

# Fermentációs műveletti gyakorlatok

## Karaffa Levente

Készült: Debreceni Egyetem  
Biomérnöki Tanszék  
Debrecen  
2015

Terjedelem: 148 oldal

Kézirat lezárva: 2015.10.29.

*A tananyag elkészítését a Munkaerő-piaci igényeknek megfelelő, gyakorlatorientált képzések, szolgáltatások a Debreceni Egyetemen Élelmiszeripar, Gépészet, Informatika, Turisztika és Vendéglátás területen (Munkaalapú tudás a Debreceni Egyetem oktatásában) **TÁMOP-4.1.1.F-13/1-2013-0004** számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.*

**SZÉCHENYI** 



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

Európai Unió  
Európai Szociális  
Alap



**BEFEKTETÉS A JÖVŐBE**

Szeretnénk megköszönni a lektorálásban nyújtott segítséget Sipos Gábornak  
(fejlesztő analitikus - EGIS Gyógyszergyár Zrt)

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>FERMENTÁCIÓS MŰVELETEK ELŐKÉSZÍTÉSE A LABORATÓRIUMBAN</b> .....	<b>5</b>
2.1	STERILEZÉSI MÓDOK .....	5
2.1.1	<i>Kémiai módszerek</i> .....	5
2.1.2	<i>Fizikai módszerek</i> .....	6
2.1.2.1	Nedves hővel .....	6
2.1.2.2	Száraz hővel hőlég sterilizátorban .....	17
2.1.2.3	Nyílt lángban .....	17
2.1.2.4	UV fényvel .....	18
2.1.2.5	Szűrővel.....	19
2.2	LABORATÓRIUMI ÜVEGFERMENTOR FELÉPÍTÉSE .....	21
2.2.1	<i>Az INEL BR92K fermentor összeszerelése</i> .....	21
2.2.2	<i>Inel BR92K blokkfermentor</i> .....	32
2.2.3	<i>Fermentor leoltása</i> .....	41
2.2.4	<i>Mintavétel a fermentorból:</i> .....	42
2.3	LABORATÓRIUMI 15 LITERES FÉMFERMENTOR FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDTETÉSE .....	43
2.3.1	<i>Sterilezés előtti feladatok</i> .....	43
2.3.2	<i>pH kalibráció</i> .....	52
2.3.3	<i>Oldott oxigén elektróda kalibrációja</i> .....	61
2.3.4	<i>Csővek előkészítése sterilezésre</i> .....	69
2.3.5	<i>A fermentor in situ sterilezése</i> .....	71
2.3.6	<i>Fermentáció kivitelezése a 15 literes fémfermentorban</i> .....	76
<b>3</b>	<b>A SEJTNŐVEKEDÉS KINETIKAI LEÍRÁSA</b> .....	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>FONALAS GOMBA FERMENTÁCIÓ GYAKORLATI LEÍRÁSA</b> .....	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>BAKTÉRIUM FERMENTÁCIÓ GYAKORLATI LEÍRÁSA</b> .....	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>KEMOSZTÁT ELVŰ FERMENTÁCIÓ GYAKORLATI MEGVALÓSÍTÁSA LABORATÓRIUMI LÉPTÉKBEN</b> .....	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>DOWNSTREAM MŰVELETEK</b> .....	<b>111</b>
7.1	SZŪRÉS.....	111
7.2	SEJTFELTÁRÁS.....	121
7.3	BÉTA-GLÜKOZIDÁZ ENZIM TISZTÍTÁSA VIZES KÉTFÁZISÚ EXTRAKCIÓVAL .....	129
7.4	LIZOZIM ENZIM KINYERÉSE ÉS TISZTÍTÁSA TOJÁSFEHÉRJÉBŐL IONCSERELŐ KROMATOGRÁFIA ALKALMAZÁSÁVAL .....	136
7.5	ÉLESZTŐ TENYÉSZET LIOFILEZÉSE.....	141
<b>8</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>147</b>

# 1 Bevezetés

A biomérnökök feladata a biotechnológia eredményeinek gyakorlati megvalósításához szükséges műveletti problémák megoldása, melyhez magas színvonalú, komplex – műszaki és biológiai – ismeretek szükségesek. Az eljárások során technológiai lépéseket terveznek, a felmerülő problémákra költséghatékony megoldást keresnek és a már működő technológiákat optimális szinten üzemeltetik.

Jegyzetünk a DE TTK Biomérnöki alapszakán oktatott „Biomérnöki műveletek és folyamatok”, valamint a mesterszakon oktatott „Ipari kinyeréstechnika” laborgyakorlatok elsajátításához, elmélyítéséhez és a vizsgákra való felkészüléshez nyújt ismeretanyagot. A jegyzet első része az upstream műveletek során alkalmazott eljárásokat: a mikrobaszaporodás alapösszefüggéseit, a fermentációs technikák megvalósítását, a sterilizációs műveleteket tartalmazza, melyek a biomérnökök által megvalósított folyamatok alapját képezik. A hallgatók megismerkednek a bioreaktorok/fermentorok üzembe helyezésével, és működtetésével kapcsolatos alapismeretekkel. A hallgatói gyakorlatokon végrehajtandó batch (szakaszos) és kemosztát (folytonos) elven működő fermentációs technológiák bemutatása és megvalósításának lépéseihez nyújt ismereteket. A második része a jegyzetnek a fermentlevek feldolgozásához és a termékek kinyeréséhez kapcsolódó folyamatok, úgynevezett downstream műveletek gyakorlati megvalósításaihoz szükséges ismereteket tartalmazza. A downstream műveletek fejezet egy-egy, a gyakorlaton is végrehajtandó folyamatot mutat be: keresztáramú tangenciális szűrést, sejteltávolítást, vizes kétfázisú extrakciót, enzim tisztítását ioncserélő kromatográfián és a liofilizálás alapjait.

A jegyzet megírásának legfőbb célja, hogy a gyakorlatok során megismerhető lépések és eljárások összefoglalásaként szolgálja a hallgatók eredményesebb felkészülését és a szakmai tárgyak elmélyítését.

## 2 Fermentációs műveletek előkészítése a laboratóriumban

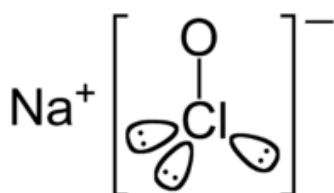
### 2.1 Sterilizési módok

Sterilizés fogalma: Eszközök és anyagok teljes spóra és csíramentesítését jelenti.

A sterilizés többféle módon is kivitelezhető.

#### 2.1.1 Kémiai módszerek

##### Nátrium-hipoklorit



Vizes oldatában bomlás közben ( $\text{NaOCl} \rightarrow \text{NaCl} + \text{'O'}$ ) atomi oxigén (nascens oxigén 'O') szabadul fel, amely nagyon reakcióképes, erős oxidálószer. Alkalmas gombák, vírusok, baktériumok és endospórák elpusztítására.

37%-os formaldehid és technikai etanol (patosolv) 3:1 arányú keverékéke.



formaldehid-technikai etanos üveg

Fermentor leoltásához és fermentorból mintavételhez használjuk, hogy elkerüljük a befertőződését. A formaldehiddel körültekintően kell bánni. Ha használjuk gumikesztyűt, szemüveget és köpenyt kell viselni. Ha bőrre kerül, akkor gyorsan bő vízzel le kell mosni. Ha kiömlene, akkor gyorsan fel kell törölni és alaposan át kell szellőztetni a helyiséget.



Kerülni kell a belélegzését.

A formaldehid veszélyes tulajdonságai:

- Lenyelve mérgező.
- Belélegezve mérgező.
- Bőrrel érintkezve mérgező.
- Feltehetően genetikai károsodást okoz.
- Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.
- Rákot okozhat.
- Allergiás bőrreakciót válthat ki.
- Légúti irritációt okozhat.

## **2.1.2 Fizikai módszerek**

### **2.1.2.1 Nedves hővel**

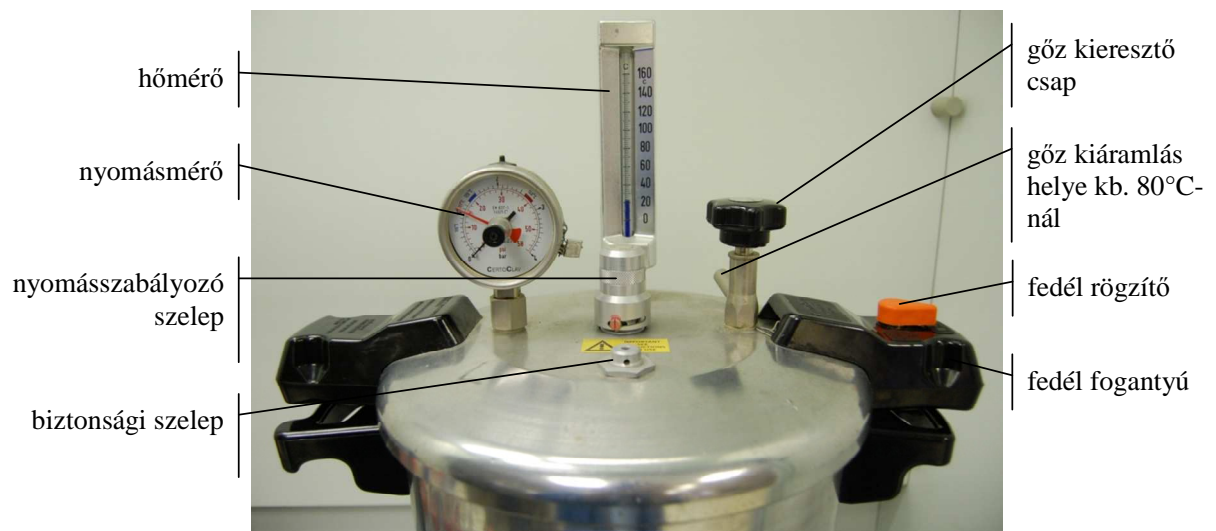
Nyomás alatt gőzzel: certoklávban (kisebb űrtartalmú) vagy autoklávban sterilizünk 1,1 bar túlnyomás alatt 121°C-on. Mindkét eszköz nyomásálló, hermetikusan záródnak, bennük a víz hevítésének hatására gőz keletkezik, amellyel történik a sterilizálás.

#### CV-EL 12L certokláv

Belső térfogata 12 liter. Működése hasonlít a konyhai kuktáéhoz. Leoltó lombikokat, pipetta hegyeket, habzágátlót, fermentációhoz csöveket, táptalajokat, vizet sterilizünk vele 20 percig. Működése nem automatikus.



CV-EL 12L certokláv



certokláv fedele

Certokláv használata:

1. Ioncserélt vízzel fel kell tölteni addig, hogy a kosár alját ellepje a víz.



certokláv belseje

2. Certoklávba helyezhetők a sterilizandó eszközök. Az üvegek kupakját egy kicsit meg kell lazítani, hogy sterilizálás közben a keletkező gőz eltávozhasson. A leoltó lombikok és az Erlenmeyer-lombikok lombiksapkáját alufóliával kell lefedni.
3. A fedél felrakása. A fedél csak a képen látható kb. 45°-os helyzetben raktató fel.
4. A fedél elfordítása. A fedél az óramutató járásával megegyezően rögzül, míg vele ellentétesen lazul.



fedél felrakás után



elfordított fedél

5. Fedélrögzítő elzárása.



fedélrögzítő nyitott állapotban



fedélrögzítő zárt állapotban

6. Gőz kieresztő csap kinyitása. Óramutató állásával ellentétesen nyitható.



certokláv gőz kieresztő csapja nyitott állásban

7. A certokláv bekapcsolható a zöld főkapcsolóval.
8. Ha a certokláv kifújta a gőzt kb. 80°C körül, akkor elzárható (óramutató állásával megegyezően zárható) a gőz kieresztő csap. A gőz kifújásakor általában vízcseppek jelennek meg a fedélen a gőz kieresztő cső közelében. A [gőz kiáramlása](#) jól hallható.



vízcseppek megjelenése gőz kifújáskor



certokláv gőz kieresztő csapja zárt állásban

9. A certoklávban  $100^{\circ}\text{C}$  után elkezdi növekedni a nyomás, amit a nyomásmérő fekete mutatója jelez.
10. Ha a hőmérséklet elérte a  $121^{\circ}\text{C}$ -ot és a fekete mutató a narancssárgával együtt áll, hallható ([zizegő hang](#)), hogy elindult a sterilizálás. Ekkor indítható a stopper, innen kezdődik a sterilizációs idő. A sterilizációs idő általában 20 perc. Sterilizálás alatt a certokláv  $121^{\circ}\text{C}$ -ot és 1,1 bar túlnyomást tart. A két érték egy kicsit ingadozik. Ha csökken a hőmérséklet, akkor egy kicsit fűt.
11. A sterilizációs idő lejártá után ki kell kapcsolni a certoklávot a zöld főkapcsolóval.
12. Ha a nyomásmérő fekete mutatója 0-ra csökken és a hőmérséklet  $80^{\circ}\text{C}$  alá csökken, akkor levehető a certokláv fedele, és kivethetők a sterilizált eszközök. A fedél levétele előtt a fedélrögzítő narancssárga csapját ki kell nyitni. A fedél óramutatóval ellentétesen forgatás után vehető le.  
A fedél levételekor forró gőz áramolhat ki a certoklávból, ezért elővigyázatosan vegyük le azt. Az forró eszközök kivételekor hőálló gumikesztyűt kell használni.  
Kivételekor az üvegek kupakját meg kell szorítani.
13. Ha szükséges, akkor steril boxba kell pakolni a kivett sterilizált eszközöket, hogy megszáradjanak. Ezen eszközök például: leoltó lombik, Erlenmeyer-lombikok, alufóliával becsomagolt kanál. Steril boxba pakolás után a leoltó lombikokról és az Erlenmeyer-lombikokról le kell venni az alufólia csomagolást, hogy a papír lombiksapkák megszáradjanak.

### Autokláv:

Automatikus és manuális változata létezik. Több apró eszköz (pl. leoltó lombik, Erlenmeyer-lombik) sterilizálható vele, mint a certoklávval. Nagyobb mérete miatt alkalmas üveg fermentorok sterilizálására. Több időre van szüksége, hogy elérje a sterilizáláshoz szükséges hőmérsékletet és túlnyomást. A lehűlés és a nyomás lecsökkenés is több időt vesz igénybe, mint a kisebb certokláv esetében.

### Raypa AES-110 autokláv

Automatikus működésű.



### Raypa AES-110 autokláv használata

1. Használatba vétel előtt ellenőrizni kell, hogy van-e elegendő víz az autoklávban. Ha nincs elegendő, akkor utána kell tölteni addig, hogy ellepje alul a kosár alsó részét.



Raypa AES-110 autokláv belseje

2. Ellenőrizni kell, hogy a fedél mögötti két csap csatorna (drain) és gőz (steam) zárt állapotba van-e. Zárt állásba az óramutatóval megegyezően kell fordítani.

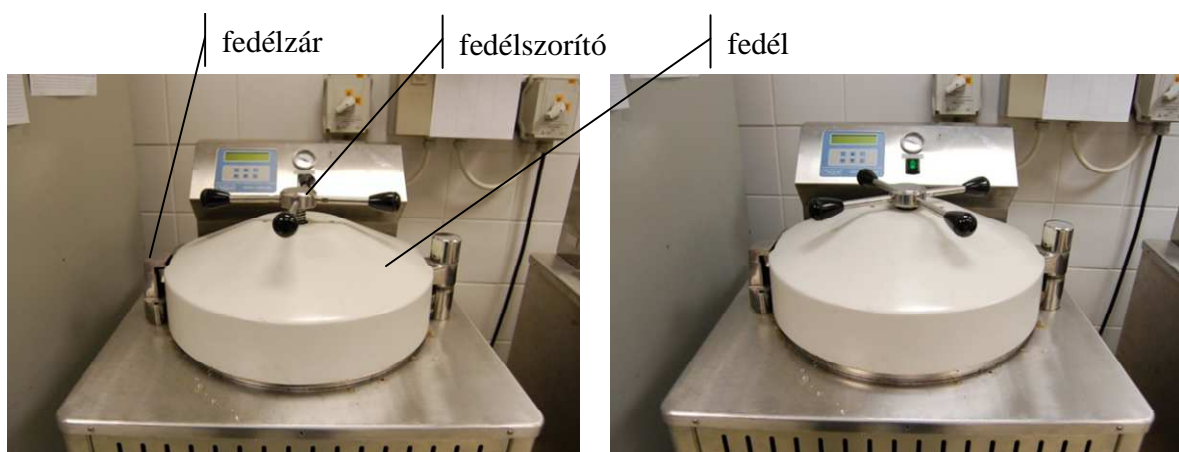


csatorna (drain) és gőz (steam) csap nyitva



csatorna (drain) és gőz (setam) csap zárva

3. Bepakolhatók a sterilizandó eszközök hasonlóan, mint a certokláv esetében. Ha üvegfermentort rakunk az autoklávba, akkor annak fedélszorító csavarjait meg kell lazítani és a fermentor levegő kivezetés csövét nem szabad vattával eltömíteni, csak alufóliával szabad becsomagolni, hogy sterilizálás közben a keletkező gőz túlnyomás el tudjon távozni a fermentorból.
4. Zárható az autokláv fedele. Ütközésig kell elfordítani az autokláv fedelét, majd erősen el kell zárni a fedélszorítót jobbra forgatva. A megszorítás hatására baloldalt a fedél berögzül egy zárba.



meglazított fedélszorító

megszorított fedélszorító



nyitott fedélzár



zárt fedélzár

5. A zöld főkapcsolóval bekapcsolható az autokláv.



6. A lapozó (növelő és csökkentő) gombokkal ki kell választani a megfelelő sterilizációs hőmérsékletet és időtartamot pl. P3 → 121°C és 20 perc (lombikok, táptalajok); P8 → 121°C és 120 perc (Inel BR92K üvegfermentor); P9 → 121°C és 60 perc (Sartorius üvegfermentor).



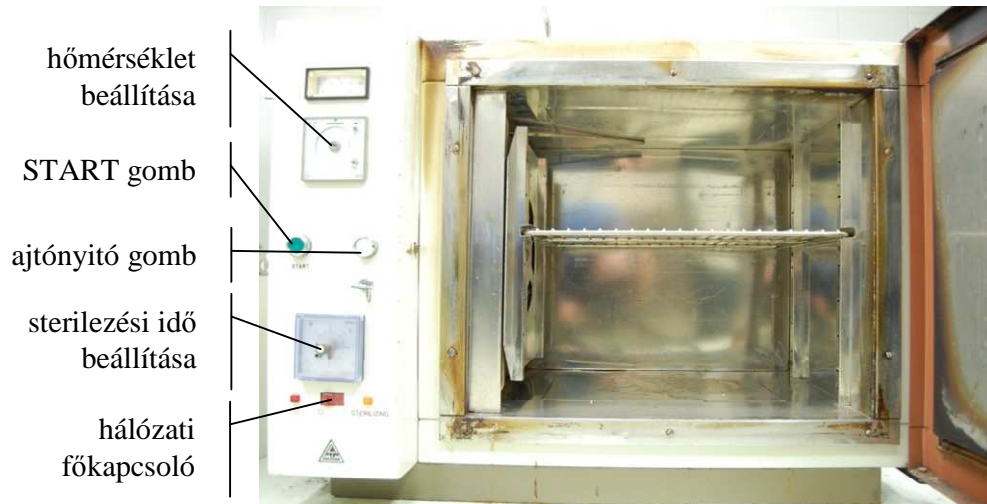


leggyakrabban használt sterilizációs programok

7. A panel bal felső START/STOP gombjával indítható a sterilizálás.
8. Az autokláv elkezd fűteni. 99°C-ot elérve elzárja a levegőztető szelepet, majd elkezd növekedni a nyomás. Az aktuális hőmérsékletet a kijelző folyamatosan mutatja. Amikor a nyomás elérte a 1,1 bar túlnyomást és a hőmérséklet a 121°C-ot, akkor elkezdődik a sterilizálás. Ekkor kezd el visszaszámolni a 20, 60, vagy 120 perces sterilizációs időből. Az idő elteltével kikapcsolja a fűtőszálat és elkezd hűlni a nyomás pedig leesni. Kb. 80°C-nál kiírja a kijelző, hogy PROCESS COMPLETED, ekkor ki lehet kapcsolni a zöld főkapcsolót, kinyitható (kivételek a fermentor) az autokláv és kikapcsolható. Lombikok és üvegek esetén hasonlóan kell eljárni, mint a certoklávban kipakolásakor. Az üvegfermentort 80°C-os hőmérsékletnél nem szabad kivenni az autoklávban. Ha a fermentor sterilizálását délután indítjuk el, akkor azt csak a következő reggel szabad kivenni. A lehűléséhez több időre van szüksége. Kivételek előtt a fermentor fedélszorító csavarjait még az autoklávban meg kell húzni. Kivételek után leghamarabb a fermentor levegőztetését kell elindítani.

### 2.1.2.2 Száraz hővel hőlégt sterilizátorban

Fém és üveg eszközök sterilizálására használjuk, amelyek kibírják a magasabb hőmérsékletet (160-180°C). 180°C-on két óra szükséges a spórás baktériumok elpusztításához.



