

# IPARI KINYERÉSTECHNIKA GYAKORLAT BIOMÉRNÖK MSc

## I. SEJTFELTÁRÁS

Gyakorlatvezető: Molnár Ákos Péter,  
DE TEK Biomérnöki Tanszék, Kémia épület, Kísérleti üzem

### 1. SEJTFELTÁRÁS

A fermentációk során a mikroba sejtek által termelt vegyületek 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 egy része szerencsére extracelluláris, de sokuk a sejten belül helyezkedik el, ami azt jelenti, hogy a feldolgozási technológia egyik első lépése a sejtfeltárás kell, hogy legyen.

Igen változatos mechanikai, fizikai, kémiai és biológiai módszereket dolgoztak ki a mikroorganizmusok feltárására. 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 feltárás körülményei között
- a feltárás 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 kihozatalt.

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 irányelvek és a kísérleti eredmények együttesen alapozhatják meg egy új feltárási lépés optimalizálását.

#### 1.1. Laboratóriumi feltárási technikák

Laboratóriumi léptékben a sejtfeltárás műveletét évtizedek óta gyakorolják, és sokféle módszert fejlesztettek ki. Ezeknél egyrészt a maximális feltárási hatékonyságot, másrészt a kinyert anyagok minimális károsodását tartották szem előtt. A módszerek több célt szolgáltak, így a sejt szerkezetének és működésének kutatását, valamint a tisztított enzimek vagy más sejtalkotók kinyerését.

#### 1.2. Mechanikai módszerek

A mikrobasejtek feltárására gyakran választanak mechanikai módszereket, mivel ezekkel nagyobb mennyiségű sejtet is gyorsan fel lehet dolgozni. A műveletek alapja, hogy a sejteket nagy nyírófeszültségnek teszik ki, amit fojtáson való átpréseléssel, erőteljes keveréssel vagy ultrahanggal hoznak létre. A legtöbb esetben a hővé alakuló mechanikai energia eltávolítására hűtést is alkalmaznak.

Az egyik leggyakrabban használt laboratóriumi módszer az **ultrahangos kezelés**. A sejtek károsodását a kavitációs hatások okozzák. Az összeroppanó buborékok által keltett lökéshullámok örvényeket keltenek, és ezek nyírófeszültsége okozza a sejtek károsodását. Az ultrahangos kezelés statisztikusan hat a sejtekre, sok kis, lokális "koptató" hatás összegeződik. Az ultrahangos roncsolók általában 15 - 25 kHz frekvencián működnek, a bevitt teljesítmény változtatását legtöbbször az amplitúdó szabályozásával érik el. A berendezés elektromos hullámokat gerjeszt, és ezeket alakítja át mechanikai rezgésekké. A feltárás során a sejtszuspenziót tartalmazó edényt jéggel, vagy cirkuláló hűtőközeggel hűtik.

**A sejtszuspenzió átpréselése nagy nyomással egy túszelepen** szintén gyakran alkalmazott feltárási módszer. A mintát acél hengerben dugattyúval nyomják át a fojtáson, miközben a nyomást állandó értéken tartják (a legnagyobb leírt üzemi nyomás 210 MPa). A művelet során a szelep és az anyag felmelegszik, ami denaturálódást okozhat. Ezt elkerülendő, hűtött gázokkal (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) tartják a hőmérsékletet. A nyomás szabályozása manuálisan és automatikusan is megoldható. A legfejlettebb modellek (pl. Servall-Ribi Fractionator) az újratöltést is automatikusan hajtják végre. A szűkítésen áthaladó folyadékban igen nagy sebesség gradiens alakul ki, ez erőteljes nyírást is jelent, ami szétszakítja a sejteket illetve a homogenizálásnál a cseppeket.

Csak látszólag azonos módszer a **fagyasztott sejtszuspenzió átpréselése** egy hasonló készülékben (Hughes press, X-press). A hengerbe fagyasztott szuszpenziót a dugattyú extrém nagy nyomással kényszeríti át egy szűk furaton. A szilárd jég ilyen körülmények között plasztikusan viselkedik, és áthalad a résen. 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.

Ismét más feltárási technika a minta intenzív **kevertetése üvegyöngyökkel**. Egyszerűbb esetekben már egy turmixgépben megfelelő feltárást lehet elérni. Jobb hatásúak a speciálisan feltáráshoz készült eszközök (Mickle disintegrator, Braun homogenizer). Mindegyik megoldásnál a fő nehézség a hőmérséklet gyors emelkedése, bár hűtéssel ez némileg kompenzálható. Valamivel nagyobb anyagmennyiségek esetén laboratóriumi kolloid malmokat, vagy nagysebességű golyós malmokat alkalmazhatunk. A fejlettebb készülékek hűthetők, és folytonos üzemben is működtethetők.

