd éteres kezelés
- Élesztő autólízis toluollal

Detergenszekkel:

- Beépülnek a sejtmembránba és rongálják annak szerkezetét.
- Kationos és anionos egyaránt
- Epesavak



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

FIZIKAI MÓDSZEREK

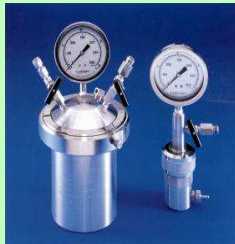
Dekompresszió

Henry törvény:

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

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

ENZIMES MÓDSZEREK

Sejtfalat bontó specifikus enzimek

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

Több komponensű készítmények

- csigaenzim - emésztőnedv
- *Trichoderma* indukált enzimek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

GENETIKAI MÓDSZEREK

Lizogén fágokkal
A lizogénia indukálható

Indukált autolízis, apoptózis



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 31