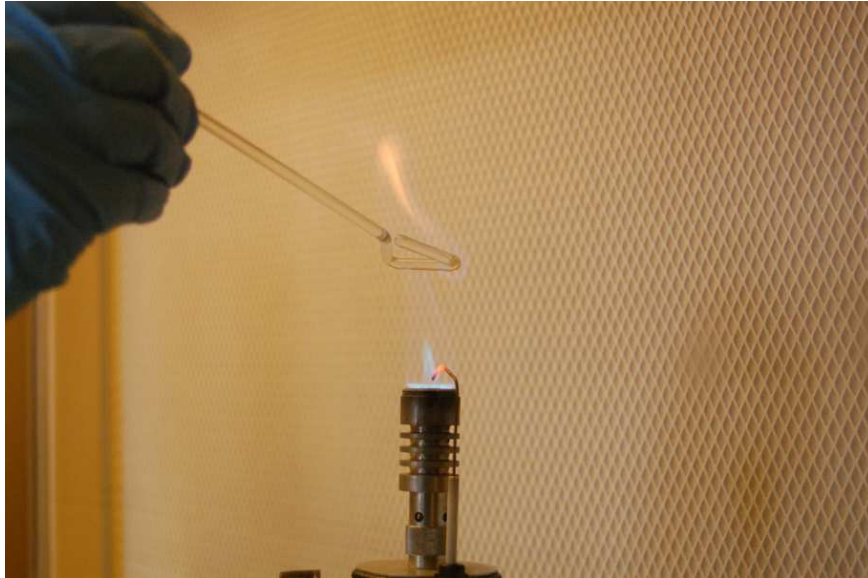
hőlégt sterilizátor belseje

### 2.1.2.3 Nyílt lángban

A láng magas hőmérséklete miatt hamar elérhető a sterilitás. Nem bomló és nem gyulladó eszközök sterilizálhatók vele, mint például oltótűk, oltókacsok, szélesztő botok. Nyílt lángot használni a lamináris fülkében szoktunk munka közben (pl. baktériumok átoltása Petri-csészéről Erlenmeyer-lombikba oltókacs segítségével. Az oltókacot lehűtés közben a láng közelében tartjuk).



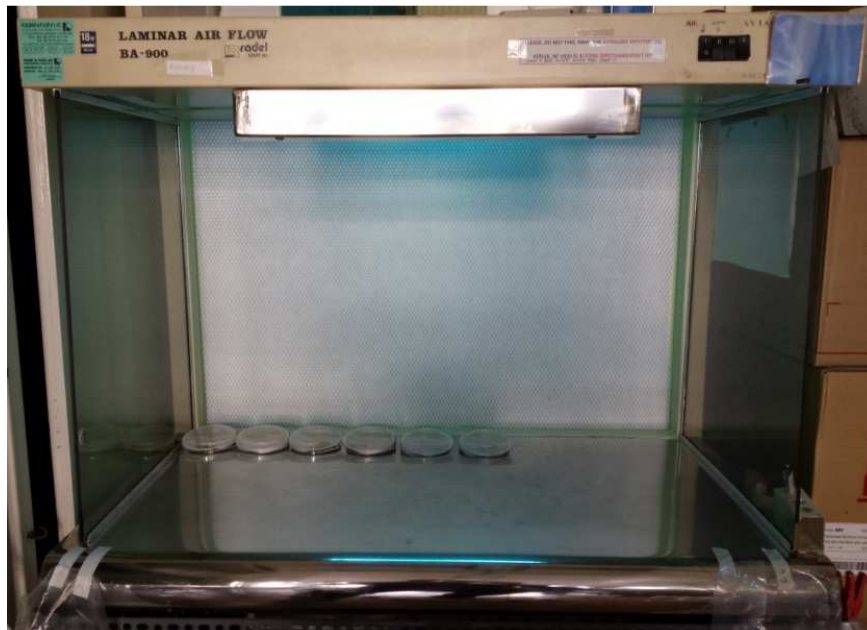
oltókacs gázlángban izzításig hevítve



szélesztőt a lángban alkoholba mártás után

#### 2.1.2.4 UV fény

Csiramentesítésre használható. Baktériumölő hatását 250-280 nm között fejt ki. Karcinogén hatása van. Károsítja a szemet. Ha használjuk, akkor azt a helyet célszerű elhagyni ahol a fényforrás üzemel. Az UV fény hatása a fényforrástól távolodva négyzetesen csökken: ha például 0,5 méterről 1 méterre növeljük a távolságot, akkor negyed annyira káros, ha 1,5 méterre növeljük a távolságot, akkor már csak kilenced annyira lesz káros, mint a 0,5 méteres távolság esetében.



Petri-csészékben szilárduló táptalaj steril boxban UV fényben

### 2.1.2.5 Szűréssel

Például MILLIPORE 0,22 $\mu$ m-es szűrővel. Poliéterszulfon (PES) membránt tartalmaz.

Hőre érzékeny vegyületeket pl. glükóz, nyomelem oldatot lehet sterilre szűrni vele.



szűrés steril boxban

Levegő sterilre szűrése:

0,2 $\mu$ m pórusátmérőjű membránszűrőt (pl. Sartorius Midisart 2000) használunk, amely megszüri a levegőt a baktériumoktól, a mikroszkopikus méretű gombáktól, a spóráktól és a portól. A membrán hidrofób politetrafluoretilénből (PTFE, teflon) készül. A levegőszűrővel ellátott csövet kell a fermentor levegőbementére csatlakoztatni.

Az üveg fermentorokat levegőszűrővel együtt kell sterilizálni autoklávban. Azért, hogy a levegőszűrő sterilizálás alatt ne nedvesedjen be a be és kimeneténél a levegő csövet el kell zárni Hoffmann-szorítóval. Elzárás nélkül sterilizálás közben keletkező gőz juthatna be membrán pórusaiba.

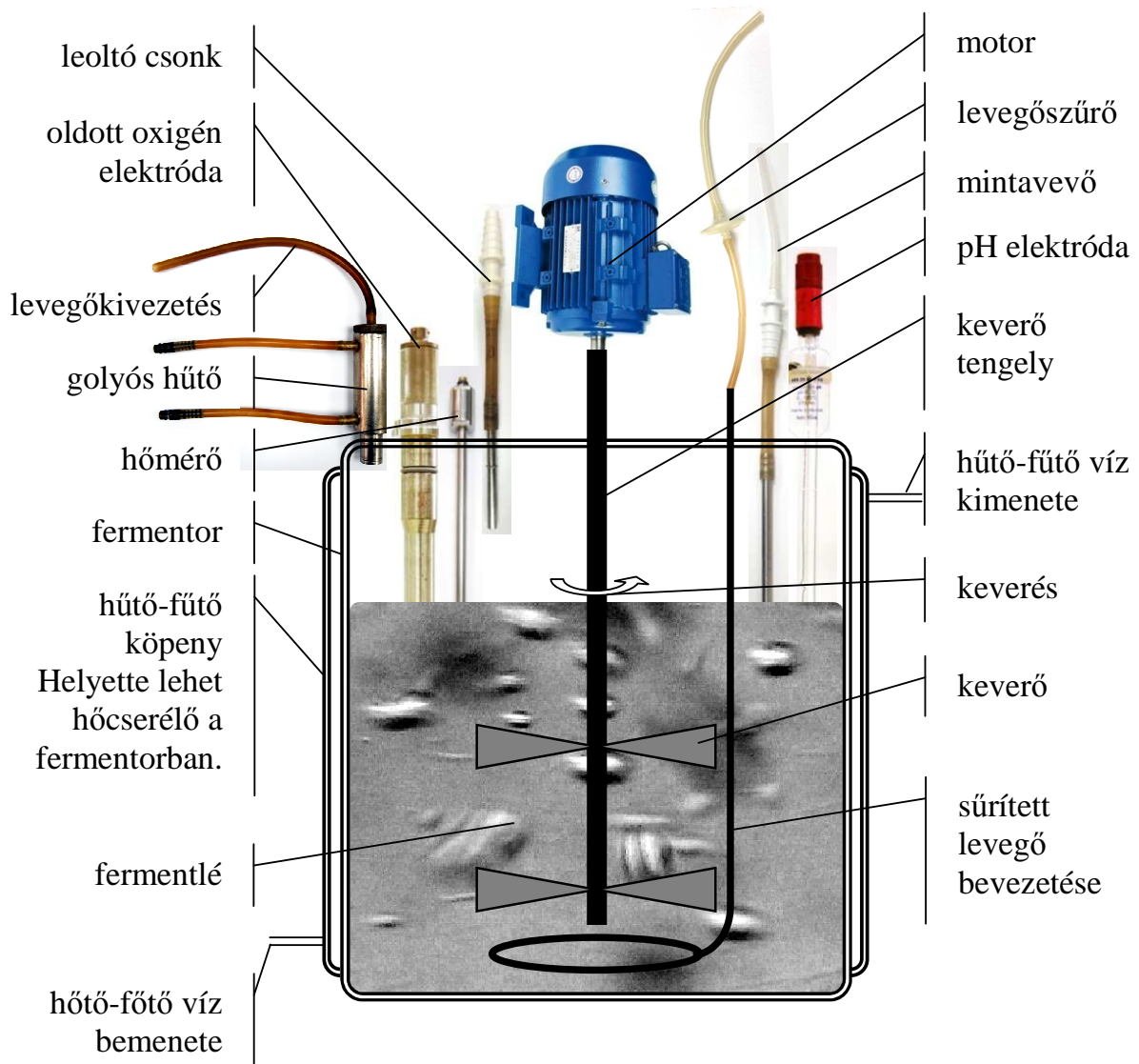
Ha a szűrő membránja nedves lesz, akkor előfordulhat, hogy átjárhatatlan lesz a levegő számára.





levegő sterilre szűrése levegőszűrő segítségével

## 2.2 Laboratóriumi üvegfermentor felépítése



### 2.2.1 Az INEL BR92K fermentor összeszerelése

1. A szerelés megkezdése előtt ellenőrizni kell, hogy az üveg fermentortest alsó részén a leeresztő cső nincs-e elrepedve a bilincsnél. Ha el van repedve, akkor cserélni kell csövet, mert a sterilizálás hatására továbbrepedhet, vagy eltörhet. Ha eltörik, akkor a fermentorban lévő táptalaj kifolyik az autoklávba.
2. A leeresztő csövet el kell zárni két darab Hoffmann-szorítóval. A szorítócsavarnak a cső közepén kell lennie. A két szorító lapnak párhuzamosan kell állnia megszorítás után.



jó

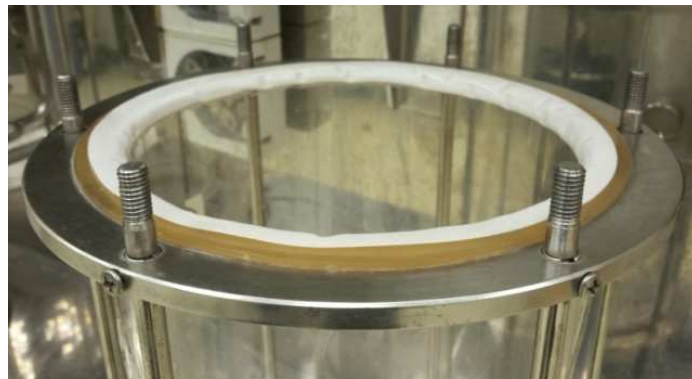


helytelen



üveg fermentortest

3. A fermentortest fehér tömítőgyűrűjét (felül és belül) és a fedélszorító csavarmeneteit szilikonzsírral meg kell kenni.



megzsírozott fehér tömítőgyűrű és fedélszorító csavarmenetek

4. A fermentortestbe bele kell helyezni a fedelet.



5. A fedelet rögzíteni kell 6 db szorítócsavarral, de csak lazán. Autoklávban sterilizálás előtt mindig meg kell lazítani a csavarokat, hogy a fermentorban keletkező gőz túlnyomás el tudjon távozni. Sterilizálás után szabad meghúzni a szorítócsavarokat, de nem szabad túlhúzni, mert a fermentor üveg teste elrepedhet.



fedél szorítócsavar

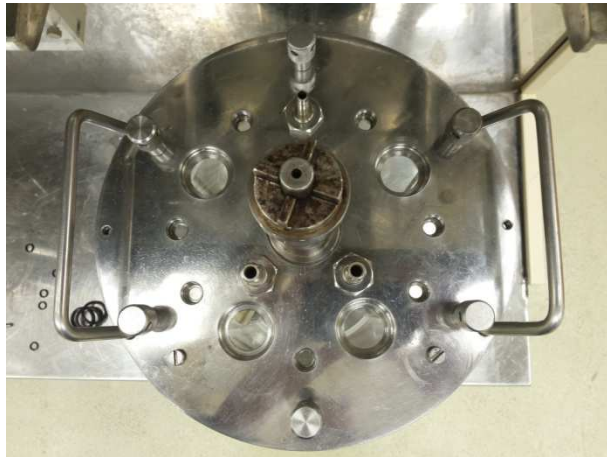


szorítócsavarokkal rögzített fedél

6. Megzsírozott O-gyűrűket kell helyezni a fedélen található portokba. 4 db nagy és 7 db kicsi port található a fedélen.



O-gyűrűk



fedél O-gyűrűk nélkül



fedél O-gyűrűkkel

7. Megzsírozott csavarmenetű port szorítócsavarokat és adagolócsonkot kell helyezni az O-gyűrűkkel ellátott portokba. A lyukas csavarokat csak lazán becsavarozni.



port szorítócsavarok



adagolócsonk



fedél a portcsavarokkal és az adagolócsonkkal

8. A portokat el kell látni a beleváló alkatrészekkel:

- leoldtó csomagtartó



- vakdugó



- hőmérő



- golyós hűtő



- mintavevő

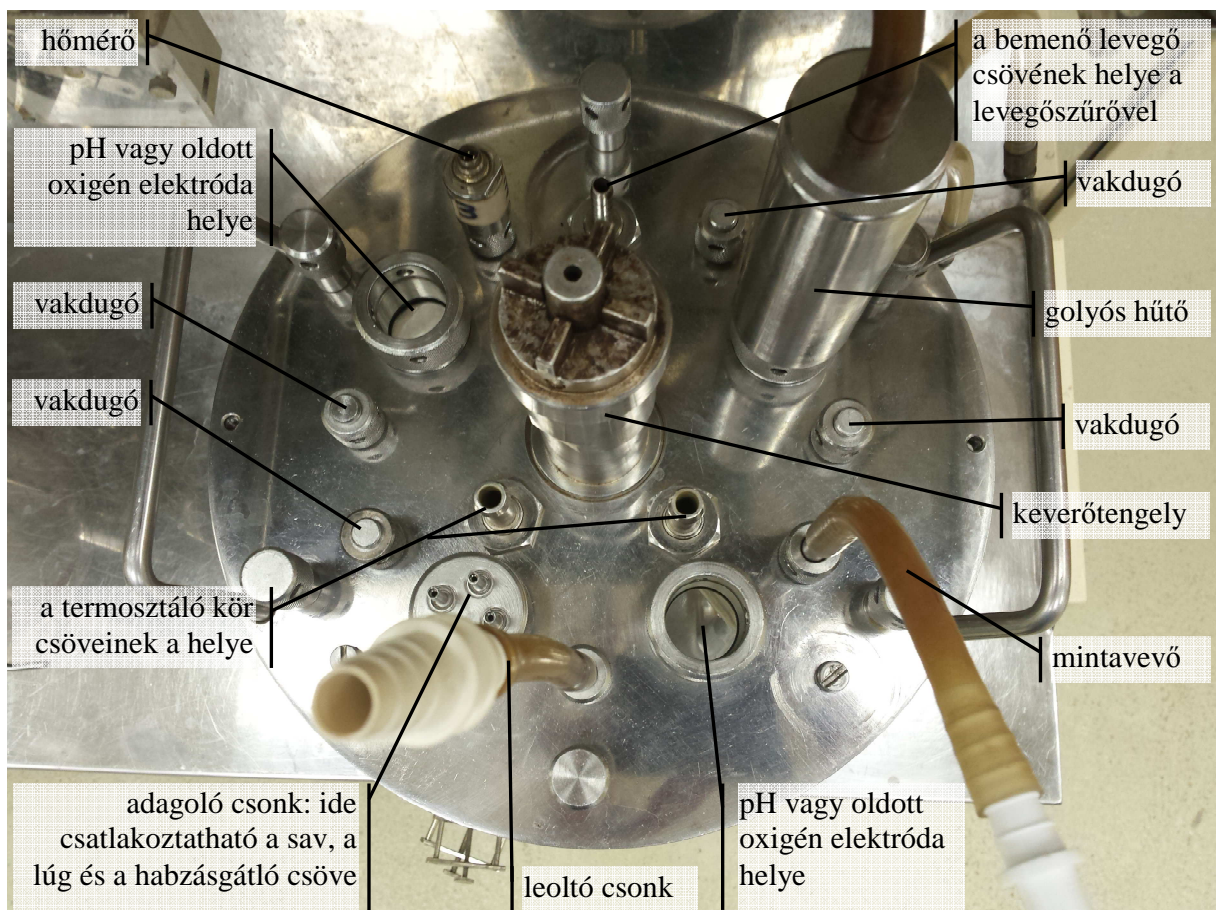


Ha a portokba nem csúsztatható bele a hőmérő vagy a mintavevő, akkor ioncserélt vízzel meg kell nedvesíteni az alsó fém részt.

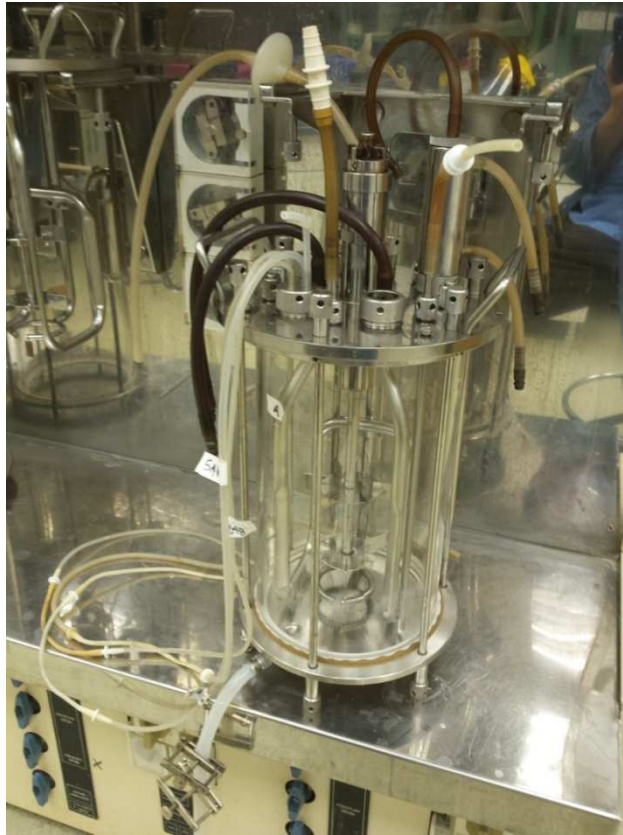
Ha az alkatrészek belekerültek, akkor a portcsavarokat meg lehet szorítani kézzel szorulásig, majd a portok nyílásaiba illeszthető rögzítő kulccsal lehet egy fél vagy egy fordulatot tekerni. Nagyon erősen nem szabad meghúzni, mert tönkremehetnek a csavarmenetek.



rögzítő kulcs

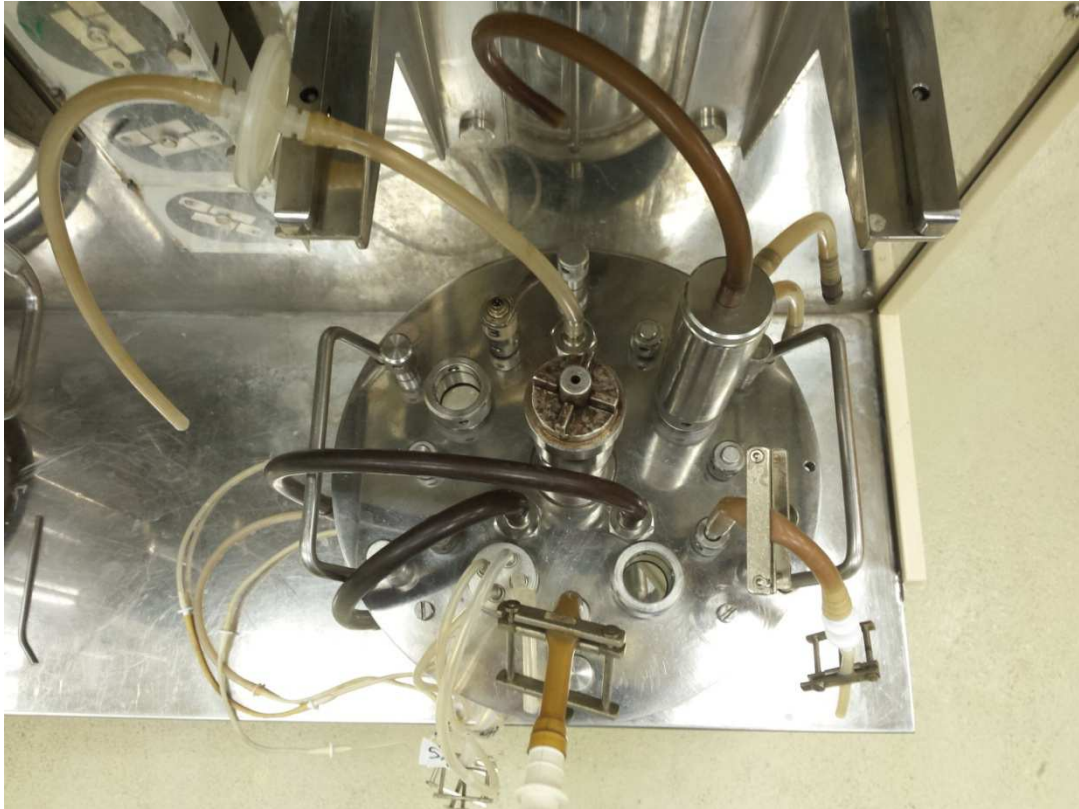


9. Csatlakoztatni kell a levegőcsövet a levegőszűrővel, a termosztáló kör csöveit, és az adagolócsonkhoz a sav a lúg és a habzágató adagolócsöveit.



10. Csövek elzárása Hoffmann-szorítóval:

A leoltó csonkot egy helyen, a mintavevő csövet pedig két helyen (az oliva alatt és felett) kell elszorítani Hoffmann-szorítóval. Ha oldott oxigén elektródát is kalibrálunk a fermentorhoz, akkor nem kell elzárni a levegőcsövet a levegőszűrő előtt és után Hoffmann-szorítóval, mert levegőt kell juttatni a fermentorba az elektróda kalibrációhoz. Ha nem lesz oldott oxigén elektróda kalibrálva, akkor elzárható a levegőcső a levegőszűrő előtt és után. Az oldott oxigén elektróda kalibrációja után el kell zárni a levegőcsövet a levegőszűrő előtt és után.