Több roncsolási mechanizmus működik egymás mellett, az egymáshoz dörzsölődő gyöngyök koptató, nyíró hatása fokozatosan elvékonyítja, majd eltünteti sejtfalet. 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 nem csak a feltárás mértékét befolyásolják, hanem a teljesítményfelvételt is.

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

A sejt koncentráció változtatásával szerzett tapasztalatok ellentmondásosak. Egyes esetekben a sejtszuspenzió koncentrációjának növelésével a feltárás is javult, máskor nem észleltek változást, vagy maximumos görbét kaptak. Jobban értelmezhetők a jelenségek, ha figyelembe vesszük, hogy a koncentráció hatása sebességfüggő, csak kis sebességeknél észlelhető,

nagyoknál elhanyagolhatóvá válik. Más értelmezés szerint a sejtszuszpenzióknak nem a koncentrációja számít, hanem a reológiai tulajdonságai.

A technikai paraméterek mellett 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 gyöngymalmok igen nagy előnye, hogy folytonos üzemben is működtethetők. A készülék egyik végén betáplált lé a másik végén kivezethető, az üveggyöngyök visszatartásával. A gyöngymalmok ipari léptékben is gyártott készülékek.

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 inaktiválódás lép fel, még akkor is, ha a működési hőmérséklet 5 °C. alatt tartják. Valószínűleg a nyírás, vagy más mechanikai hatások is denaturálódást okoznak.

Kis mennyiségű, néhány milliliternyi sejtszuszpenzió feltárását laboratóriumban **manuálisan** is elvégezhetjük. Ilyen eljárás lehet például a sejt-tömeg eldörzsölése porcelán mozsárban kvarchomokkal. Idő- és munkaigényes (15-30 perc egy minta feldolgozása), de fonalas gombák intracelluláris enzimeinek mérésénél bevált. Manuális eszközök az ún. **potterek**, amelyekben a feltárás két szorosan illeszkedő érdesített üvegfelület közötti dörzsöléssel történik.

### 1.3. Fizikai módszerek

Az egyik legkíméletesebb feltárási módszer az ozmotikus sokk. A sejteket nagy ozmózisnyomású oldattal (1 M glicerin, 1 M glükóz) hagyják kiegyenlítődni, majd hirtelen erősen meghígítják a szuszpenziót. Legegyszerűbben úgy valósítható meg, hogy a sejteket a tömény oldatból lecentrifugáljuk, a felülúszót dekantáljuk, és a leülepedett réteget nagy mennyiségű vízzel meghígítjuk. A sejtekbe behatoló víz erősen megnöveli a belső nyomást, amely szétszakíthatja a sejtfalat. Ez a módszer csak a leggyengébb falú sejtekre hatásos. Nagyon hasznos viszont kombinációban, enzimes kezelés vagy fáziszintézis gátlás után, esetleg az autolízis hatékonyságának javítására.

## 2. A SEJTFELTÁRÁS VIZSGÁLATA

Ha a mikrobajelvények 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.

### 2.1. 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. Sok minta esetén a mikroszkópos számlálás egyhangú és időrabló módszer. Az élesztők feltárásának mértéke elektronikus részecskeszámlálóval is mérhető, viszont a számlálók általában nem elég érzékenyek a jóval kisebb méretű baktériumok észleléséhez.

## 2.2. 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.

### 2.2.1. Vezetőképesség mérés

Sok hasonló mintában a feltárás mértékének gyors, közelítő meghatározására a vezetőképesség mérésén alapuló módszereket alakítottak ki. A módszer alapja, hogy a feltárt sejtek citoplazmájából a vizes fázisba kerülő anyagok megváltoztatják a folyadék vezetőképességét. Bizonyos tartományban a vezetőképesség lineárisan növekszik a feltárás mértékével. A módszert kalibrálni kell más meghatározásokkal, mert csak relatív értékeket ad. Másrészt lényeges a standardizálás, mert a mérési eredmények erősen függenek a mikroorganizmusok típusától és a környezeti paraméterektől, mint a sejt koncentráció, hőmérséklet és az elektrolitkoncentráció. Így a módszer csak akkor látszik használhatónak, ha a feltárás mértékén kívül minden paramétert állandó értéken tartanak.