11. Habzágatlót (pl: polipropilén-glikol) is kell adagolni a fermentorba a két elektróda behelyezése előtt. Általában gomba fermentációnál 2 csepp/liter, baktérium fermentációnál pedig 1 csepp/liter habzágatlót kell adni a táptalajhoz. A habzágatlót a mikróbával leoltott fermentorhoz kell hozzászámolni. Például ha gombát fermentálunk és az összterfogat 6 liter (táptalaj + kiegészítők + inokulum) lesz, akkor 12 cseppet kell adagolni. Ha fermentáció közben szükséges még habzágatló, akkor az adagoló pumpával vagy steril fecskendőből lehet steril habzágatlót a fermentorba adagolni az adagolócsokon keresztül.

Ha csak pH elektródát használunk, akkor a másik nagy portba vakdugót kell helyezni.

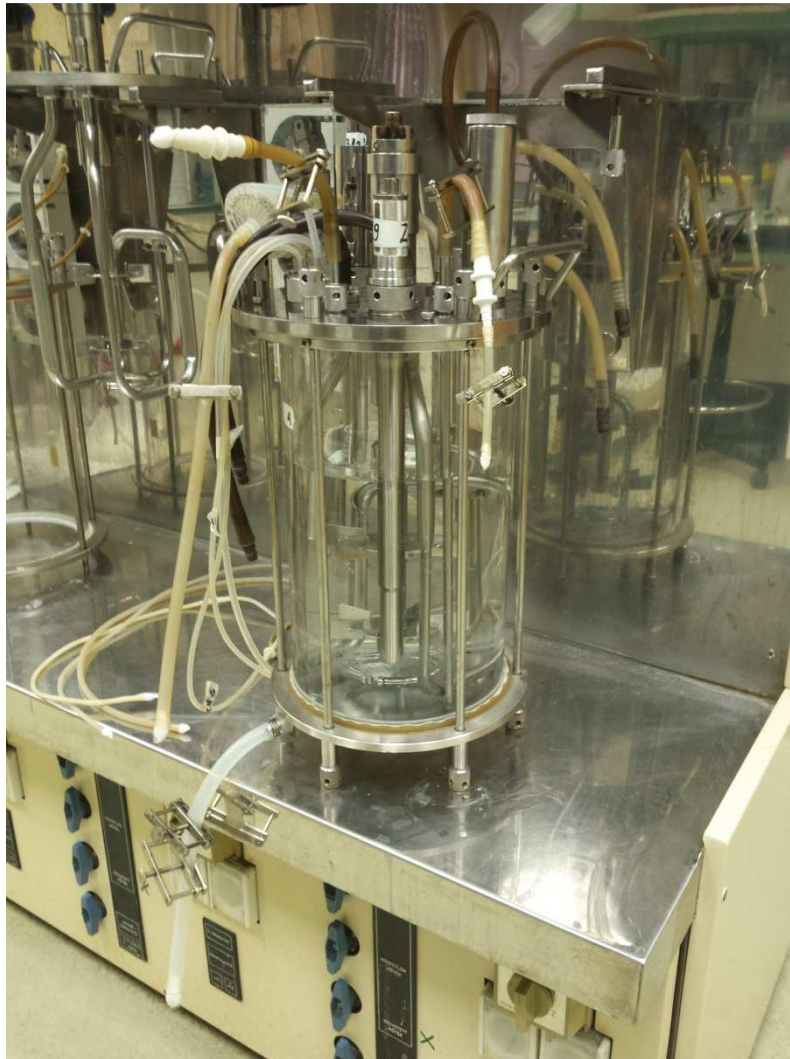
12. A két üres nagy portba kell helyezni a bekalibrált pH és oldott oxigén elektródákat, ha a táptalaj és a habzágatló be lett töltve a fermentorba.

13. Néhány csőbe szorosan vattát kell helyezni:

- leoltó csok
- savcső
- lúgcső

- habzásgátló adagolócső
- levegő cső
- mintavevő

A golyós hűtő elmenő levegő csövébe nem szabad vattát rakni és nem szabad Hoffmann-szorítóval sem elzárni, mert itt fog távozni a fermentorból sterilizálás közben a túlnyomás.



fermentor vattával bedugaszolt csövekkel

#### 14. Alufóliával csomagolandó alkatrészek:

- leoltó csonk olivája
- sav, lúgcső és habzásgátló adagolócső végei és olivái
- pH elektróda
- hőmérő
- levegőcső vége és levegőszűrő
- golyós hűtő elmenő levegőcsöve és vízcsöveinek a vége

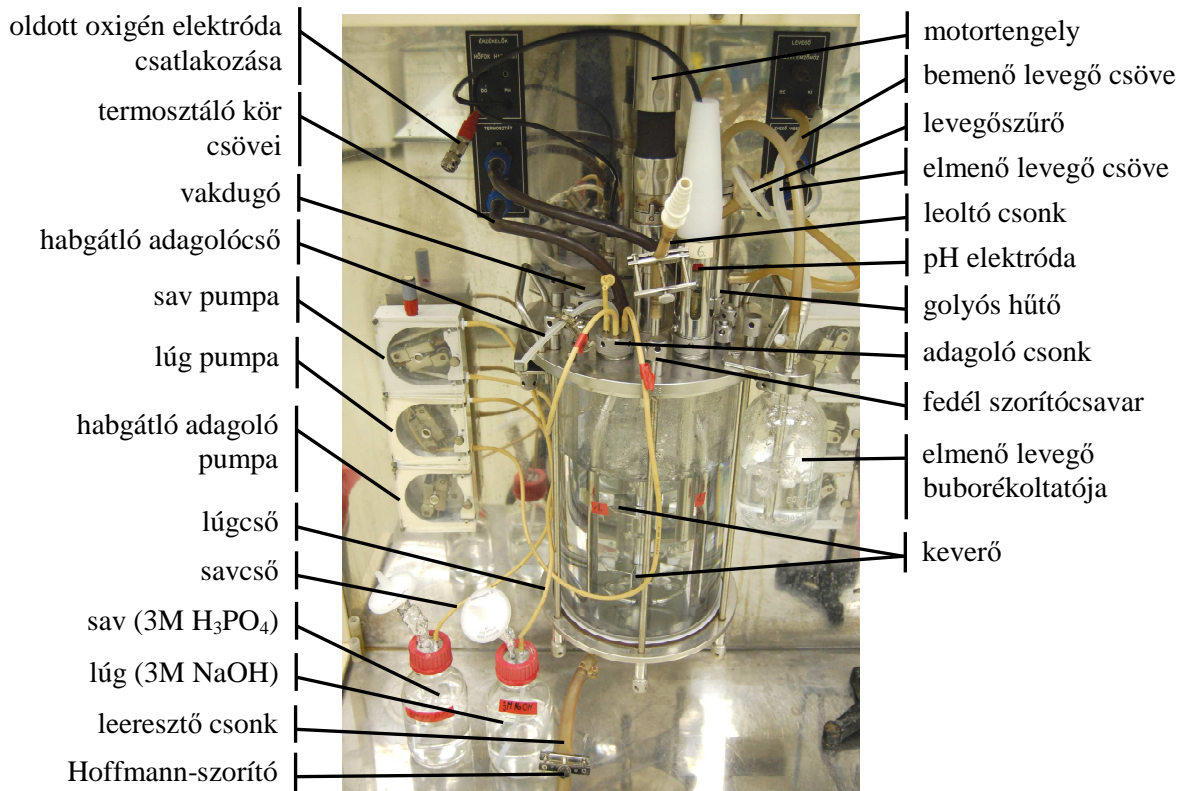
- mintavevőcső vége és olivája
- oldott oxigén elektróda
- termosztáló kör csöveinek a vége
- keverőtengely
- leeresztő cső vége



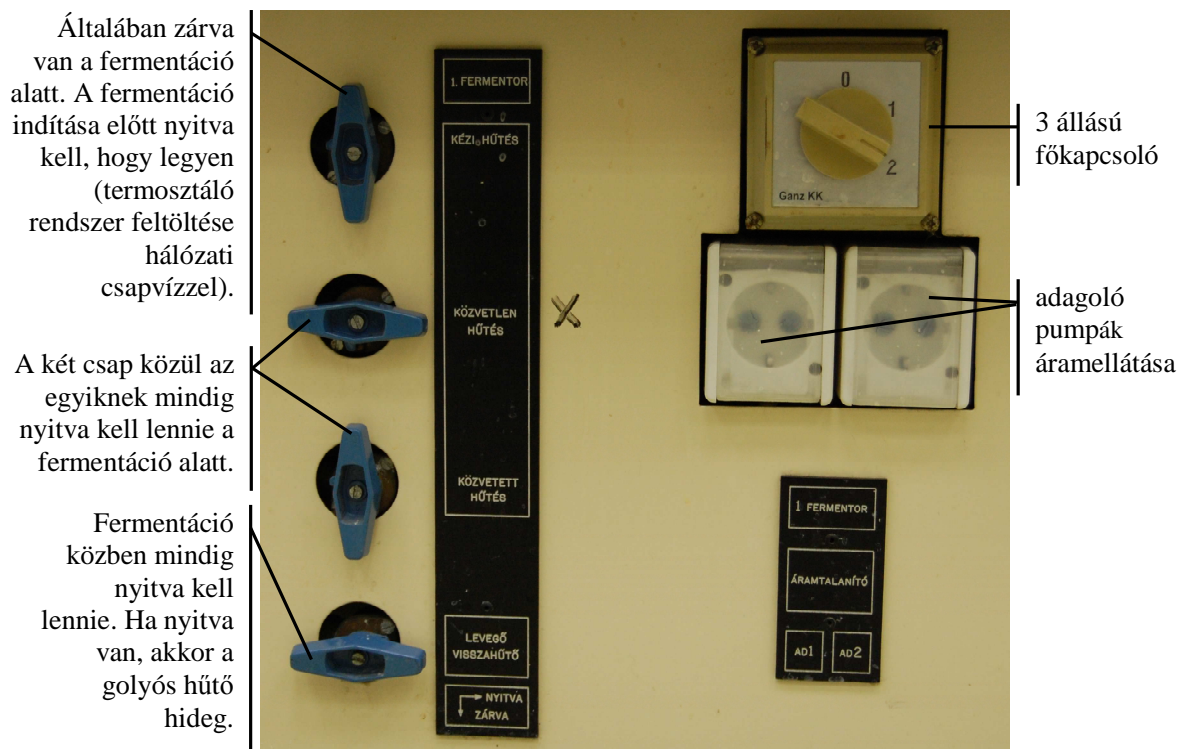
becsomagolt fermentor

15. Ha minden be lett csomagolva, akkor meg kell lazítani a fermentorfedél szorítócsavarjait, mert itt is eltávozhat sterilizálás közben a túlnyomás a fermentorból.

## 2.2.2 Inel BR92K blokkfermentor



A blokk részeinek elnevezése



A csapok függőleges helyzetben zárva, míg vízszintes helyzetben nyitva vannak.

### 3 állású főkapcsoló

A fermentor bekapcsolására szolgál.

O helyzetben kikapcsolt állapotban van a fermentor.

1-es helyzetbe kapcsolva lehet levegőztetni, kevertetni, pH-t szabályozni, oldott oxigént szabályozni, habzástgátlót adagolni és áramot adni a két adagoló pumpának. A fűtőszál nem kap áramot és a termosztáló kör keringető szivattyúja sem üzemel.

2-es helyzetben minden szabályozó kör üzemeltethető.

### Hőmérsékletszabályozás

Hőmérsékletmérésre nem használható higanyos hőmérő, mert nem bírja a sterilizést. Helyette fém ellenállás hőmérőt használnak. Itt Pt100-as hőmérőt (Pt = platina), amelynek  $100\ \Omega$  az ellenállása  $0^\circ\text{C}$ -on. Ha nő a hőmérséklet, akkor nő az ellenállás, ha csökken a hőmérséklet, akkor pedig az ellenállás is csökken. A hőmérő jelének hatására nyitnak és zárnak a hűtő-fűtő szelepek. A hűtést a hálózati hidegvíz biztosítja, ezért a hálózati hidegvíz csapnak mindig nyitva kell lennie fermentáció alatt. Ha fűteni kell, akkor bekapcsol a fűtőszál. A hűtő-fűtő vizet egy keringető szivattyú juttatja el a fermentor termosztáló körébe. A keringető szivattyú és a fűtés csak a háromállású kapcsoló kettes állásában üzemel. Kettes állásba kapcsolás előtt mindig ki kell nyitni a hálózati hidegvíz csapját, a kézi hűtés csapját és a közvetlen vagy a közvetett hűtés csapját. Ha működik a szivattyú, akkor a termosztáló kör szilikon csöveiben lehet érezni az áramló vizet. Néhány perc után, ha érezhető a vízáramlás elzárható a kézi hűtés csapja.

Ha nem érezhető az áramlás, akkor annak többféle oka lehet például:

- A főkapcsoló nincsen kettes állásba kapcsolva, ezért nem jár a szivattyú.
- Nincsen víz a termosztáló körben, mert nincsen nyitva a hidegvízcsap a fermentor mögött, vagy nincs nyomás a hálózati vízrendszerben. Ekkor azonnal egyes állásba kell kapcsolni a főkapcsolót, mert tönkremehet a szivattyú szárazon járva. A víznyomás ellenőrizhető a fermentor baloldali alsó vízcsapján.



- Nem jár a szivattyú akkor sem, ha a kettős állásban van a főkapcsoló. Ekkor a szivattyú a probléma.

### Kevertetés

A keverő feladata a homogenizálás. Például felaprózza a levegőbuborékokat, egyenletes hőmérsékletet, egyenletes pH-t biztosít a fermentorban. A nagyobb fordulatszám jobban felaprózza a levegőbuborékokat, így könnyebben beoldódik a levegő oxigénje a fermentáléba.



[A keverés hatása](#)

### Levegőztetés (kompresszor és nyomáscsökkentő)

A kompresszor sűrített levegőt (itt 6,5 bar) állít elő. A felső tartályba komprimálja össze a levegőt. Ha a levegőnyomás leesik 4 bar alá a fermentorok levegőelvétele miatt, akkor beindul a kompresszor. Addig megy, amíg el nem éri a 6,5 bar-t.

A kompresszor nem lehet olajkenesű. Az apró olajszemcsék a levegőszűrőt eltömítenék. A kompresszortól a sűrített levegő egy csőrendszer (szürke cső) segítségével jut el a fermentorig.

A levegőben nedvesség található, ami a sűrítés hatására lecsapódik (kondenzvíz). Ez a vizet le kell engedni a kompresszor baloldalán lévő fekete cső végén, és a sűrített levegőt szállító kék és szürke cső csatlakozásánál a kompresszor mögött.

A fermentor előtt a levegő nyomását le kell csökkenteni egy nyomáscsökkentő (reduktor) segítségével. A reduktor tetején található csap segítségével lehet beállítani a megfelelő nyomást. A fermentorra nem engedhető nagynyomású levegő, mert a fermentor csőrendszere nem tudná elviselni.

A nyomáscsökkentő előtt található egy csap (a képen a nyomáscsökkentő baloldalán). Ha függőleges helyzetben áll, akkor zárt állapotban van. Vízszintesen kell állnia (nyitott párhuzamosan a levegőcsővel), hogy levegő juthasson a fermentorba.



kompresszor

reduktor

### Levegőszűrő

Megszűri a fermentorba bemenő levegőt a portól, a spóráktól, a gombáktól és a baktériumoktól. Nem szűri ki a vírusokat. 0,2  $\mu\text{m}$ -esek a pórusai. A képen látható szűrőn látható egy "IN" felirat, amely a levegő bemenet oldalát jelöli. Ha nem található a szűrőn "IN" jelzés, akkor a szűrő mindkét oldala lehet a levegő bemenet helye.



levegőszűrő

### Golyós hűtő

Az elmenő levegőt fosztja meg a nedvességétől. A külső köpenyében hideg csapvíz áramlik, amelynek hatására belül a műanyag apró gyűrűkön lecsapódik a nedvesség és alul visszafolyik a fermentorba. A golyós hűtőnek mindig hidegnek kell lennie. Nélküle

csökkenne a folyadékszint, és töményebbé válna a fermentlé. A hálózati hidegvíz csapnak és levegő visszahűtő csapnak a fermentáció során nyitva kell lennie.



Itt távozik a golyós hűtőből elmenő levegő.  
Ide kell kötni az elmenő levegő buborékolatóját.

hűtővíz bemenete

hűtővíz kimenete

Itt lép be a fermentorból kilépő levegő a golyós hűtőbe.  
Itt csöpög vissza a fermentorba a műanyag gyűrűkön lecsapódott víz.

golyós hűtő



A golyós hűtő belseje

### Elmenő levegő buborékolatója

Rajta keresztül kell az elmenő levegőnek átbuborékolnia. Ha nem látható a buborékolás, akkor valahol például az egyik vakdugónál szökik meg a kiáramló levegő. De lehet, hogy nem jut levegő a fermentorba: például nincsen bekapcsolva a kompresszor, vagy a nyomáscsökkentőnél nincsen megnyitva a csap.

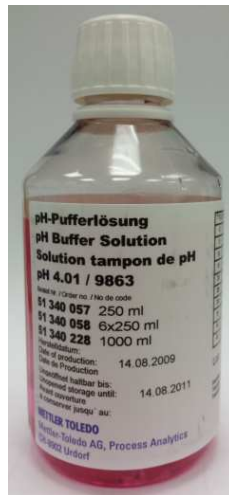
## pH mérés és szabályozás

A pH elektródát használat előtt ioncserélt vízzel le kell mosni és szárazra kell törölni papírtörülővel. Kalibrálás előtt az előző fermentáció kalibrálási értékeit törölni kell. A kalibrációhoz csatlakoztatni kell a hőmérőt és a kijelzett hőfokot meg kell adni a 7-es pH-jú kalibráció indításakor.

Először 7-es pH-jú (zöld) majd 4-es pH-jú (rózsaszín) oldatban kell kalibrálni. mV értékeket állít be a fermentor a két kalibrált értékhez. A nagyobb pH tartomány lefedéséhez használható a 7-es pH-jú (zöld) oldat helyett a 9,21-es pH-jú (kék) oldat is.



pH 7-es pufferoldat



pH 4-es pufferoldat



pH 9,21-es oldat

Sterilezés után ellenőrizni kell a táptalaj pH-ját. Mintát kell venni az alsó leeresztő csövön vagy a mintavevőn, majd egy pH mérő műszerrel meg kell mérni és össze kell hasonlítani a fermentor által kijelzett pH értékkel. Ha a mért és a kijelzett pH érték 0,05-nél nagyobb eltérést mutat akkor a 3. pontban a mért értékkel kalibrálni kell.

pH szabályozás előtti feladatok:

Használat előtt a savat és a lúgot ki kell főzni laza kupakkal 20 percig a certoklávban. A certoklávot fedő nélkül kell használni. A sav és lúg üvegeket kb 2/3-ig el kell, hogy lepje a certoklávban lévő ioncserélt víz. A 20 perces főzést a víz forrásától kell számítani. Kb. 30-40 perc hűlés után ki kell venni a két üveget a certoklávból és rá kell szorítani a kupakot.

A szabályozás elkezdéséhez a sav és lúg a csöveket le kell ellenőrizni, hogy az nem repedtek-e meg. Ha épek, akkor be kell kötni a pumpákba, ha nem akkor a hibás csőszakaszt az olíva felett el kell zárni Hoffmann-szorítóval, majd a repedt csövet az olívákkal együtt ki kell

cserélni egy már lesterilizett olivás csőre. Csatlakoztatás előtt a két csövet formaldehid-alkoholos oldatba kell mártani, hogy elkerüljük a befertőződést.

Ezután a savat és lúgot tartalmazó üvegeket csatlakoztatni kell a fermentor sav, lúg csöveihez, majd fel kell tölteni a csöveket savval ill. lúggal. Ha a csövek telítődtek, akkor az adagolócsok alsó részén csöpögés látható.

pH szabályozás:

Általában 3 mólos NaOH-t és 3 mólos  $H_3PO_4$ -et használunk a pH beállítására. Ha alacsonyabb a pH érték, mint a beállított (például pH 7), akkor elindul a lúgpumpa, ha magasabb, akkor pedig a savpumpa. A beállított értéket mindig egy holtávra közelíti meg. Például ha a holtáv 0,05pH, akkor alulról közelítve 6,95-ös pH-nál fog megállni a lúg pumpa, ha pedig felülről közelít a 7-es pH-hoz, akkor 7,05-ös pH-nál. Ha a pH a két érték (6,95-7,05) között van, akkor nem fognak elindulni a pumpák.

Oldott oxigén (DO) mérés és szabályozás:

Az oldott oxigén elektródát 3 pontban kell kalibrálni. Mind a 3 ponthoz mV értékeket állít be a fermentor. Kalibráció alatt itt is csatlakoztatva kell lennie a hőmérőnek. A kijelzett hőfokot itt is meg kell adni a kalibrálás során.

Kalibráció előtt törölni kell a korábbi fermentáció kalibrálási értékeit.

Kalibráció előtt ellenőrizni kell, hogy az elektróda membránja fel van e töltve  $O_2$ -elektrolit oldattal, nem lyukas-e a membrán.



DO elektróda membrán



O<sub>2</sub>-elektrolit

#### Kalibrálás lépései:

1. Az elektróda csatlakoztatása nélkül: elektróda nélkül az elektronika hibájának kompenzálása.
2. Zéró gélbe (oxigénmentes) kell helyezni a DO elektródát. Ez a kalibráció jelenti a 0%-os oldott oxigén telítettséget. Itt az elektróda szivárgó áramának mérése történik oxigén mentes környezetben. A DO elektródát a zéró gélbe merítés előtt és után le kell mosni ioncserélt vízzel és szárazra kell törölni papírtörülővel. Zéró géllal dolgozni csak gumikesztyűben szabad, mert a pH-ja 12,5. Ha a gél bőrre vagy szembe kerül, akkor bő vízzel alaposan le/ki kell öblíteni.



zéró gél

3. A 2. kalibráció után nem szabad az elektróda csatlakozást megbontani. Az elektródát a fermentorba kell helyezni, majd kb. 10 percre kevertetni és levegőztetni kell a fermentort. A kevertetést és a levegőztetést a fermentáció során alkalmazott legnagyobb értékekre kell megemlíteni. Ha az oldott oxigén % érték stabil, nem ingadozik, akkor elindítható az oxigén telített kalibráció. Ez a pont lesz

a 100%. Itt az elektróda érzékenységének mérése történik oxigénnel telített környezetben.

Sterilizés után újra meg kell kevertetni és levegőztetni a fermentort ha a %-os érték nem 100%, akkor újra meg kell ismételni a 100%-os telítettségű kalibrálást.

### Oldott oxigén szabályozás

A fermentor %-osan jeleníti meg az oldott oxigén értékét.

Két lehetőség van, hogy szabályozzuk: kevertetés és levegőztetés

Például ha 20 %-os szintet szeretnénk tartani.

### Oldott oxigén szabályozáskeveréssel

Ha 20 % alá csökken a DO, akkor a keverő fordulatszáma emelkedik, ha 20 % felé növekszik, akkor csökken a keverő fordulatszáma. A fordulatszám a beállított minimum (pl. 100 RPM) és maximum (pl. 600 RPM) értékek között változhat.

### Oldott oxigén szabályozáslevegőztetéssel

Ha 20 % alá csökken a DO, akkor több levegőt juttat a DO szabályozás a fermentorba, ha 20 % felé növekszik, akkor csökkenti a bemenő levegő mennyiségét. A levegő mennyisége a beállított minimum (pl. 50 l/h) és maximum (pl. 300 l/h) értékek között változhat.

### Oldott oxigén szabályozás típusai

- csak keverővel
- csak levegővel
- levegő és keverő együtt
- először keverő, aztán levegő
- először levegő, aztán keverő

### Habszint szabályozása

A kevertetett és levegőztetett folyadékszint felé kell elhelyezni a habszenzort. Ha nedvesedik az elektróda, akkor beindul a habgátló adagoló pumpa. Az adagolt habzsgátlónak sterilnek kell lennie. Minél magasabbra növeljük a fermentor hőmérsékletét, a keverő fordulatszámát és a fermentorba juttatott levegő mennyiségét, annál párasabb a lesz a fermentor felett lévő légtér. A szenzor hidegebb felületén lecsapódhat a pára, amelynek hatására beindulhat az adagoló pumpa. A habszenzor működése nem megbízható.



DO szenzor



habszenzor



pH elektróda



hőmérő

elektródák

### 2.2.3 Fermentor leoltása

1. A fermentor és a leoltó lombik csöveiről le kell venni az alufóliát, és a csövekből ki kell venni a vattadugót.
2. Mindkét csővéget formaldehid-etanos keverékbe kell mártani.
3. Csatlakoztatni kell egymáshoz a két csövet. A fermentor leoltócsövén egy olivának kell lennie a csatlakoztatáshoz.
4. Ha a két cső össze lett csatlakoztatva, akkor le kell állítani a fermentor levegőztetését.
5. A két csövön meg kell nyitni a Hoffmann-szorítókat, hogy a baktérium vagy gombatenyészet bejuthasson a fermentorba.
6. Ha a mikroba tenyészet bejutott a fermentorba, akkor el kell zárni a fermentor leoltó csövén a Hoffmann-szorítót.
7. El kell indítani a fermentor levegőztetését.
8. Szét lehet csatlakoztatni a két csövet.

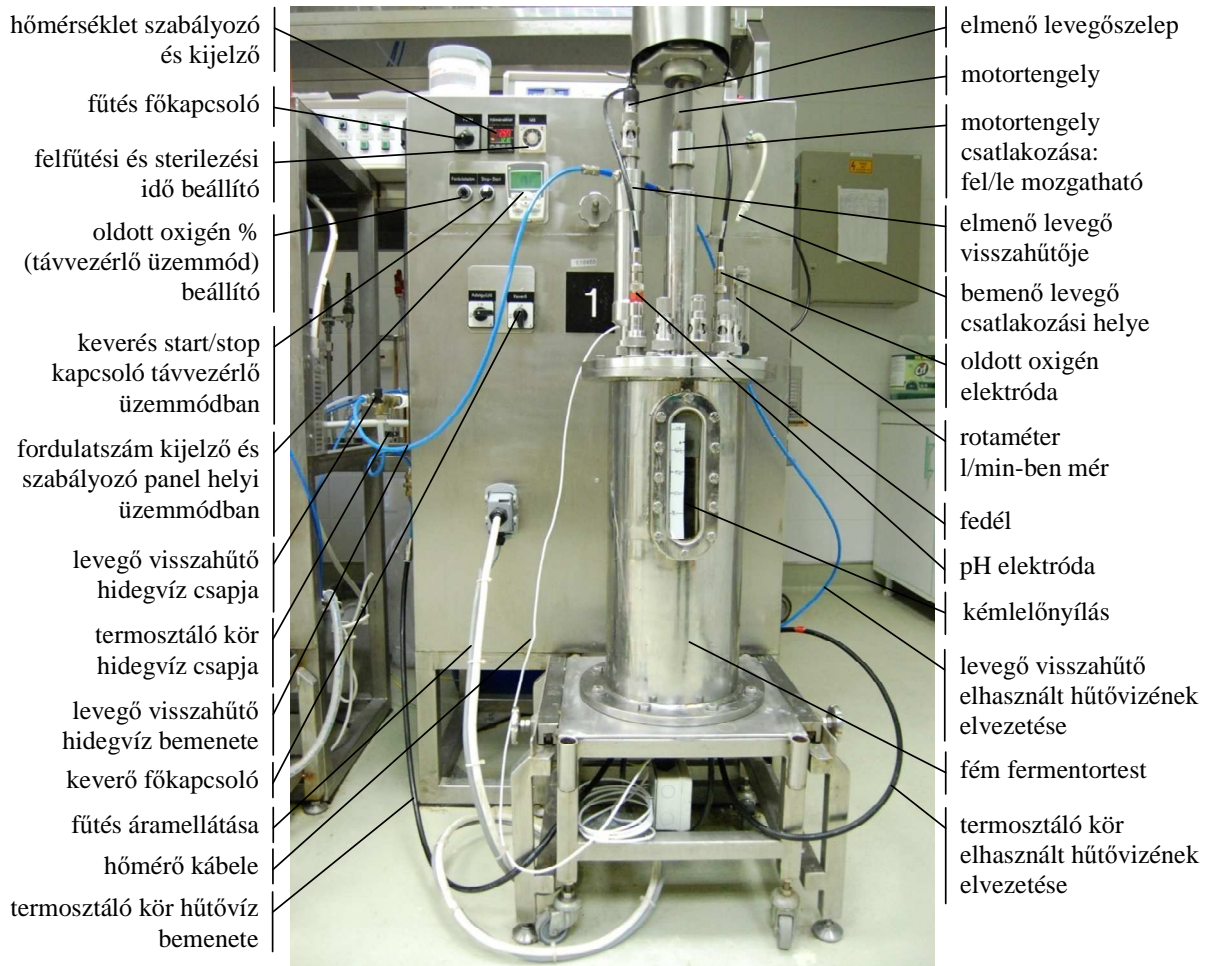
9. A fermentor oltócsövének a végét formaldehid-etanolos keverékbe kell mártani, majd be kell csomagolni alufóliával.

#### **2.2.4 Mintavétel a fermentorból:**

1. A mintavevő cső végéről le kell venni az alufóliát, ha van a csőben vattadugó, akkor azt is ki kell venni. Vattadugó csak az első mintavételig lesz benne.
2. A mintavevő cső végét formaldehid-etanolos keverékbe kell mártani.
3. Csatlakoztatható a fecskendő a mintavételhez.
4. Meg kell nyitni a csövön található Hoffmann-szorítót.
5. 10 ml (Sartorius üvegfermentor) vagy 20 ml (Inel BR92K üvegfermentor) holt térfogatot le kell szívni először. Ez a minta nem fontos a számunkra. Annyi holt térfogatot kell levenni amennyi a mintavevő cső térfogata. A levett mintát nem szabad visszanyomni a fermentorba, mert a használt fecskendő nem steril, befertőzhetjük vele a fermentort.
6. Ujjal vagy gyorszorítóval el kell zárni a mintavevő csövet.
7. Le kell venni a fecskendőt és ki kell üríteni egy kancsóba, vagy főzőpohárba, amibe Domestost kell tenni.
8. Vissza kell csatlakoztatni újra a fecskendőt.
9. Meg kell nyitni a csövet.
10. Le kell venni a tényleges mintát, annyi ml-t amennyire szükségünk van.
11. El kell zárni a mintavevő csövet egy Hoffmann-szorítóval.
12. Le kell csatlakoztatni a fecskendőt a mintával.
13. A mintavevő cső végét formaldehid-etanolos keverékbe kell mártani.
14. A cső végét alufóliával be kell csomagolni.

## 2.3 Laboratóriumi 15 literes fémfermentor felépítése és működtetése

Helyben sterilizálható, nyomásálló rozsdamentes acél fém fermentor. Hasznos térfogata 10-12 liter. Maximális térfogata 15 liter.



15 literes fémfermentor felépítése

### 2.3.1 Sterilizálás előtti feladatok

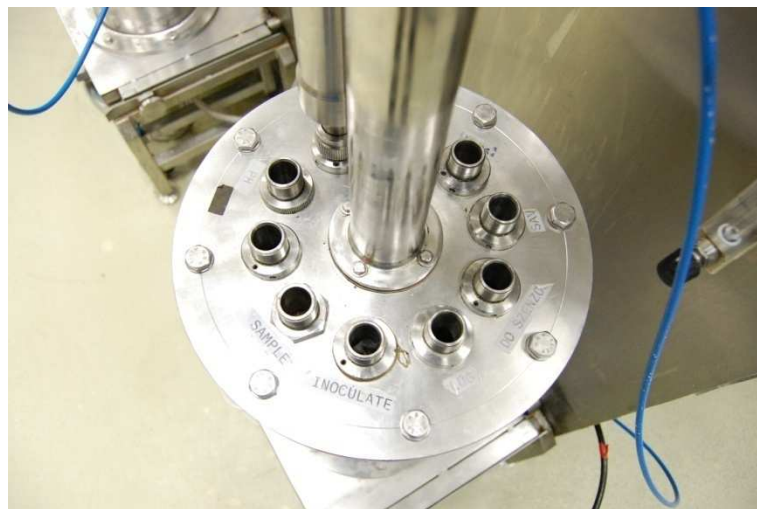
#### Összeszerelés

1. A fedélen lévő és a levegő visszahűtő tetején lévő portoknak üresnek kell lennie, kivétel a hőmérő és a levegő visszahűtő portja.



fedél üres portokkal

2. A szabad portok csavarmeneteit szilikon zsírral meg kell kenni.



szilikon zsírral megkent port csavarmenetek

3. Az üres portokra gumi vagy szilikon szeptumot kell rakni, kivétel a pH és az oldott oxigén elektróda helye. A fekete színű keménygumi, míg a szürke szilikon, sokkal puhább és rugalmasabb.



gumi és szilikon szeptum



portokra helyezett szeptumok

Szilikon szeptumot kell helyezni a mintavétel, a levegő és a levegő visszahűtő tetején lévő portokra.

4. A szeptumok tetejét szilikon zsírral meg kell kenni, hogy megpuhuljanak.



szilikon zsírral megkent szeptumok

5. Minden szeptumra egy fém gyűrűt kell helyezni, a levegő visszahűtőre is.



fém gyűrű



fedél fém gyűrűkkel

6. Minden fém gyűrűre tekerni kell egy szorítógyűrűt szorosan. Alul és felül is található egy csavarmentet. Az alsó résszel kell rögzíteni a szeptumot és a szeptumra rakott fém gyűrűt.



port szorítógyűrű



fedél betekert szorítógyűrűkkel

7. 6 db fém dugót kell előkészíteni, amelyeknek a csavarmenetét és az ó-gyűrűjét szilikon zsírral meg kell kenni.



fém dugó

8. Minden szeptumra egy vagy két csepp formaldehid-etanolos oldatot kell cseppenteni. A cseppentéshez használható egy nagyobb pipetta hegy. Gumikesztyűt kell viselni.

9. A 6 db fém dugót a szorítógyűrűbe kell szorosan kézzel betekerni. Ha nem lehet betekerni, akkor a szorítógyűrűt meg kell lazítani.



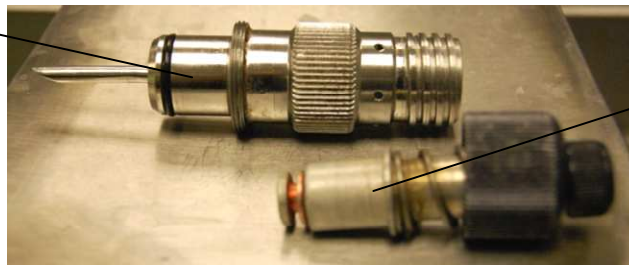
fedél betekert fém dugókkal

10. Szét kell szedni az elmenő levegőszelepét.



elmenő levegőszelep összerakott állapotban

levegőszelep tűske



levegőszelep fedele

elmenő levegőszelep szétszedve

11. Meg kell zsírozni az elmenő levegőszelep tűskével ellátott részének mindkét csavarmenetét és ó-gyűrűjét.



levegőszelep tűske

12. A megszírozott levegőszelep tűskét át kell szúrni a szeptum közepén és bele kell tekerni a levegő visszahűtő szorítógyűrűjébe. Ha nem lehet betekerni, akkor a szorítógyűrűt meg kell lazítani.



betekert levegőszelep tűske

13. Be kell tekerni a levegőszelep fedelét a tüskébe. Nem kell szorosan meghúzni.



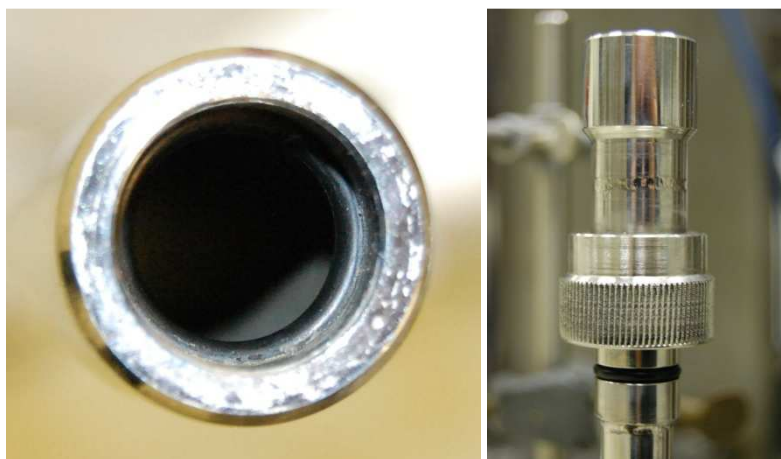
betekert levegőszelep fedéllel

### 2.3.2 pH kalibráció

1. A pH elektróda védőcsövének alsó és felső ó-gyűrűit szilikon zsírral meg kell kenni.



pt1000-es pH elektróda és védőcsöve



pH elektróda védőcső alsó és felső fekete ó-gyűrűi

2. Ki kell venni a pH elektródát a védőkupakjából.



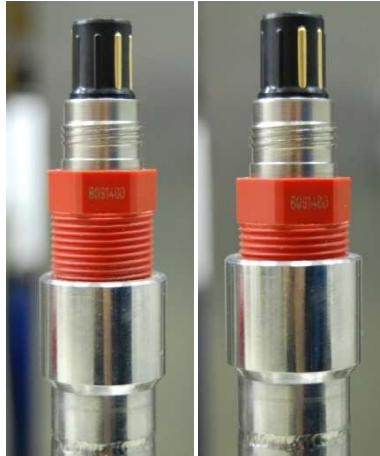
pH elektróda védőkupakja

3. Ioncserélt vízzel alaposan le kell öblíteni és szárazra kell törölni a pH elektródát.
4. Óvatosan a pH csőbe kell helyezni, majd ha az alsó gyűrűt elérte, akkor forgató mozdulattal ütközésig le kell tolni.



pH elektróda védőcsőbe helyezve

5. Az elektróda felső részén található egy piros menetes csavar, amit óramutatóval megegyezően kell forgatni, hogy az elektróda rögzüljön a csőben.



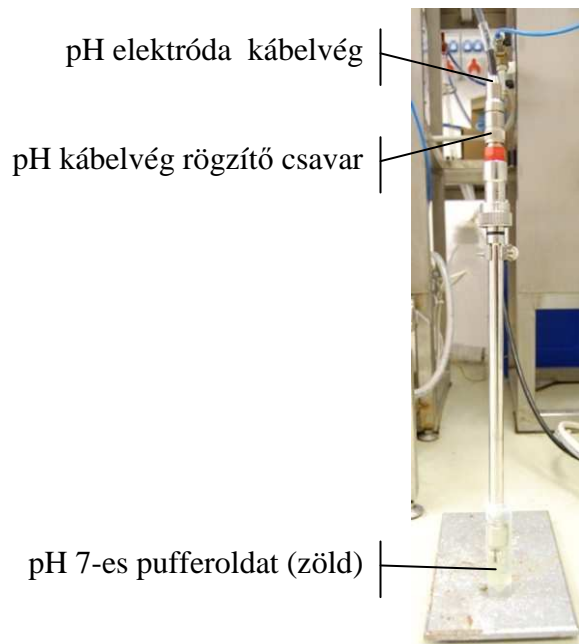
piros csavar betekerés nélkül és betekerve

6. Be kell rögzíteni az elektródát egy állványba, majd alul ioncserélt vízzel újra le kell mosni és szárazra kell törölni.



pH elektróda a védőcsőben

7. Az elektródát be kell helyezni a pH 7-es puffer (zöld) oldatba, és csatlakoztatni kell az elektróda kábelét. A pH kábelvéget csak egy helyzetben illeszthető az elektródára. Az illesztés után a kábelvég alsó részén lévő csavart óramutatóval megegyezően el kell forgatni a csatlakozás rögzítéséhez.



elektróda pH 7-es pufferben csatlakoztatva

8. Be kell kapcsolni a pH és oldott oxigén vezérlőt. A forgatható főkapcsoló a vezérlő hátoldalán található.
9. Le kell ütni a „Cal” feliratú gombot a pH kalibráció elindításához.



bekapcsolás után megjelenő képernyő

10. A „Cal” gomb megnyomása után a fel „▲” vagy a le „▼” gombok megnyomásával ki kell választani a pH szenzort, majd le kell ütni az „Enter” gombot. Ha nem megfelelő elektródát választottunk, akkor a „Menu ◀” és a „Cal ▶” gombok együttes lenyomásával visszaléphetünk.



pH szenzor kiválasztása

11. A következő megjelenő képernyőn a „▲” vagy a „▼” gombok megnyomásával 2 pontos kalibrációt kell kiválasztani és le kell ütni az „Enter” gombot.



2 pontos pH kalibráció kiválasztása

12. Az „Enter” leütése után a következő képernyő jelenik meg.



pH 7-es kalibráció (1. pont) indítása előtt megjelenő képernyő

13. Ha a pH elektróda benne van a pH 7-es puffer oldatban, akkor újra le kell ütni az „Enter” gombot. A megjelenő képernyő jelzi, hogy folyamatban van a kalibráció az első pontban, amit pH 7-es felirat mellett jobboldalt mozgó pontok jeleznek.



pH 7-es kalibráció folyamatban

14. Ha a következő képernyő jelenik meg, akkor ki kell venni az elektródát a pH 7-es puffer oldatból, le kell mosni ioncserélt vízzel és szárazra kell törölni.



pH 4-es kalibráció (2. pont) indítása előtt megjelenő képernyő

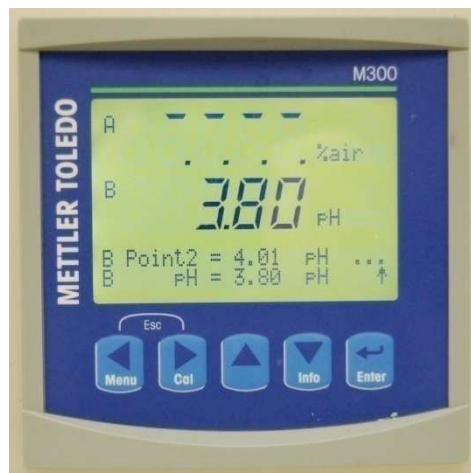
15. A pH szenzort be kell rakni a pH 4-es puffer oldatba (rózsaszín), majd újra le kell ütni az „Enter” gombot a második pont indításához.



pH 4-es pufferoldat (rózsaszín)

pH elektróda pH 4-es pufferben

Az „Enter” leütése után elindul a pH kalibráció 2. pontja.



pH 4-es kalibráció folyamatban

16. A 2. pont után „Enter” leütésével kell elmenteni a kalibrációt.



kalibráció mentése előtti képernyő

Az „Enter” leütése után, ha sikeres a kalibráció, akkor megjelenik a „Calibration Successful” felirat.



sikeres kalibráció

17. Még egyszer meg kell nyomni az „Enter” gombot, amikor a következő felirat megjelenik.



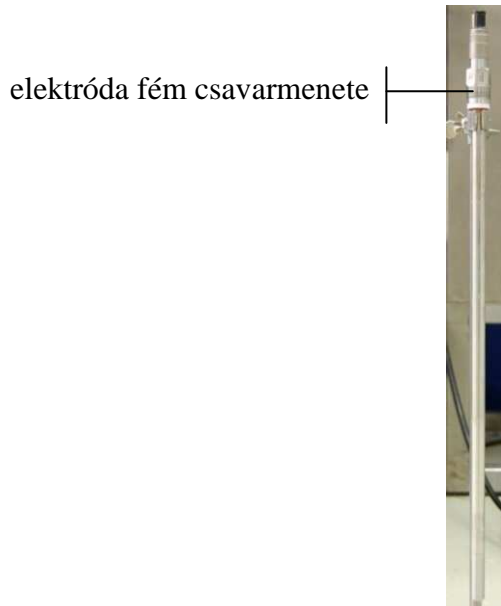


„Enter” után az aktuális pH érték látható.