A vezető képesség az oldat elektromos ellenállásának reciproka, amelyet két, egyenként  $1 \text{ cm}^2$  felületű elektród közti oldatra vonatkoztatnak  $1 \text{ cm}$  elektród távolság mellett. A fajlagos vezető képesség egysége az  $1 \text{ cm}$ -re vonatkoztatott elektromos vezetőség:  $\text{mS/cm}$ .

Forrás: [www.doksi.hu](http://www.doksi.hu)

Dr. Pécs Miklós, (Budapesti Műszaki Egyetem): A biológiai iparok elválasztási műveletei - Sejtfeltárás. Oktatási segédanyag

## 3. A GYAKORLAT

### 3.1. A gyakorlat célja:

- Különböző típusú sejtfeltérési technikák megismerése, alkalmazása és összehasonlítása baktérium sejt, illetve fonalas gomba micélium feltérására.

Módszerek: mechanikai: **potter**

**kevertetés üveggyönggyel** (kis mennyiségű minta –  $0,5 \text{ ml}$ , és nagy mennyiségű minta –  $100 \text{ ml}$  feltérására alkalmas eszközökkel)

fizikai: **ozmotikus sokk**.

- A sejtfeltérás nyomon követése fehérje tartalom, enzimaktivitás és vezetőképesség méréssel.

- A megadott kalibrációs egyenesek alapján meghatározni a sejtekből kiszabadult fehérje, ill. enzim mennyiségét mg/ml és U/mg egységben.

### 3.2. Berendezések, módszerek:

- Centrifuga: Sartorius Sigma 2-16K, eppendorf centrifuga
- Gyöngymalom: 1. Biospec Bead-Beater (100-500 ml minta feltárására)  
2. Disruptor Genie, Scientific Industries (0,2-1 ml minta feltárására)
- Potter
- Vezetőképesség mérő: Mettler Toledo FiveGo Conductivity Meter FG3
- Fotométer
- Alkalmazott mikroorganizmusok:  
baktérium: *Pseudomonas putida F1*  
gomba: *Penicillium chrysogenum*.  
Az előző nap fermentálással előállított mikroba tenyészeteket a gyakorlat elején lecentrifugálva (baktérium tenyészet), leszűrve (gomba tenyészet) kapják meg a hallgatók.
- Fehérjetartalom mérés: Folin reagenssel  
Reakció: Minta: 1 ml  
– 1 ml minta + 1 ml Reagens A → 10 percig áll szobahőn  
– majd 0,5 ml Reagens B hozzáadása → 30 percig áll szobahőn  
– fotometrállás 750 nm-n.  
Reagens A: 1 tf. I. oldat  
2 tf. 5 % SDS  
1 tf. 0,8 M NaOH oldat  
Reagens B: 1 tf. 2N Folil-cioalceu fenol reagens  
5 tf. deszt. víz
- $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mérés:  
500  $\mu$ l mérendő mintát előinkubálunk vízfürdőben 30 °C-n 5 percig, majd 500  $\mu$ l szubsztrát oldatot (6 mM o-nitro-fenil-galaktozid) pipettázunk hozzá, mellyel elindítjuk az enzimes reakciót. A reakció 30 percig folyik, 30 perc után leállítjuk 2 ml Na-borát puffer (pH 10) hozzáadásával. Az oldat abszorbanciáját mérjük fotométeren 400 nm-n.

### 3.3. Sejtfeltárás:

- Baktérium sejtek feltárása ozmotikus sokkal:  
Kimérünk 0.4 g lecentrifugált *P. putida* sejtuszpenziót műanyag centrifuga csőbe és hozzáadunk 5 ml 1 M glükóz oldatot. Összerázás után 5 percig állni hagyjuk, majd lecentrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, 5 ml desztillált vizet adunk hozzá, ismét 5 percig áll. A keletkezett zavaros szuszpenziót ismét centrifugáljuk, a felülúszóból fehérje tartalmat mérünk. Az összehasonlító oldat hasonló kezeléssel megy keresztül azzal a különbséggel, hogy mindkétszer deszt. vízzel töltjük fel.  
Összehasonlítjuk a feltáratlan és a feltárt minták fehérjetartalmát (100  $\mu$ l mérendő minta).

- Baktérium sejtek feltárása laboratóriumi homogenizátorral:

Kimérünk 0.5 g lecentrifugált *P. putida* sejtuszpenziót műanyag centrifuga csőbe és hozzáadunk 5 ml Na-foszfát puffert (pH 7). Két eppendorf csövet megtöltünk 1 ml térfogatú üveggyönggyel, majd mindkettőbe 0,75 ml sejtuszpenziót pipetázunk. A sejteket kevertetjük a gyöngyökkel 5 percig, lecentrifugáljuk, s a felülúszóból fehérje koncentrációt mérünk (50 µl mérendő minta).