18. A pH elektródát ki kell venni a pH 4-es oldatból, le kell mosni ioncserlét vízzel, majd szárazra kell törölni.
19. A szenzor berakható a fermentorba.

### 2.3.3 Oldott oxigén elektróda kalibrációja

Általában csak sterilizálás után kalibráljuk az oldott oxigén elektródát egy pontban, de az elektróda ellenőrzéséhez célszerű sterilizálás előtt is. Ez az egy pont a levegővel telített, kevertetett 100%-os kalibrációs pont. A keverés fordulatszámát mindig a fermentáció során alkalmazott legnagyobb fordulatszámra kell felvenni és a maximális levegőmennyiséget kell a fermentorba bevezetni.



fém fermentor oldott oxigén elektródája

#### Kalibráció lépései:

1. A fermentort fel kell tölteni a megfelelő táptalajjal és habzásgátlót (pl: polipropilén-glikol) is kell csepegtetni.  
Habzásgátló: 1 csepp/l baktérium, 2 csepp/l gomba fermentáció esetében. Ha az össtérfogat (leoltott fermentor) például 12 liter, akkor 24 csepp (gomba fermentáció).
2. Az oldott oxigén elektróda piros ó-gyűrűje felett található fém csavarmenetét meg kell szilikon zsírral kenni.
3. Az elektródát bele kell tekerni a rögzítő csövébe. Ez a cső rögzíti az elektródát a fermentor portjához.

forgatható rész  
belül található egy csavarmentet

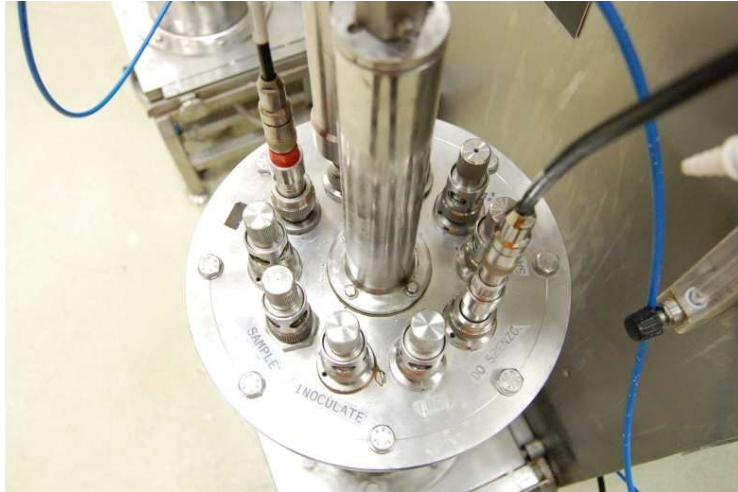


oldott oxigén elektróda rögzítő csöve



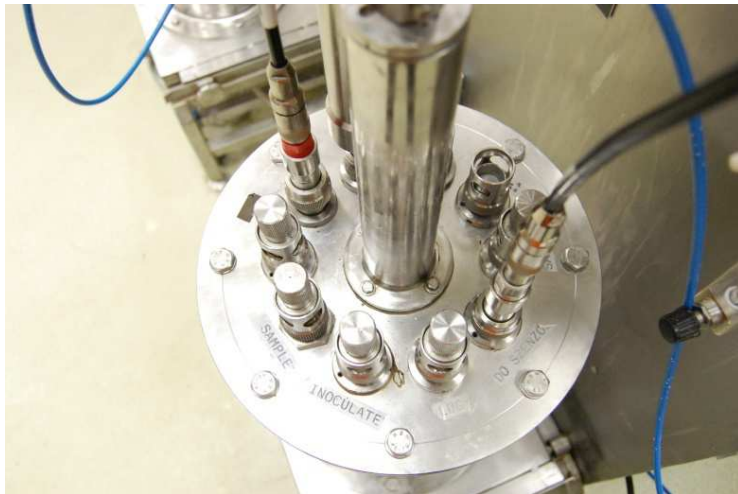
oldott oxigén elektróda rögzítő csőben

4. Az elektródát alul le kell mosni ioncserélt vízzel és szárazra kell törölni.
5. Az elektródát be kell helyezni a fermentorba és rögzíteni kell a cső forgatható részének a segítségével.
6. Csatlakoztatható az elektróda kábel az elektródához.



fermentorba berakott és csatlakoztatott oldott oxigén elektróda

7. A levegőport dugóját ki kell csavarni.



fermentor kicsavart levegő dugóval

8. Meg kell nyitni a rotamétert (lebegőtestes áramlásmérő) és be kell állítani a megfelelő levegőmennyiséget (liter/perc).

A rotaméter egy kúpos csőből, amit mérőcsőnek és egy lebegőtestből, amit úszónak nevezünk áll. A mérendő közeg (levegő) a felfelé szélesedő csőben áramlik, amely megemeli az úszót. Az emelkedés mértéke arányos a térfogatárammal.



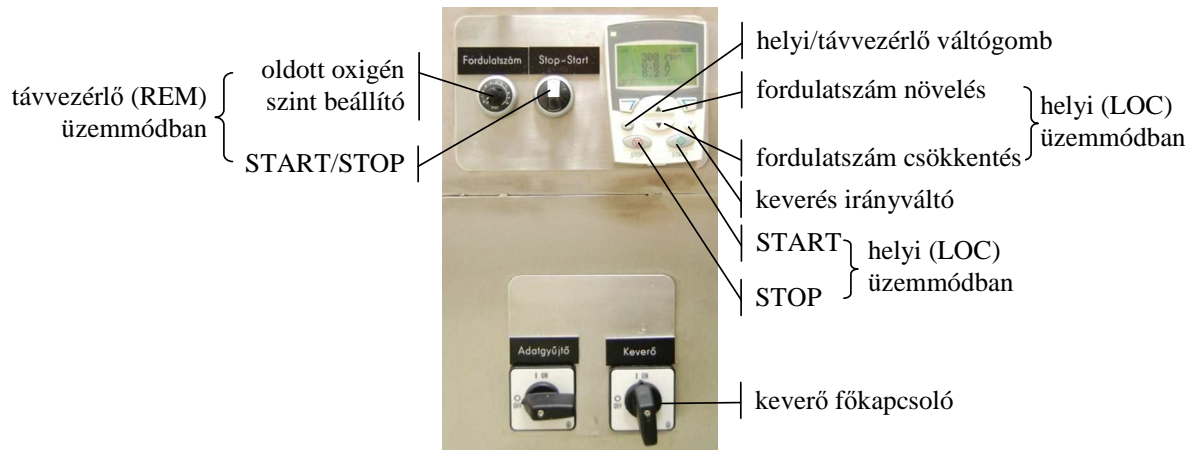
beállított rotaméter (például 8 l/min)

9. A levegő csőre kell csatlakoztatni egy levegő tűskével és szűrővel ellátott csövet.
10. A tűskét át kell szűrni a levegő szeptumon és be kell tekerni a szorítógyűrűbe.




szeptumon átszűrt és betekert levegőtűske

## 11. El kell indítani a kevertetést.



keverő vezérlése

### Keverő elindításának lépései:

- I. Ha a motortengely nincsen összekötve a keverőtengellyel, akkor a motortengely csatlakozását rá kell húzni a keverőtengelyre.
  - II. Be kell kapcsolni a keverés főkapcsolót.
  - III. Ha a kijelző jobb felső sarkában „REM” (távvezérlő) felirat látható, akkor meg kell nyomni a „LOC/REM” (helyi/távvezérlő váltó) gombot egyszer, hogy átváltson „LOC” helyi üzemmódba.
  - IV. Majd meg kell nyomni a zöld  START gombot és elindul a keverő.
  - V. A kijelző alatt középen a „▲” gombbal növelhető, a „▼” gombbal pedig csökkenthető a fordulatszám.
12. Körülbelül 10 percet várni kell, amíg a kijelzett oldott oxigén szint állandót nem mutat.

13. Először a „Cal” gombot kell leütni a kalibráció indításához.



kalibráció előtt

14. Csak az „Enter” gombot kell lenyomni, mert az oldott oxigén elektróda jelent meg.



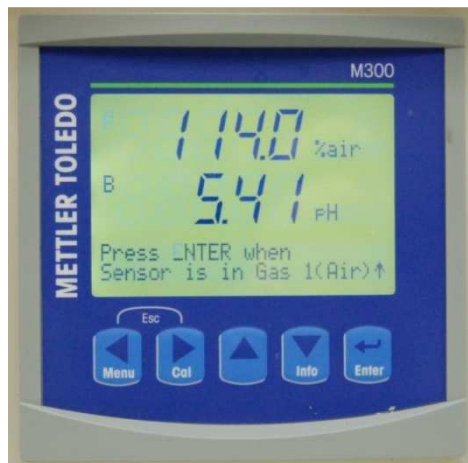
„Cal” gomb lenyomása után

15. Újra az „Enter”-t kell leütni, mert 1 pontos (100%) kalibrációt kell választani.



„Enter” gomb lenyomása után

16. „Enter”-t kell ütni újra, hogy elinduljon a levegővel telített kalibráció.



Az „Enter” leütése után elindul a kalibráció, amit a jobb alsó sarokban három pont jelez.



oldott oxigén kalibráció folyamatban

17. El kell menteni a kalibrációt az „Enter” gomb leütésével.



kalibráció elmentése



sikeres kalibráció

18. Újra „Enter”-t kell ütni.

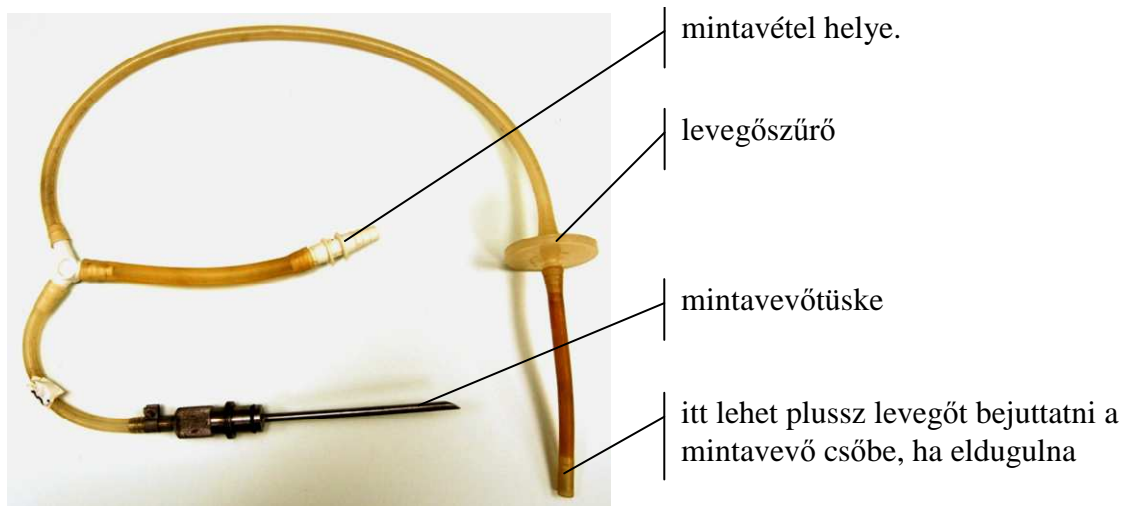


„Enter” leütése után megjelenő képernyő

### 2.3.4 Csövek előkészítése sterilizésre

Mintavevő cső előkészítése:

- Vattadugót kell tenni a mintavétel és a levegő bejuttatás helyére, majd le kell fedni őket alufóliával.
- A tűskét egy Falcon-csőbe kell helyezni és egy nagyobb alufóliával le kell fedni az egész fém résszel együtt.
- A levegőszűrőt és a háromágú olivát is be kell csomagolni alufóliával.
- Hoffmann-szorítóval kell elzárni a csövet a levegő bemenet-levegőszűrő, a levegőszűrő-háromágú oliva, háromágú oliva-tüske és a háromágú oliva-mintavétel helye között.



mintavevő cső

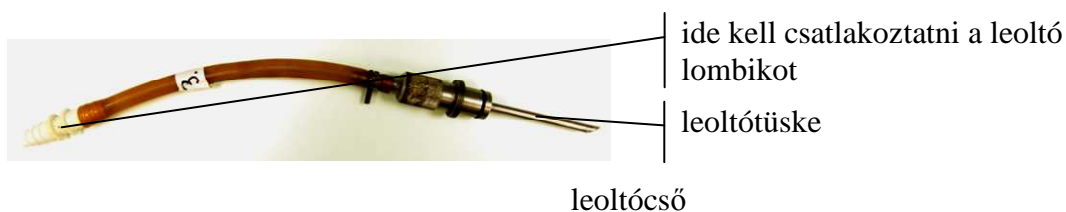
Sav vagy lúg adagolócső előkészítése:

- Vattadugót kell rakni a szilikon csővégbe, majd le kell fedni alufóliával.
- A tűskét egy Falcon-csőbe kell helyezni és egy nagyobb alufóliával le kell fedni az egész fém résszel együtt.
- Le kell fedni alufóliával az adagoló pumpába beköthető teljes csőszakaszt és az olivát.
- Egy Hoffmann-szorítóval el kell zárni a vékonyabb szilikon csövet az oliva után.



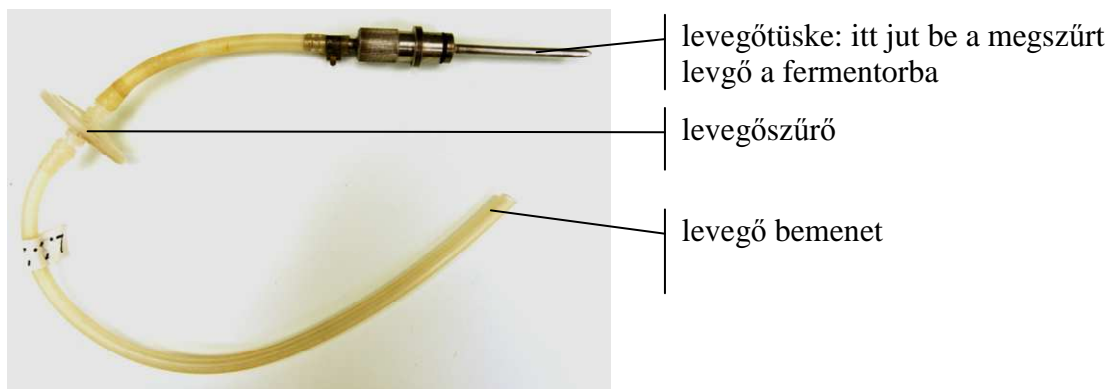
#### Leoltócső előkészítése:

- Vattadugót kell tenni az olivába és le kell fedni alufóliával.
- A tűkét egy Falcon-csőbe kell helyezni és egy nagyobb alufóliával le kell fedni az egész fém résszel együtt.
- Egy Hoffmann-szorítóval el kell zárni a csövet az oliva és a tüske között.



#### Levegőcső előkészítése:

- Vattadugót kell tenni a szilikoncső végébe és le kell alufóliával fedni.
- A tűkét egy Falcon-csőbe kell helyezni és egy nagyobb alufóliával le kell fedni az egész fém résszel együtt.
- El kell zárni a csövet Hoffmann-szorítóval a tüske-levegőszűrő és a levegőszűrő-szilikon csővég között.



Az előkészített csöveket autoklávban legalább 1 óra hosszáig kell sterilizálni 121°C-on.

### 2.3.5 A fermentor in situ sterilizése

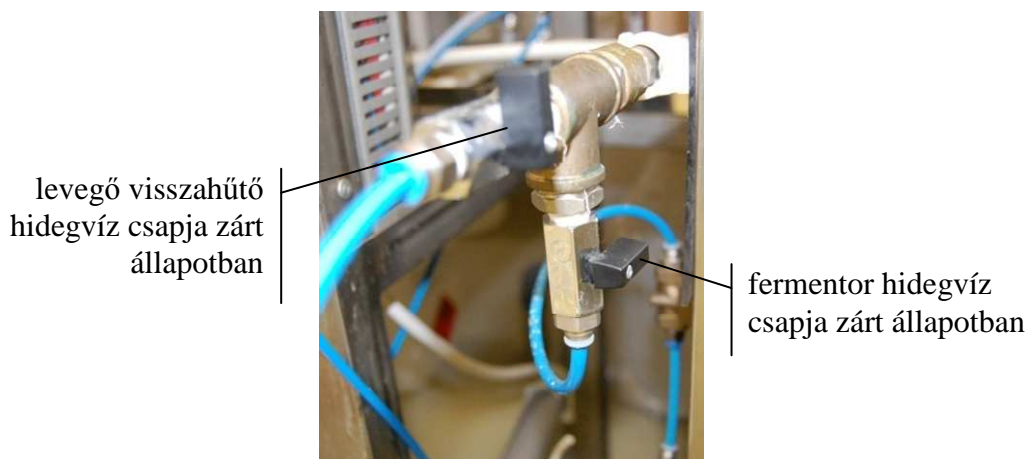
1. A sterilizés indítása előtt el kell indítani a kevertetést, nélküle sterilizálni tilos.  
A keverőt szárazon járatni tilos.
2. Be kell állítani a két órás sterilizési időt (felfűtés + hőntartás ideje).



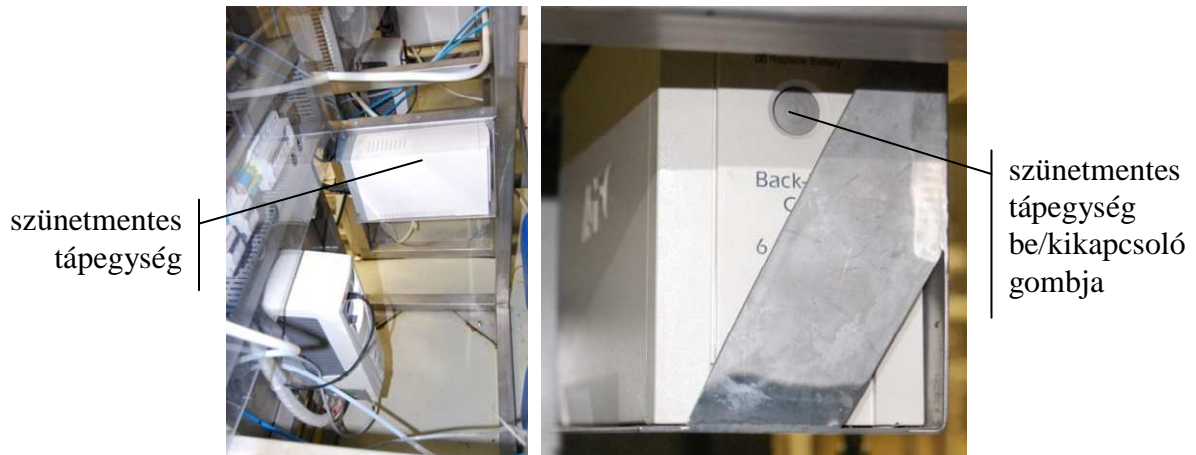
sterilizés időzítője

Körülbelül 1 óra 10 perc alatt fűt fel a két fűtőszál 121°C-ra. A felfűtés ideje főleg az elmenő levegőszeleptől függ. A megmaradó 50 percben 121°C-os állandó hőmérsékletet tart. Ha a hőmérséklet nem tudja elérni a 121°C-ot az elmenő levegőszelep hibája miatt, akkor lehet, hogy több mint 1,5 liter víz is elgőzölög a fermentorból a sterilizálás alatt. Ekkor ezt az elvesztett mennyiséget steril ioncserélt vízzel pótolni kell a leoltócsövön.

3. A fermentor és az elmenő levegő visszahűtő hidegvíz csapjának zárva kell lennie sterilizálás alatt.



4. Meg kell nyomni a fűtés elektronika szünetmentes tápegységének be/kikapcsoló gombját addig, amíg egy rövidebb és egy hosszabb sípolást hallunk. A szünetmentes tápegység a fermentor mögött található.



5. Bekapcsolható a fűtés főkapcsoló. Ekkor elkezd a fermentort felfűteni a sterilizációs hőmérsékletre (121°C). Ha a fűtés bekapcsolása után az sterilizációs időzítőt nullára forgatjuk, akkor a felfűtés nem folytatódik tovább, hanem a korábban beállított hőmérsékletet fogja tartani a hőmérsékletszabályozó.



6. 110°C felett az elmenő levegő szelepe el kezd gőzt kifűjni, ezért a szelepfedelelet el kell zárni hőálló gumikesztyű segítségével, de csak addig, hogy megálljon a gőz kifűjása. Néhány perc után újra el kezd gőzt kifűjni, akkor újra el kell zárni, hogy megálljon a gőz kifűjása. A 121°C-os hőmérsékletet megközelítve már teljesen el kell zárni. Ha teljesen el lett rázva a szelep, akkor is fog gőz kiáramlani.



Ezen a szelepfedélen kell zární óramutatóval megegyezően kb. 110°C után, ha megjelenik a gőz.

[elmenő levegő szelep gőzkifújása sterilizálás közben \(videó\)](#)

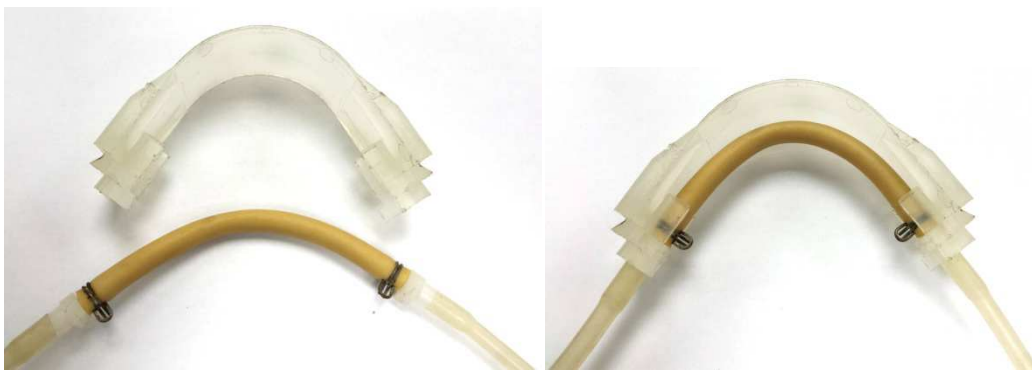
7. Ha letelt a két óra, akkor a hőmérséklet elkezd csökkenni. Be kell kapcsolni a kompresszort, meg kell nyitni a levegő főcsapot és a fermentorhoz tartozó levegő csapot.
8. Ha 102°C-t elérte a hőmérséklet, akkor elő kell készíteni egy lesterilizett levegőcsövet szűrővel és tűskével. 121°C-ról 102°C-ra kb. fél óra alatt tud lehűlni a fermentor.
9. A levegőcső bemeneti részéről le kell venni az alufóliát és ki kell venni a vattát.
10. A kibontott csövet csatlakoztatni kell a rotaméter felett lévő levegőcsőhöz.
11. A levegőszűrő előtt és után található két Hoffmann-szorítót le kell venni.
12. Meg kell nyitni a levegőtétést a rotaméteren.
13. Hőálló gumikesztyűt kell felvenni mindkét kézre.
14. Ki kell tekerni a levegő fém dugóját.
15. Elő kell készíteni a formaldehid-etanolos üveget.
16. Óramutatóval ellentétesen be kell tekerni a levegőcsövet.
17. Ki kell bontani a levegőcső tűskéjét áramló levegő mellett.
18. A tűske végét bele kell mártani a formaldehid-etanolos üvegbe.
19. Át kell szűrni a levegőszepetumot a levegőtűskével, és óramutatóval megegyezően be kell tekerni a port szorítógyűrűbe. Ha nem lehet betekerni, akkor a port szorítógyűrűt egy kicsit ki kell tekerni. A levegőcsövet nem szabad megtörni, mert akkor a fermentorból a levegőszűrőbe kerülhet a fermentorból kiáramló túlnyomás alatt lévő steril táptalaj. Ez a táptalaj eltömítheti a levegőszűrőt.
20. Ha sikeresen rögzítve lett a levegőtűske, akkor ki kell nyitni az elmenő levegőszelepet addig, hogy az első piros kör láthatóvá váljon a levegőszelep felső


részén. Ekkor körülbelül 0,5 bar túlnyomás van a fermentorban. Az eltávozó levegőnek sziszegő hangja van.

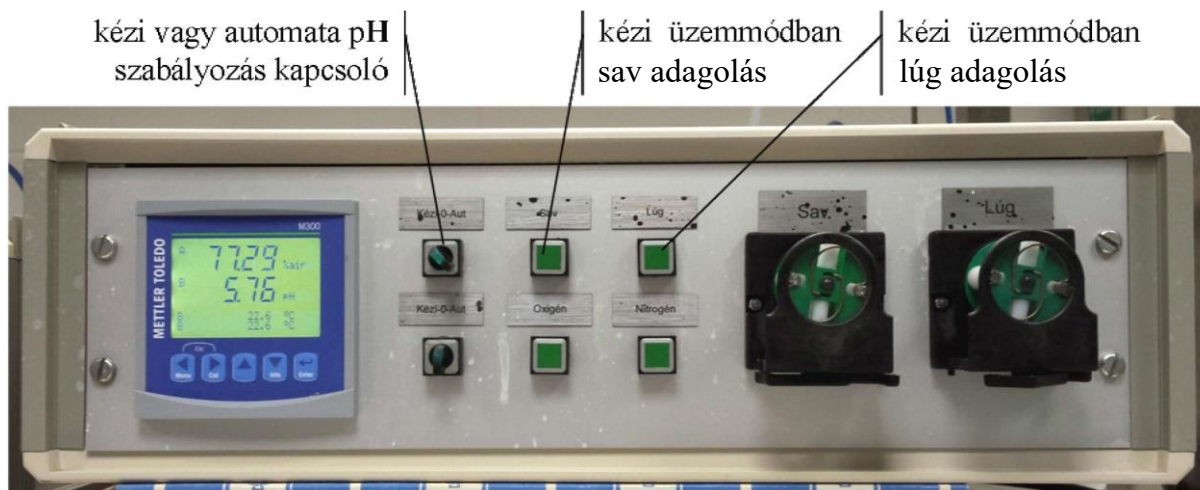
21. Ha a hőmérséklet lehűlt 85°C-ra, akkor meg kell nyitni a fermentor és az elmenő levegő visszahűtő hidegvíz hűtését. 102°C-ról 85°C-ra kb. 20 perc alatt hűl le a fermentor. Innen kb. 20-25 perc szükséges ahhoz, hogy 37°C-os hőmérsékletet elérje.

Sav és lúg csövek bekötése fermentorba:

1. Elő kell készíteni egy lesterilizett tüskés sav/lúg adagolócsövet.
2. Fel kell venni egy vastagabb falu gumikesztyűt. A gumikesztyűt érdemes technikai etanollal lepermetezni.
3. Ki kell tekerni a sav vagy a lúgadagoló port fém dugóját.
4. Elő kell készíteni a formaldehid-etanolos üveget.
5. Ki kell bontani a sav/lúg cső túske felőli részét.
6. A tüskét bele kell mártani a formaldehid-etanolos üvegbe.
7. Át kell szűrni a leoltó szeptumot és be kell tekerni a port szorítógyűrűjébe.
8. Ki kell csomagolni a cső adagolópumpába rakható részét az alufóliából, majd bele kell rakni egy fehér színű műanyag kalodába.



9. Le kell ellenőrizni, hogy merre forog a pumpa, amihez be kell kapcsolni a pH és oldott oxigén szabályozót hátul és a pH szabályozást kézire kell kapcsolni. A pumpa óramutatóval megegyezően  forog. A zöld sav vagy lúg gombok megnyomására elindul a pumpa.



pH és oldottoxigén szabályozó

10. A csövet a kalodával együtt lehet berakni a pumpába. A rögzítéshez el kell forgatni a pumpa alsó részén található fekete műanyagot.



sav és lóg adagolópumpa

11. Be kell kötni a korábban kifőzött sav vagy lóg üvegeket a cső végéhez: Le kell venni a cső végéről az alufólia borítást → ki kell venni a vattát a cső végéből → a cső végét formaldehid-etanolos üvegbe kell mártani → amíg a csővég a formaldehid-etanolos üvegben van le kell venni a sav vagy lóg cső csatlakozásának alufólia borítását → kivehető a csővég a formaldehid-etanolos üvegből és csatlakoztatható az üvegekhez → a formaldehid-etanolos üveg visszazárható.

### **2.3.6 Fermentáció kivitelezése a 15 literes fémfermentorban**

#### Fermentor leoltása előtti feladatok

1. Elő kell készíteni egy lesterilizett tüskés leoltócsövet.
2. Fel kell venni egy vastagabb falu gumikesztyűt. A gumikesztyűt érdemes technikai etanollal lepermetezni.
3. Ki kell tekerni a leoltó port fém dugóját.
4. Elő kell készíteni a formaldehid-etanolos üveget.
5. Ki kell bontani a leoltó cső túske felőli részét.
6. A tüskét bele kell mártani a formaldehid-etanolos üvegbe.
7. Át kell szűrni a leoltó szeptumot és be kell tekerni a port szorítógyűrűjébe.

#### Fermentor leoltása

1. Egy leoltó lombikba át kell tölteni a baktérium vagy gomba kultúrát a steril boxban.
2. Le kell venni a fermentor leoltó csövéből és a leoltó lombik csövéből lévő alufóliát.
3. Mindkét csövet formaldehid-etanolos üvegbe kell mártani.
4. Csatlakoztatni kell a két csövet egymáshoz.
5. El kell zárni a fermentor levegőztetését.
6. Ha már nem jön ki levegő a fermentor elmenő levegőszelepén, akkor megnyitható a leoltócsövön és a leoltólombik csövén lévő Hoffmann-szorító.
7. A leoltó lombikot folyamatosan rázogatva befolyik a fermentorba az inokulum tenyészet.
8. Ha bejutott a fermentorba a mikroba, akkor el kell zárni a leoltó cső Hoffmann-szorítóját.
9. Meg kell nyitni a levegőztetést.
10. Meg kell bontani a leoltócső és a leoltólombik csatlakozását.
11. A leoltócsövet formaldehid-etanolos üvegbe kell mártani és be kell csomagolni alufóliával.

#### Mintavétel előtti feladatok

1. Elő kell készíteni egy lesterilizett tüskés mintavevő csövet.
2. Fel kell venni egy vastagabb falu gumikesztyűt.
3. Ki kell tekerni a mintavevő port fém dugóját.
4. Elő kell készíteni a formaldehid-etanolos üveget.

5. Ki kell bontani a mintavevő cső túske felőli részét.
6. A tuskét bele kell lógatni a formaldehid-etanolos üvegbe.
7. Át kell szűrni a mintavevő szeptumot és be kell tekerni a port szorítógyűrűjébe.

#### Mintavétel a fermentorból

1. A mintavevőcső végéről le kell venni az alufólia borítás és ki kell venni a vattát a csőből.
2. Le kell venni a Hoffmann-szorítót a mintavevőcső túske feletti részéről.
3. A mintavevőcső végét formaldehid-etanolos oldatba kell mártani.
4. Egy 50 ml-es falkon csövet kell helyezni a mintavevőcső vége alá.
5. Ki kell nyitni a mintavevőcső végéhez közeli Hoffmann-szorítót.
6. Ki kell engedni kb. 30 ml fermentlevet. Ez lesz a holt térfogat, ami nem fontos a számunkra. Előfordulhat, hogy köpködve áramlik ki a minta a fermentorból.
7. El kell szorítani kézzel a csövet, vagy a Hoffmann-szorítót el kell zárni.
8. Egy másik Falcon-csövet kell a mintavevőcső vége alá helyezni.
9. Meg kell nyitni a Hoffmann-szorítót vagy a cső szorítását abba kell hagyni, hogy a minta kiáramoljon a Falcon-csőbe. Ez lesz a tényleges minta.
10. A Hoffmann-szorítót el kell zárni.
11. A mintavevőcső végét formaldehid-etanolos oldatba kell mártani és a csővéget alufóliával le kell fedni.

#### Hőmérsékletszabályozás

A hőmérséklet érzékelésére fém ellenálláshőmérőt használunk.



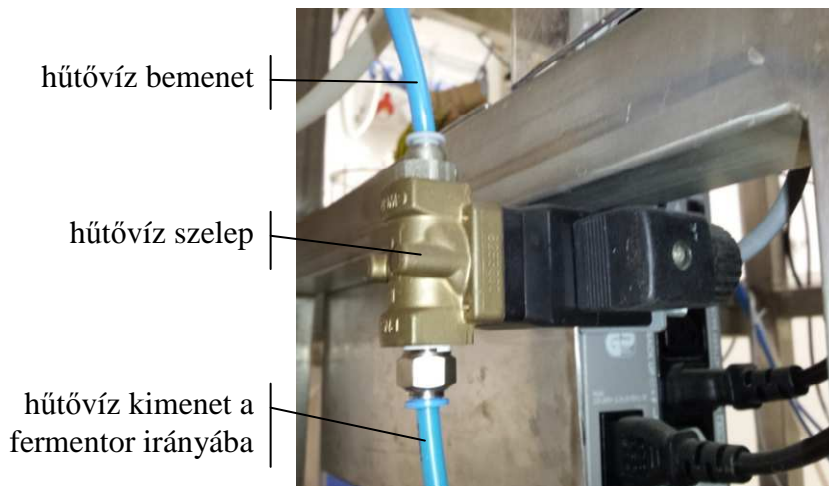
15 literes fémfermentor ellenállás hőmérőjének védőcsöve

Ebben a csőben van az ellenállás hőmérő.



15 literes fémfermentor ellenállás hőmérője

A hőmérő jelének hatására kapcsol be a fűtőszál, vagy nyílik a hűtővíz szelepeje.



Ahhoz, hogy a fermentor hűteni tudjon, nyitva kell lennie a hűtővíz csapnak.





A hűtést két hűtő patron látja el. Ez a két patron benyúlik a fermentorba alulról, amelyeken keresztüláramlik a hidegvíz. Az elhasznált hűtővíz a szennyvízcsatorna hálózatba kerül.

A fűtés két fűtőszál segítségével történik, amelyek alulról nyúlnak be a fermentorba.

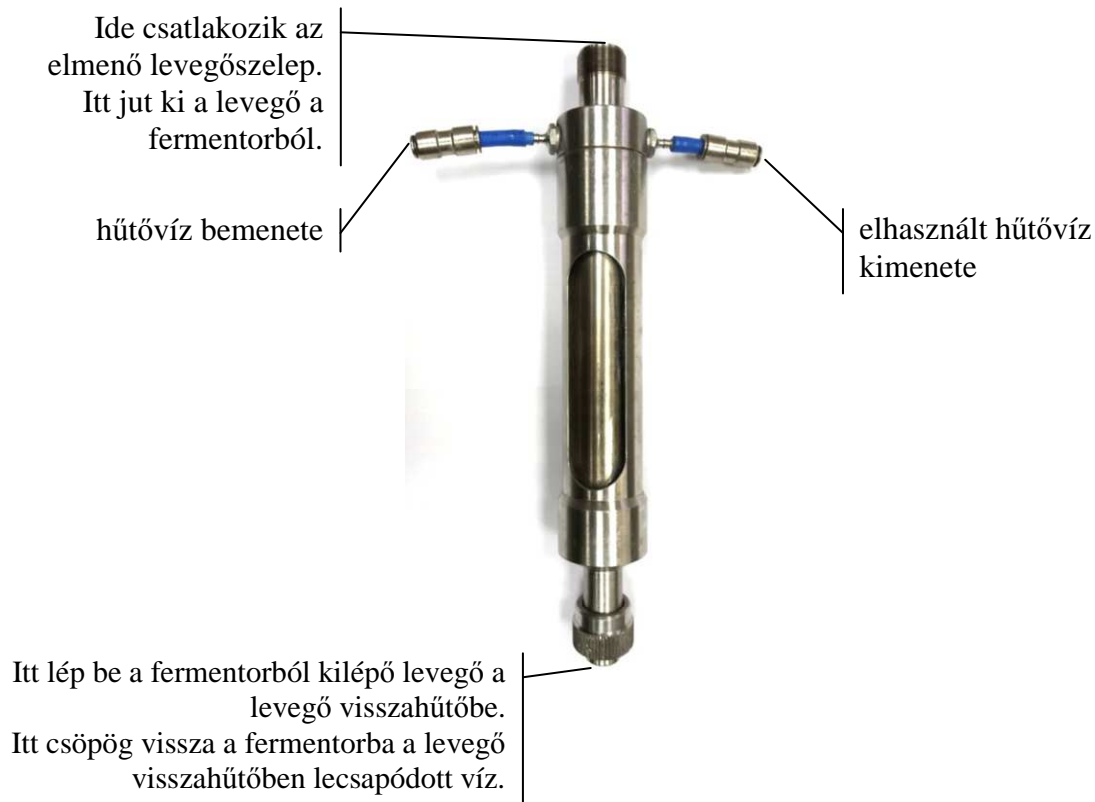


fűtőszál

A fermentáció hőmérséklete a hőmérséklet kijelző jobb alsó sarkában lévő két nyomógombjával növelhető „” vagy csökkenthető „”. A piros szám az aktuális, a zöld pedig a beállított hőmérsékletet jelenti. A hőmérsékletszabályozó a beállított értéket próbálja tartani. Kevertetés nélkül nem lehet hőmérsékletet szabályozni.

### Elmenő levegő visszahűtője

Rajta keresztül áramlik ki a fermentorból az elhasznált levegő. Belőle a levegő az elmenő levegőszelepen jut ki a labor légterébe. Feladata, hogy visszahűtse a kiáramló levegőt és mentesítse a nedvességtől. Ha nem áramlik rajta keresztül hidegvíz, akkor a kiáramló levegő magával viszi a nedvességet. Nélküle csökkenne a folyadékszint a fermentorban, töményebbé válhatna a fermentlé. Ha jól működik, akkor hidegnek kell lennie. A hűtővíz csapjának nyitva kell lennie. Belőle az elhasznált hűtővíz a szennyvízcsatorna hálózatba jut.





### Keverés

Elindításához csatlakoztatni kell a motortengelyt a keverőtengelyhez (mozgatható csatlakozás lehúzása) és a keverés főkapcsolót 0-ról 1-es állásba kell elfordítani.

Helyi (LOC) és távvezérlő (REM) üzemmódban használható. A két üzemmód között a kijelző bal alsó sarkában lévő LOC/REM gombbal lehet váltani, ha áll a keverő.

Helyi (LOC) üzemmód:

Sterilizés közben és oldott oxigén elektróda nélküli fermentációkhoz használjuk. A keverőt a zöld  START gombbal lehet elindítani és a piros  STOP gombbal lehet megállítani.

Kézzel lehet a fordulatszámot változtatni a kijelző alatt középen lévő „▲” (növelés) és „▼” (csökkentés) gombokkal.



Távvezérlő (REM) üzemmód oldott oxigén (DO) szabályozáshoz:

Akkor használjuk, ha az oldott oxigén szintet (%) akarunk szabályozni a fordulatszám változtatásával. Ekkor a kijelző mellett lévő „Sart-Stop” kapcsolóval indítható és állítható le a keverés. A Sart-Stop kapcsoló mellett baloldalt lévő szabályozóval lehet beállítani azt az oldott oxigén %-ot, amit tartani szeretnénk a fermentorban. A %-os érték a kijelző jobb felső sarkában látható. Óramutatóval megegyezően forgatva növelhető, míg vele ellentétesen csökkenthető a %-os szint. REM üzemmód használatához csatlakoztatni kell az oldott oxigén elektródát.



A szabályozás a megadott minimális és maximális fordulatszám közötti értékekkel lehetséges. A két érték megváltoztatásához le kell állítani a kevertetést. Le kell ütni a kijelző jobboldala alatt lévő gombot a menübe lépéshez. → A „▲” és „▼” gombokkal ki kell választani a „Változó paraméterek” menüpontot. → A belépéshez újra le kell ütni a kijelző jobboldala alatt lévő gombot. → A következő menüben a „▲” és „▼” gombokkal ki kell választani a 2001-es

menüpontot. (Minimális fordulatszám) → Módosításhoz a kijelző jobboldala alatt lévő gombot kell megnyomni. → A „▲” és „▼” gombokkal változtatható a minimális fordulatszám. → Mentéshez a kijelző jobboldala alatt lévő gomb, visszalépéshez a kijelző baloldala alatt lévő gomb használható. Hasonlóan állítható be a maximális fordulat is, csak akkor a 2002-es menüpontba kell belépni. Ha forog a keverő, akkor nem lehet felülrni a fordulatszámokat. A minimális és a maximális fordulatszám megadásakor a kívánt fordulatszámot meg kell szorozni 2,66-al az áttétel miatt. Például: 400 rpm-es minimális fordulat esetén  $400 * 2,66 \approx 1060$ -as rpm-et kell megadni. Az értéket 10-el oszthatóra kell kerekíteni.

### pH szabályozás

- I. Be kell állítani azt a pH értéket (pl pH 7), amit tartani szeretnénk a fermentorban.
  1. Az M300-as jeladó menüjébe kell belépni a ◀ „Menu” gomb lenyomásával.
  2. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „PID setup” menüpontot.
  3. A belépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
  4. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „Tune parameters” menüpontot.
  5. A belépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
  6. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „PID on” mellett a „c”-t.
  7. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
  8. A „Setpoint” mellé be kell írni a pH 7-es értéket. A számokat a ▲ vagy a ▼ gombok segítségével lehet kiválasztani. A következő karakterre a ► gomb segítségével lehet továbblépni.
  9. A ► gomb segítségével lehet a „Dead Band”-re (holtsávra) átlépni, ahova 0.05-ot kell beírni.
  10. A tovább lépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
  11. A „Prop Limit Low” mellé 2.0-t, míg a „Prop Limit High” mellé 12.0-t kell beírni.
  12. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
  13. A „Corner Low” mellé 2.0-t, míg a „Corner High” mellé 12.0-t kell beírni.
  14. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
  15. Újra „Enter”-t kell ütni, hogy elmentsük a beállításokat.

## II. lépés:

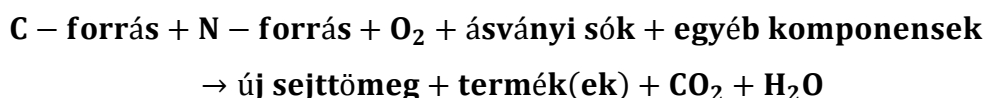
1. Be kell lépni a menübe a ◀ gomb lenyomásával.
2. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „Configure” menüpontot.
3. A belépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
4. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „Set points” menüpontot.
5. A belépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
6. Baloldalt az „SP” mellé 1-et, míg a „Measurement” után c-t kell beírni.
7. „Az SP1 Type=” mellet ki kell választani a „High”-ot.
8. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
9. „SP1 High=” mellé 7.05-ot kell beírni.
10. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
11. A „Relay #” mellett 4-nek kell lennie. A 4-es relét állítjuk hozzá a sav pumpához.
12. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
13. Az „R4 Delay” mellé 10-et, az „R4 Histeresis” mellé 0.0-t kell beírni.
14. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
15. A „Relay Hold” mellé Last-ot, míg az „R4 State =” mellé Inverted-et kell beállítani.
16. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
17. Újra „Enter”-t kell ütni, hogy elmentsük a beállításokat.
18. Be kell lépni a menübe a ◀ gomb lenyomásával.
19. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „Configure” menüpontot.
20. A belépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
21. A ▲ vagy a ▼ gombok segítségével ki kell választani a „Set points” menüpontot.
22. A belépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
23. Baloldalt az „SP” mellé 2-t, míg a „Measurement” után c-t kell beírni.
24. „Az SP2 Type=” mellet ki kell választani a „Low”-t.
25. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
26. Az „SP2 Low=” mellé 6.95-ot kell beírni.
27. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
28. A „Relay #” mellett 2-nek kell lennie. A 2-es relét állítjuk hozzá a lág pumpához.
29. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
30. Az „R2 Delay” mellé 10-et, az „R2 Histeresis” mellé 0.0-t kell beírni.
31. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.
32. A „Relay Hold” mellé Last-ot, míg az „R2 State =” mellé Inverted-et kell beállítani.
33. A továbblépéshez le kell ütni az „Enter” gombot.