Az összehasonlító oldat az eredeti, pufferrel feltöltött sejtuszpenzió felülúszója lesz.

A feltárás hatékonyságát összehasonlítjuk a két különböző időpontú kevertetés esetében, illetve összevetjük az ozmotikus sokk hatékonyságával.

- Fonalas gomba micélium feltárása potterrel:

Ha a *Penicillium chrysogenum*-t laktóz tartalmú táptalajon növesztjük, β-galaktozidáz enzimet termel, mind extra-, mind intracellulárisan. A szűréssel megszabadulunk az extracelluláris enzimtől, tehát a potterezés után mért enzimaktivitás csak a sejtől kiszabaduló β-galaktozidáz aktivitást fogja mutatni.

10 ml fermentléből szűréssel távolítjuk el a gomba micéliumot. A kapott sejtömeget átkaparjuk műanyag centrifuga csőbe, melybe előzőleg 5 ml Na-foszfát puffert (pH 5,0) mértünk. Ezt az oldatot öntjük a potter készülékbe. Jégen tartva a mintát, 5 percig potterezzünk, majd centrifugálunk. A felülúszóból enzimaktivitást mérünk (500 µl mérendő minta).

Összehasonlító oldat a leszűrt, pufferben felvett micélium felülúszója.

- Fonalas gomba micélium feltárása gyöngymalommal:

100 ml fermentléből szűréssel távolítjuk el a gomba micéliumot. A kapott sejtömeget felvesszük 60 ml Na-foszfát pufferben (pH 5,0). A gyöngymalomba teszünk 120 ml térfogatú üveggyöngyöt. (Az üveggyöngyök átmérője: 500 µm.). Majd beletesszük a sejtuszpenziót (üveggyöngy : sejtuszpenzió arány kb. 80 % legyen). A homogenizátor külső köpenyébe jeget teszünk, mivel a minta az intenzív kevertetéstől felmelegszik Kb. 5 percig „turmixolunk” majd leállítjuk a keverést.

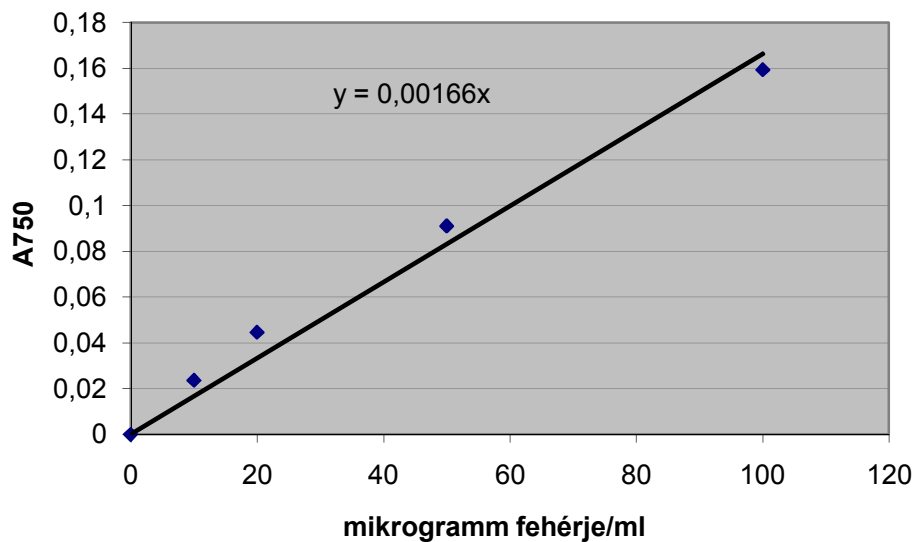
Megmérjük a minta vezetőképességét és enzimaktivitását (100 µl mérendő minta) feltárás előtt és után. Összehasonlító oldat a leszűrt, pufferben felvett micélium felülúszója.

- A jegyzőkönyv tartalmazzon:
  - rövid elméleti bevezetést, az alkalmazott módszerek bemutatásával
  - a gyakorlat leírását és a szerzett tapasztalatokat.

Felhasznált forrás, irodalom: Dr. Pécs Miklós: Feldolgozási műveletek-Sejtfeltárás

Kalibrációs egyenesek:

### Fehérje kalibráció Folin reagenssel



### o-nitrofenolát kalibráció beta-galaktozidáz aktivitás méréshez