34. Újra „Enter”-t kell ütni, hogy elmentsük a beállításokat.

### 3 A sejt növekedés kinetikai leírása

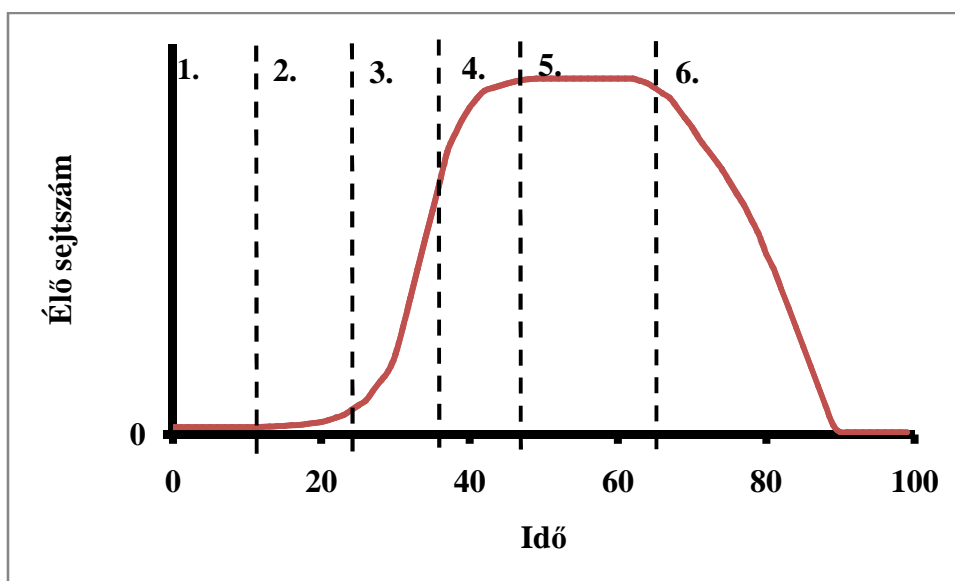
A mikroorganizmusok (ős és eubaktériumok, fonalas és élesztőgombák), illetve emlős és rovarsejtek (valamint ezek enzimeinek alkalmazásával) nagy gazdasági értékkel bíró termékek állíthatóak elő fermentációs úton. A reakciólépések, teljes folyamatok és távolabbról nézve, teljes gyártóegységek tervezéséhez, illetve ezek gazdaságos üzemeltetéséhez elengedhetetlen, a lezajló folyamatok - minél pontosabb és egyszerűbb - matematikai leírása.

A fermentációs folyamatok kinetikájának megértéséhez először az egyszerűbb kémiai, majd biokémiai, végül a teljes – és rendkívül összetett - biológiai oldalról kell vizsgálnunk. Alapvetően a sejtek életfolyamatai során lezajló események (növekedés, egyes anyagok lebontása és termelése, szaporodás, stb.) a következő kémiai egyenlettel adhatóak meg aerob folyamatok során.



melynek bal oldalán a kiindulási anyagokat, szubsztrátokat, jobb oldalán a mikroba által képzett új anyagokat tüntetjük fel.

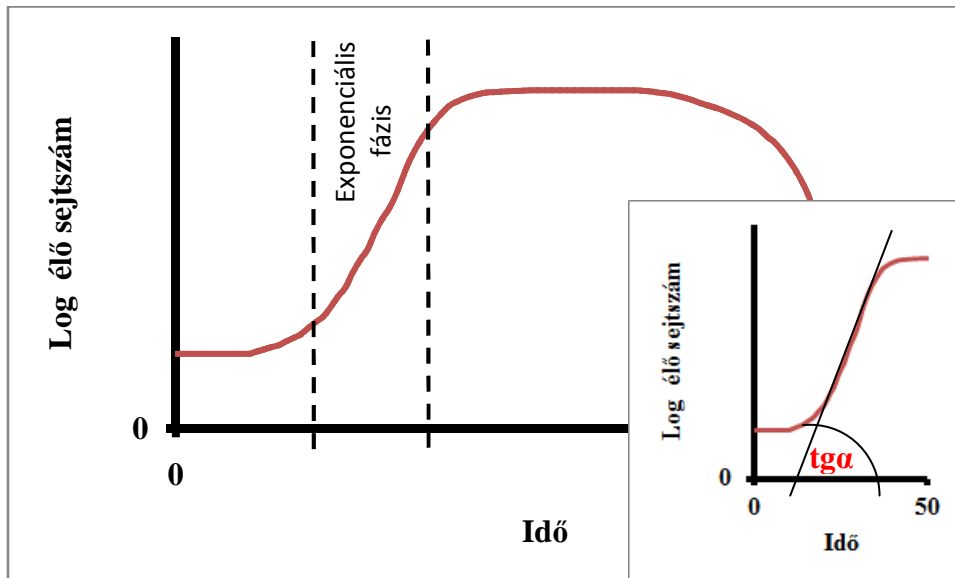
Bármilyen folyamatról is beszélünk, melyben nem csak enzimeket, hanem teljes sejteket alkalmazunk, a legelső lépés a megfelelő nagyságú, „munkára fogható” sejt tömeg előállítása. Ezen egyszerűnek hangzó feladat gazdaságosan kivitelezhető elvégzéséhez, ismernünk kell a sejtek növekedését leíró törvényszerűségeket. A legáltalánosabb képet az alábbi – idealizált – diagram alapján kaphatjuk egy batch (szakaszos) fermentáció során, az élő sejtszám változásáról.



Az alábbi diagramon követhetjük végig egy idealizált fermentáció élő sejtszámának változását az idő függvényében.

A diagramot hat részre tagolhatjuk az élő sejtek számának változása szerint, annak irányát (növekedés vagy éppen csökkenés), illetve a változás intenzitását alapul véve. A  $t_0$  időpillanat a sejtek, spórákfriss tápoldatra juttatásának, vagyis a lombik vagy reaktorleoltásának pillanata, ezután egy ideig a sejtek nem növekednek és a sejtszám nem változik, ezt adaptációs szakaszának nevezzük, melyben a sejtek hozzászoknak az új környezethez. A sejtszám elhanyagolhatóan kis mértékben változik, ezért jellemzően 0-nak tekintjük a növekedést. A következő szakaszban már tapasztalható, mérhető a növekedés, mely az idő előre haladásával egyre fokozódik – ez a gyorsuló növekedés szakasza – melyben az összes sejt a maximális sebességgel szaporodik. A fermentációnak ezt a szakaszát exponenciális fázisnak nevezzük, és kitüntetett szereppel bír a fermentáció folyamatában. Az ezt követő időintervallumban a szaporodás intenzitása már hanyatló, míg végül elérünk egy stacioner fázisba, ahol az élő sejtek száma állandó lesz, mivel a szaporodás és a sejtpusztulás mértéke azonosnak tekinthető. A stacioner fázist követően a pusztulás felgyorsul, egyre kevesebb lesz az élő sejt a rendszerben, a fermentációnak ezt a végső szakaszát hanyatló fázis névvel illeti a szakirodalom.

Egy fermentáció adatsorából viszonylag egyszerű módszerrel megadható, megtalálható az exponenciális szakasz, ehhez az úgynevezett szemilogaritmikus ábrázolási módot kell alkalmazni (az elvégzendő gyakorlat során is ezt fogjuk alkalmazni). Ehhez a mért sejtszámok logaritmusát kell ábrázolni az idő függvényében.



Aszemilogaritmikus ábrázolási mód. Az 1. ábra idealizált sejtszám adatainak természetesen alapú logaritmusát képeztük, majd a kapott adatokat ábráztuk az idő függvényében. Ezen a diagramon könnyedén megadható az exponenciális fázis intervalluma, melyet a kiemelt részen jelöltünk. Az exponenciális fázisra illesztett egyenes és az X tengely által bezárt szög tangense megegyezik a specifikus növekedési rátával, melynek definiálását és matematikai leírását a későbbiekben részletezzük.

A fermentációs folyamatok kinetikájának tárgyalásánál, a könnyebb megértés okán, tekintsünk először egy olyan folyamatot, melyben az alkalmazott mikroorganizmusok jól szabályozott, állandó, optimális paraméterek mellett szaporodnak – a kellő sejttömeg eléréséig. Ezek a fermentációs paramétereket – a teljesség igénye nélkül, általánosságban:

- hőmérséklet,
- pH érték,
- a táptalaj egyes komponenseinek koncentrációja

A fermentációs eljárások közül a legegyszerűbb eseteket a szakaszos, vagy angolul „batch” fermentációs eljárások jelentik. Ezekben a folyamatokban a táptalaj minden komponense az indítás pillanatában a lombikban vagy fermentorban van (sterilen), és nem történik ráadagolás (kivételet képeznek persze ezek alól, az aerob fermentációs eljárások, ahol a levegő ráadagolása folyamatos). A legtöbb esetben már az inokulálás pillanatában szeretnénk tudni, mekkora az induló sejt vagy spóraszámunk a reakcióban, a kezdeti és további értékek megadásához az alábbi koncentráció egységeket alkalmazhatjuk:

- Darab sejt / egységnyi térfogat (db sejt/Liter vagy darab sejt/ml). Ez a tulajdonképpeni sejtkoncentráció, mely a sejtek darabszámát adja meg adott térfogatú fermentáléban nagy pontossággal. A sejtek számának megállapítására a legegyszerűbb esetben

valamilyen számlálókamrás módszert alkalmazunk (Bürker-, Thoma-kamra), de alkalmazhatunk automata sejtszámláló berendezéseket is. Mindkét módszer hátránya, hogy nem tudja megkülönböztetni az élő és a holt sejteket.

- A biomassza koncentrációja megadható szárazsejttömeg/egységnyi térfogat tekintetében is, melyet elterjedten neveznek a gyakorlati szaknyelvben DCW-nek, mely az angol, eredeti kifejezésből eredő mozaikszó (Dry Cell Weight, g/Liter, kg/m<sup>3</sup>). Ez a módszer sem alkalmas az élő és a holt sejtek számának elkülönített megállapítására.
- Emellett a sejtkoncentrációt számos más módon is megadhatjuk, többek között turbiditás (zavarosság) alapján – leginkább baktériumok esetében alkalmazott mérőszám, a módszer párja a nefelometria, mely a fermentlé fényszórását méri. Gyors, de kis pontosságú módszernek tekinthető az úgynevezett PCV (az DCW-hez hasonlóan, az angol kifejezés mozaikszava, Packed Cell Volume), mely megadott paraméterek melletti centrifugált sejttömeget jelenti.
- Az élő sejtszám megállapítására alkalmas egyik módszer a cm<sup>3</sup>-kénti telepkepző egységek számának meghatározása (angolul CFU – colony forming unit). A módszer lényege, hogy a fermentléből hígítási sort készítünk és a megfelelő hígításból szilárd agar lemezekre kioltott 1ml mintát a megfelelő hőmérsékleten inkubálva a megfelelő idő elteltével leszámoljuk a telepeket. Ekkor minden telepet egy sejtől eredeztetünk.

A mikrobák növekedésének megértéséhez, a fent említett lehetőségek bármelyikével kifejezhető a tenyészet növekedése, hiszen mind ugyanazt a tendenciát írja le. Viszont a későbbiekben bemutatott példák szemléltetéséhez, illetve a gyakorlati munka elvégzéséhez előnyös, ha a száraz sejttömeggel számolunk (g/L, kg/m<sup>3</sup>).

Alapvetően a genomban kódolt tulajdonságok határozzák meg a sejtnövekedést, melyekkel a környezet kihívásaira reagálni tudnak. A fermentációs mérnökök feladata, hogy olyan környezetet teremtsenek, melyben a lehető leggyorsabban előállítható a szükséges mennyiségű kultúra.

Az első kinetika fogalom melyet meg kell, ismerjünk, a növekedési sebesség, vagy növekedési ráta definíciója, mely sejtkoncentráció időegység alatt lezajló változását – sejttömeg növekedést, vagy éppen csökkenést írja le:

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} \quad (3.1)$$

ahol,  $r_x$  a növekedési sebesség,  $C_x$  a sejtkoncentráció.

Amennyiben a növekedési sebesség értéke egy időintervallumban állandó (mondjuk 3-8 órán keresztül) úgy a következő összefüggés is alkalmazható:

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (3.2)$$

Ezt az összefüggést nevezhetjük, az exponenciális, növekedési törvénynek. A „ $\mu$ ” (mű) egy konstans, melynek elnevezése a „specifikus növekedési ráta”, és a növekedés gyorsaságának a mérőszámaként tekinthetünk rá. Mértékegysége  $1/h$ , vagy  $h^{-1}$ .

Ezt a konstans felhasználva egy újabb fogalom bevezetése válik lehetségessé: azt az időt mely szükséges a sejtkoncentráció megduplázódásához megkettőződési, vagy duplikációs időnek nevezzük, jele „ $t_d$ ”, mértékegysége  $h$ . A duplikációs idő a következő összefüggéssel értelmezhető.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3.3)$$

Az idő mely eltelik két osztódás között egy sejt életciklusában generációs időnek nevezzük. Jele  $t_g$ , mértékegysége és értéke megegyezik a duplázódási idővel.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3.4)$$

vagyis

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_g} \quad (3.5)$$

A növekedés fogalma más oldalról is megközelíthető, ha például feltételezünk egy oltókulturát, melyet friss tápoldatba helyezünk  $t_0$  időpontban, ekkor a kezdeti mikrobakoncentráció  $C_{x0}$ . Bizonyos idő (az adaptációs fázis) eltelte után a sejtek szaporodni kezdenek, egy sejtből kettő lesz, majd ezek is ismételten, bizonyos idő eltelte után osztódnak a sejtek újabb generációját képezve. A tenyészet növekedésének matematikai leírása igazán csak az exponenciális növekedési szakaszban értelmezhető, ahol az adott körülmények között, rájuk jellemző, maximális sebességgel osztódnak. Ez a sebesség addig változatlan, míg valamely környezeti paraméter az optimális értéktől eltérővé nem válik és a növekedés üteme lassulni kezd.

Ha a sejtek száma  $C_{x0}$  volt a kezdeti időpontban, akkor  $t_g$  generációs idő eltelte után

$$2 \times C_{x0}$$

lesz az első generációban, majd a következőben

$$2 \times 2 \times C_{x0}$$

$n$  generáció múlva pedig

$$2^n \times C_{x0}.$$

Vagyis a sejtszámunk az általunk választott bármely időpillanatban kiszámítható (ahol a növekedés valamely fermentációs paraméter által nem korlátozott):

$$C_x = C_{x0} \times 2^n \quad (3.6)$$

vagyis logaritmikus alakba rendezve az egyenletet

$$\ln C_x = \ln C_{x0} + n \times \ln 2 \quad (3.7)$$

melyből n-t kifejezve:

$$n = \frac{\ln C_x - \ln C_{x0}}{\ln 2} \quad (3.8)$$

Amennyiben ismerjük a mikrobánk generációs idejét, a generációk száma megadható a t időpillanatban:

$$n = \frac{t}{t_g} \quad (3.9)$$

vagyis a (3.8) és a (3.9) egyenletet egymásnak megfeleltetve kapjuk, a (3.10) egyenletet

$$\frac{t}{t_g} = \frac{\ln C_x - \ln C_{x0}}{\ln 2} \quad (3.10)$$

amelyet átrendezve

$$\frac{\ln C_x - \ln C_{x0}}{t} = \frac{\ln 2}{t_g} \quad (3.11)$$

$C_{x0}$ ,  $C_x$  és t kísérleti úton megállapíthatóak így az adott tenyésztetre jellemző, generációs idő és specifikus növekedési ráta könnyedén számítható.

Ahogy az előbb említettük a növekedés az exponenciális szakaszban a leggyorsabb (és a legegységesebb). Ebben a szakaszban a növekedés sebessége a konstans maximális,  $\mu_{max}$ . Az exponenciális fázis kezdetében a sejtkoncentráció  $C_{x0(exp)}$ . Ekkor a sejtkoncentráció az exponenciális fázis tetszőleges t időpontjára így adható meg:

$$C_x = C_{x0} \times \exp(\mu_{max} \times t) \quad (3.12)$$

Természetesen, ahogyan a tenyésztés folyamán a sejtek nőnek és új sejtek képződnek, a környezetükből egyre több anyagot vesznek föl és hasznosítanak. Azokat a táptalajkomponenseket, melyeket a mikroorganizmusok képesek hasznosítani, szubsztrátoknak nevezzük. Amennyiben minden más paraméter optimális tartományban van a növekedés csupán az elérhető szubsztrát mennyiségétől függ. Azt a táptalajkomponenst mely mennyisége a fermentációban az optimális érték alatt van, limitáló szubsztrátoknak nevezzük. Ennek matematikai leírása is lehetséges, mégpedig az enzimkinetikából ismert Michalis – Menten összefüggéshez hasonlóan.

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{[S]}{K_s + [S]} \right) \quad (3.13)$$

A limitáló szubsztrátra értelmezett összefüggés mellett egy újabb fermentáció folyamatot jellemző egyenletet tudunk levezetni a szubsztrátok fogyásából. Ez pedig a Monod által bevezetett hozam fogalma, melyet eredő hozamnak nevezünk, ha azt az egységnyi mennyiségű (felhasznált) szubsztrátból keletkező sejtmennyiségére vonatkoztatva értelmezzük:

$$Y_{X/S} = \frac{c_x - c_{x0}}{c_{S0} - c_S} \quad (3.14)$$

$Y_{S/X}$ , vagy  $Y_{Si/X}$ , hiszen ez a táptalaj bármely ( $i$ ) komponensére értelmezhető mennyiség, melyet értelmezhetünk differenciálisan is, ekkor

$$Y_{X/Si} = \frac{dX_i}{dS_i} \quad (3.15)$$

Monod szerint az eredő hozam egy konstans, ám a későbbiekben rájöttek, hogy ez nem egy állandó érték, valójában több tényező által befolyásolt értéke egy adott folyamatnak.

### **Az *Aspergillus niger* általános jellemzése és a citromsav akkumulációjának bemutatása**

Az *Ascomycetes*-ek osztályán belül számos olyan csoportot találunk, melyek tagjai alkalmasak szerves savak túltermelésére. Az *Ascomycetes*ek osztályán belül, kiváló példaként hozhatóak fel, az *Aspergillus* nemzetség tagjai ezen állítás alátámasztására. Az ebbe a nemzetségbe található törzsek jellemzően jól tolerálják - a néha már extrémén - alacsony pH-t, képesek pH 3,0 alatt is növekedést mutatni, ahol más törzsek már életképtelenek. Ez szelekciós előnyt biztosít számukra.

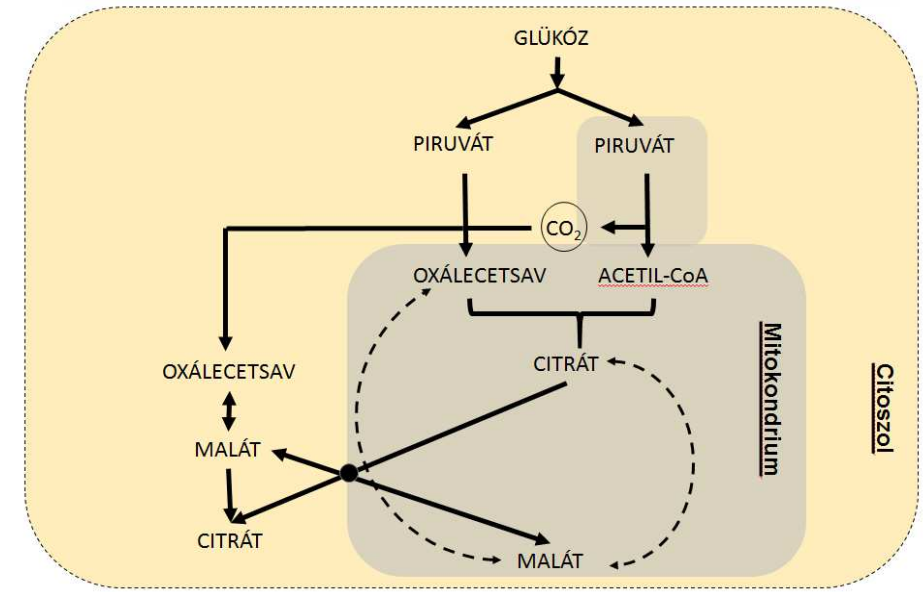
Az *Aspergillus niger* ATCC 1015 (American Type Culture Collection) jelű törzs, egy vad típusú többek között citromsav és glükonsav akkumulációjára képes törzs.

A citromsav az egyik legnagyobb mennyiségben termel fermentációs ipari termék. Jellemzően az *Aspergillus niger* törzseit alkalmazzák, mint termelő organizmus (de a *Yarrowia lipolytica* is a jelentős élesztő túltermelő törzsek közé tartozik). Mára már, évente több mint 2 millió tonna megtermelt citromsav több mint 60%-át az élelmiszeripar használja föl, ám más iparágak is előszeretettel alkalmazzák, hiszen biológiailag lebontható így környezetbarát.

A citromsav keletkezésének egyik kulcsfontosságú útvonala a glikolízis, mely az első reakció utat jelenti a sorban. A glikolízis végén 2 mol piruvát keletkezik, a kiindulási 1 mol glükózból. A 2 mol piruvát molekulából létrejön 1 Acetil-KoenzimA (Acetil-CoA) és egy oxálcetsav molekula, ugyanígy citromsav akkumulációját egy specifikus enzim által katalizált reakció lépés teszi lehetővé, melyet felfedezőikről elnevezve Cleland-Johnson reakciónak neveztek el. Ebben a lépésben a piruvát --> Acetil-CoA átalakulás során

felszabaduló széndioxidot (CO<sub>2</sub>) egy enzim, a piruvát-karboxiláz (mely *A. niger*-ben a citoszolban is megtalálható – bár jellemzően, más eukarióta törzsekben csak a mitokondriumban megfigyelhető) a másik piruvát molekulán megköti, így kialakul egy oxálecetsav molekula. Az acetil-CoA és az oxálecetsav pedig a citromsav építőkövei. Ha ez a reakcióút nem létezne, a glükóz széntartalmának egyharmada kárba veszne, vagyis nem lenne lehetséges a 90% feletti hozamok elérése.

*Aspergillus niger* – a citromsav keletkezésének lépései a mitokondriumban és a citoszolban



*Az Aspergillus niger citromsavtermelése.*

Egy olyan fermentációhoz, melyben magas hozammal tudjuk termeltetni a citromsavat, számos paramétert figyelembe véve kell megteremtünk a megfelelő fermentációs környezetet.

Ezek a paraméterek:

- Magas kezdeti cukorkoncentráció
- Gyorsan hasznosuló cukor alkalmazása
- A táptalajnak foszfát és nitrogénlimitáltnak kell lennie
- Kezdeti alacsony pH érték
- A vas és a cink szuboptimális mennyiségben kell, hogy jelen legyen a reakció folyamán
- A kiindulási magas spóraszám (rázatott lombikok esetében). Ennek meg kell haladnia a  $5 \times 10^6$  db spóra/ml-es értéket.
- $Mn^{2+}$  limitált környezet ( $< 5 \mu g/L$ ), mely elengedhetetlen a citromsav túltermeltetéséhez.

Az *Aspergillus niger* növekedésének és citromsavtermelésének vizsgálata mangán limitált és többlet mangán tartalom esetében.

A gyakorlat célja az *Aspergillus niger* ATCC 1015 törzs növekedésének és citromsavtermelésének jellemzése mangán limitált és többlet mangán tartalommal bíró környezetben.

A táptalajkészítés során alkalmazott víz és cukor oldat mangántartalmának csökkentésére kationcserélő-gyantát alkalmazunk, melyet oszlopba töltve használunk. A gyantát az oszlopba töltés után 1M-os HCl-al regeneráljuk.

Víz mangánmentesítése: kationcserélő-gyanta regenerálást követően vizet töltünk az oszlopba, majd hagyjuk lecsöpögni az oszlopon a vizet, mely már mangánmentesnek tekinthető. A táptalajkomponenseket ebben az ioncserélt vízben oldjuk a továbbiakban.

Glükóz előkészítése: Elkészítünk 500 ml 50 vegyes százalékos glükóz oldatot (50 w/v%). Az oldatot az ioncserélő oszlopra visszük, melynek az első 100 ml-ét nem használjuk.

A gyakorlat során rázatott lombikos fermentációkban fogjuk a kísérletet megvalósítani. A lombikok felében a mangán tartalmat 5 µg/L (vagyis 5 ppb) alatt tartjuk, míg a többi lombikban 100 µg/L-es (100 ppb) koncentrációban lesz jelen a fém komponens. A Mn<sup>2+</sup> ion limitált környezetben a növekedés lassabb lesz és a 48 – 72 órás időpontok között elkezdődik a citromsav akkumulációja a fermentlében. A másik esetben a növekedés gyorsabb lesz, ám citromsav nem lesz jelen mérhető koncentrációban a fermentlében.

## 1. Táptalaj készítése

Táptalaj összetételét az 1. táblázat mutatja

<b>Komponens</b>	<b>Koncentráció</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5 g /L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15 g/L
NaCl	0,15 g/L
MgSO <sub>4</sub>	1,1 g/L
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O törzsoldat	1 ml/100ml táptalaj
ZnSO <sub>4</sub> törzsoldat	1 ml/100ml táptalaj
MnNO <sub>3</sub> törzsoldat *	1 ml/100ml
pH	5,0
Glükóz	150 g/L

\*A MnNO<sub>3</sub> törzsoldatot csak abban az oldatban alkalmazzuk ahol nem limitált a környezet Mn<sup>2+</sup>-ra nézve, ennek koncentrációja (10 mg/L vagyis 10 ppm = 10 000ppb).

A táptalajkomponenseket a megadott sorrendben nagy tisztaságú ioncserélt vízbe mérjük (kivéve a glükózt és a  $\text{MnNO}_3$ -ot) úgy, hogy a tápoldat végtérfogata 200 ml, a koncentrációja a bemért komponensekre nézve kétszeres legyen az eredeti koncentrációkhoz képest. A pH beállítása, ezután 3M-os NaOH-val történik 5,0-ás értékre. A tápoldat 50 – 50 milliliterét ezután négy darab Erlenmeyer lombikba mérjük, mérőhenger segítségével. Az Erlenmeyer lombikok – előzetesen - 100 ml, 0,1 M-os HCl-al 24 órán keresztül rázattuk, hogy minimalizáljuk a lehetséges  $\text{Mn}^{2+}$  ionokkal való szennyeződést az üveg felületéről.

## 2. Sterilezés

A tápoldatok kimérése után, a lombikokat lombiksapkával lefedjük és gumigyűrűvel rögzítjük azt, végül alufóliával lefedjük a sapkát. A lombikokat és 100 ml nagy tisztaságú ioncserélt vizet certoklávban 121 °C-on 20 percig sterilezzük, majd a sterilezés után steril fülke alatt hagyjuk megszáradni és szobahőmérsékletre hűlni.

## 3. Spóra szuszpenzió készítése

A lombikok leoltásához spóra szuszpenziót fogunk használni. A spórákat már előzetesen lemostuk a Petri csészéről, spóramosó oldat segítségével. A lombikok kezdeti spóraszám  $10^6$  db spóra/ml kell, legyen, ezért a spóra szuszpenzió koncentrációját meg kell határozni.

A spóraszám meghatározása Bürker-kamra segítségével történik, a spóra szuszpenzió tízszeres hígításából. Majd a kapott koncentrációval számolva megadjuk, hogy hány milliliter jól homogenizált spóraoldattal kell az egyes lombikokat leoltani.

## 4. A lombikok összeállítása

A lombikok sterilezése és az inokuláló spóra szuszpenzió térfogatának megállapítása után steril fülke alatt összemérjük a még hiányzó komponenseket.

## 5. Cukor adagolása

A kísérletben az alkalmazott szénforrás, a gyorsan hasznosuló glükóz. A szilárd állapotú glükózból a gyakorlatot megelőzően 50 W/V %-os oldatot készítettünk, majd kation cserélő gyantán megszabadítottuk a mangántartalmától, végül előre sterilezett üvegedénybe, steril fülke alatt sterilre szűrtük. A steril cukoroldatból 30 ml-t adagolunk minden lombikhoz.

## 6. Kiegészítés steril vízzel

A cukor ráadagolása után, az inokuláló spóraoldat térfogatával számolva steril vizet mérünk a lombikba, végül a spóra szuszpenzióval 100 ml-re egészítjük ki a lombikokat.

## 7. Rázatás paraméterei

A lombikok inokulálása után rázószekrénybe tesszük a tenyészeteket. A rázatás sebessége 250 RPM, hőmérséklete 30 °C.

## 8. Mintavételek

A lombikokból a következő 3 napon 12 óránként veszünk mintát, vágott végű steril 5 ml-es pipetta hegyeket használva. A mintavétel során fokozott figyelmet kell fordítani a mintavétel gyorsaságára és a lombikok állandó rázására, mivel a sejtek rövid időre sem kerülhetnek oxigén limitált állapotba. Az összesen 4 ml levett mintából 2 ml-ből mérünk száraz sejtömeget, 2 ml-ből pedig centrifugálással legalább 500 µl sejtmentes felülúszót nyerünk ki, ebből HPLC-s módszer segítségével fogjuk mérni a glükóz és a citromsav koncentrációját. A száraz sejtömeg méréséhez megfelelő méretűre vágott és előzetesen lemért tömegű szűrőkorongokat használunk, melyeket a mintavétel után 85°C-on 3 órán keresztül szárítunk szárítószekrénybe, majd exikátorban hagyjuk szobahőmérsékletre visszahűlni, majd analitikai mérleg segítségével megmérjük a tömegüket.

Mintavételi táblázat - <5 µg/L-es Mn tartalmú lombikok

A tenyészet kora (óra)	DCW (g/L)	Glükóz (g/L)	Citromsav (g/L)
0			
12			
24			
36			
48			
60			
70			

~100 µg/L-es Mn tartalmú lombikok

A tenyészet kora (óra)	DCW (g/L)	Glükóz (g/L)	Citromsav (g/L)
0			
12			
24			
36			
48			
60			
70			

### **Adatok kiértékelése**

A táblázatok kitöltése után feldolgozzuk a kapott adatsorokat, meghatározzuk az exponenciális növekedési szakasz intervallumát, kiszámítjuk az oda tartozó maximális növekedési sebességet és generációs időt, valamint az eredő hozamot.

Feladat 1.)

Ábrázoljuk közös diagramon a fermentléből mért cukor koncentrációkat és a száraz sejtömeg változásait az idő függvényében. A mangán limitált környezetben a 72. órában vett minta

esetében, már mérhető koncentrációban van jelen a citromsav is, melyet szintén fel kell tüntessünk a diagramon.

Feladat 2.)

A kapott adatokból készítsünk táblázatot. Az első oszlopban szerepeljen a mintavételi idő, a második és harmadik oszlop tartalmazza az az egyes mintavételi időpontokhoz tartozó glükóz, száraz sejttömeg és citromsav koncentrációkat. A negyedik oszlopban fel kell tüntetni a  $dt$  és a  $dx$  értékeket. Ezekből számítható ki a specifikus növekedési ráta ( $\mu$ ) értéke.

Feladat 3.)

Az eredő hozam számítása. Mivel a lombikokból nem fogyott el az első 72 órában a cukor teljes mennyisége, az eredő hozam értékének megadását csak a 72. órás adatokkal fogjuk számolni (a 72 órás mintából származó cukor és száraz sejttömeg koncentrációkból).

Feladat 4.)

Állapítsuk meg az exponenciális fázis időintervallumát, mind a két esetben. A meghatározáshoz alkalmazzuk a szemilogaritmikus ábrázolási módot. Az exponenciális fázis iránytangensének meghatározása után adjuk meg az exponenciális fázisra a  $\mu$  értékét.

Feladat 5.)

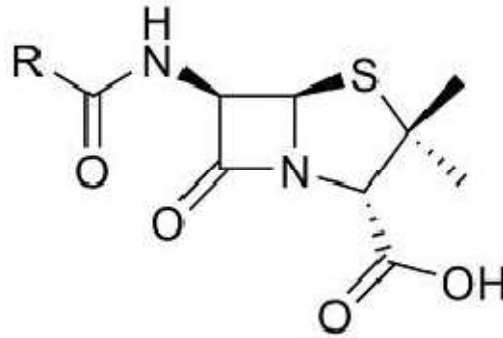
A  $\mu$  értékének megállapítása után megadható a generációs idő.

## 4 Fonals gomba fermentáció gyakorlati leírása

A gyakorlat során *Penicillium chrysogenum* fonals gombát tenyésztünk 8 l térfogatú INEL BR92K laboratóriumi blokkfermentorban. A gyakorlat célja, hogy a hallgatók megismerjék az alapvető fermentációs technikákat, mint pl. az inokulum készítés, sterilizálás, fermentor leoltása inokulummal, mintavétel stb. Cél továbbá a mikroorganizmusok szaporodásának nyomonkövetése szárazanyag meghatározással.

A biotechnológiában járatlanok között is az egyik legismertebb iparilag fontos gombafaj a *P. chrysogenum*, melyet penicillin ipari előállítására használnák még napjainkban is. A *P. chrysogenum* rendszertanilag az eukarióták közé, a gombák királyságába, az *Ascomycota* (tömlősgombák) törzsébe, *Pezizomycotina* altörzsébe, *Eurotiomycetes* osztályába, *Eurotiales* rendjébe, *Trichocomaceae* családjába, azon belül a *Penicillium* nemzetségébe tartozik. A *Penicillium* nemzetség képviselői a világon mindenhol jelen vannak, bizonyos fajai iparilag jelentősek (pl. a tej- és sajtiparban a *P. camamberti*). A *P. chrysogenum* penészgombára szaprofita életmód jellemző, aerob mikroorganizmus. A savas környezetet kedveli, könnyen kiszorítja vetélytársait a környezetéből. Legjelentősebb alkalmazása a *Penicillium chrysogenum* fonals gombának a fermentációs gyógyszeriparban, azon belül is a penicillin béta-laktám típusú antibiotikum előállításában rejlik.

A béta-laktám gyűrűs antibiotikumok aminosav (cisztein, valin, valamint egy alfa-aminoadipinsav nevű vegyület) prekursorokból épülnek fel. Szerkezetüket tekintve penám vázas vegyületek, melyek a baktériumok sejtfalában található peptidoglikán rétegek közötti keresztkötéseket kialakulását akadályozzák meg a transzpeptidáz enzimhez való kötődéssel, így a sejtfalszintézis nem következik be, mely a sejtpusztuláshoz vezet. A sejtfalépítő prekursorok felhalmozódnak, ez által a sejtfal hidrolázok is aktiválódnak, melyek a baktérium peptidoglikán bontását végzik. Más fonals gomba is képes a penicillin termelésére (pl. *Aspergillus nidulans*).



béta-laktám gyűrű szerkezete

A penicillin felfedezése hivatalosan Alexander Fleming nevéhez fűződik, aki 1928-ban figyelt fel az antibiotikum baktericid hatására. Jelentőségét az is mutatja, hogy olykor a penicillin ára az aranyéval vetekedett. Kémiai szintézissel történő előállítás bonyolult, szükségessé vált az egyszerűbb biotechnológiai szintézis. A penicillin fermentációra kezdetekben a tálcás technológia volt jellemző, melyet a II. világháború során is alkalmaztak. 1945 után a penicillingyártás rohamosan fejlődött, a titerek emelkedtek, optimalizálták a technológiát: szubmerz (folyadék kultúrás) fermentáció váltotta fel a fémtálcákat. Maga a penicillintermelés hosszú időszakon keresztül laktóz szénforráson történt, hiszen ez kedvezett a szekunder metabolit képződésnek. Természetesen az idő előrehaladtával, a molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával, törzsfeljesztéssel ez is változott.

Megemlítendő a penicillin magyar vonatkozása, hiszen a debreceni Hajdúsági Gyógyszergyár nagy mennyiségben előállította fermentációs úton. A hazai gyógyszerkészítményt exportálták is, ezáltal kielégítve a „keleti blokk” szükségleteit.

Maga a laktóz felvételéről és hasznosításáról nem állt rendelkezésünkre megfelelő információ a *P. chrysogenum* gomba genetikájával kapcsolatban, ám ezt a Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszék pótolta (Jonás et al., 2014).

A laktóz hasznosításakor első lépés a molekula hidrolízise glükózzá és galaktózzá. Ez végbemehet extra- vagy intracellulárisan. Mindkét esetben a béta-galaktozidáz hasítja fel a kötéseket a molekularészek között, viszont az intracelluláris esetben szükség van egy fehérjére, mely a laktózt a sejten belülré juttatja: ez a laktóz permeáz. Segítségével a sejtbe bejutott tejcukor sejtben belül is hidrolizálható, megkönnyítve az anyagcsere folyamatait. A glükóz a laktóz bontást követően a pentóz-foszfát útvonalba és a glikolízisbe kapcsolódik be. A galaktóz a Leloir útvonalon, glükóz-6-foszfátként hasznosul.

### Gyakorlat menete:

**Feladatok**, napokra lebontva:

1. nap: táptalaj készítés, sterilizálás, inokulum leoltása
2. nap: a fermentor leoltása inokulummal, mintavétel
3. nap: mintavétel
4. nap: mintavétel
5. nap: mintavétel, fermentáció leállítás, fermentor kimosása.

**Táptalaj készítés:** az inokulum táptalaj és a fermentáció táptalaja különbözik egymástól.

*Komplex táptalaj:* Össz. 500 ml komplex táptalajt kell készíteni, a pH-t 7-re állítani. Ezt 5 db 500 ml-s Erlenmeyer-lombikba öntjük (100 ml/lombik).

Az inokulum táptalaj (komplex táptalaj) összetétele:

Anyag	g / 100 ml táptalaj
pepton	0,4
élesztő kivonat	0,4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	0,8
$\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025

A nyomelem oldat összetétele:

Anyag	g / 100 ml
$\text{CaCl}_2$	1
$\text{CoCl}_2$	0,01
$\text{ZnSO}_4$	0,088
$\text{CuSO}_4$	0,0039
$\text{NiSO}_4$	0,001
Na-tetraborát	0,0008
$\text{MnCl}_2$	0,00072
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,00037
$\text{FeSO}_4$	0,001

**Inokulum leoltása és sterilizálása:** a lombikokra papírsapkát teszünk, majd alufóliába csomagoljuk. Az inokulum táptalajt certoklávban sterilizáljuk 121°C-on, 1bar nyomáson, 20 percig. Sterilizálás után nyomelemoldatot adunk hozzá valamint  $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  oldatot

(külön adjuk a táptalajhoz, ellenkező esetben sterilizálás hatására csapadékot képezne a táptalajban). A nyomelemoldat koncentrációja 1 % a lombikban.

A certoklávban az inokulummal egyidőben sterilizálni kell a szükséges eszközöket is. Ezeket szintén alufóliába csomagoljuk, majd certoklávban szárítószekrénybe helyezük a zsugorított üvegszűrőt és a kanalat, amíg meg nem száradnak.

- leoltólombik, ami 500 ml minimál táptalajt tartalmaz
- zsugorított üvegszűrő
- 2 kanál
- 2 üveg desztillált víz

**Inokulum leoltása:** 1 ml spóraoldattal oltunk le 100 ml táptalajt. Rázógépbe tesszük, ahol 28 °C-n, 200 rpm fordulatszámmal 24 órán át rázatjuk. A spórákat a rizsen nőtt tenyészetéről steril spóramosó folyadékkal mossuk le és szűrjük át üveggyapotos szűrőn.

### **A fermentáció:**

**Minimál táptalaj:** a fermentorban minimál táptalajon növekszik a gomba. Ennek a pontos összetétele ismert, különböző sókat, cukrot és nyomelemet tartalmaz.

A minimál táptalaj összetétele:

Anyag	g / 100 ml táptalaj
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	0,8
$\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025

Mivel a gyakorlaton használt fermentor 5 l térfogatú, a fermentorba 5 l minimál táptalajt kell készíteni, pH-t 7-re állítani. A fermentorba 4,5 l táptalajt öntünk, a maradék 500 ml táptalaj a leoltólombikba kerül, amit így sterilizálunk.

**Fermentor sterilizálása:** a fermentorba beleöntjük az 4,5 l minimál táptalajt, majd összeszerelés után autoklávban sterilizáljuk.

Az első nap feladata még szűrőpapírkorongok kivágása, beszámozása, s a tömegük lemérése.

**Fermentor leoltása inokulummal:** a fermentorokat kivesszük az autoklávból, a szükséges szereléseket, beállításokat elvégezzük.

Az inokulum a rázógépből 24 h alatt kellő sejtsűrűséget ér el ahhoz, hogy le lehessen oltani vele a fermentort. Az inokulum átöntését a leoltólombikokba steril körülmények között végezzük, lamináris box alatt. Első lépésként a leoltólombikokban levő minimál táptalajhoz hozzáadjuk a steril nyomelem oldatot,  $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  oldatot és cukoroldatot (50 (w/v)%-os). Az egyik fermentorba D-glükóz, a másikba laktóz kerül C-forrásként (1%-os koncentrációban). Ezután az inokulumot leszűrjük zsugorított üvegszűrőn, mossuk desztillált vízzel, majd a gombafonalakat átkaparjuk a leoltólombikba. A leoltólombik tartalmát a leoltó csonkon át a fermentorba juttatjuk (közben a levegőt el kell zárni!).

A fermentáció elindult. Meg kell győződni a paraméterek beállításának helyességéről (pH 7.0, hőmérséklet 28 °C, kevertetés 350 rpm, beáramló levegő mennyisége 300L/h).

A 0 h-s mintavételt most kell elvégezni, a mintavevő csonkon át. Az első 20 ml holt térfogatnak számít, a második 20 ml a tényleges minta. A szárazanyag meghatározás lényege, hogy a mikrobaszuszpenzió ismert térfogatú mintáját szűrőpapír korongon leszűrjük, a sejttömeget pedig súlyállandóságig szárítjuk, majd lemérjük. Fontos a levett minta térfogatának a pontos ismerete, hiszen szükséges a DCW meghatározásához. A szárítás előbb szobahőmérsékleten, majd szárítószekrényben 85°C-n történik súlyállandóságig. Naponta 2 mintavétel szükséges.

Az utolsó napon leállítjuk a fermentációt, ekkor történik meg az utolsó mintavétel. A fermentort szét kell szerelni és elmosni. A növekedési görbét és a fermentációs paramétereket grafikonon ábrázoljuk az idő függvényében!

## 5 Baktérium fermentáció gyakorlati leírása

A gyakorlat során *Pseudomonas putida* baktérium fajt tenyésztünk 5 l térfogatú INEL BR92K laboratóriumi blokkfermentorban. A gyakorlat célja, hogy a hallgatók megismerjék az alapvető fermentációs technikákat, mint pl. az inokulum készítés, sterilizálás, fermentor leoltása inokulummal, mintavétel stb. Cél továbbá a mikroorganizmusok szaporodásának nyomonkövetése optikai denzitás méréssel. A kapott eredményekből növekedési görbét kell készíteni.

Napjainkban egyre jobban előtérbe kerül a kémiai szennyezők biotechnológiai úton történő eliminációja, lebontása. Ezen technológiák során egy vagy több mikroorganizmust felhasználva, illetve azok anyagcseréjét kihasználva a káros és mérgező anyagokat kevésbé ártalmas és toxikus anyagokká alakítanak át.

Az egyik jelentős mikroba a *Pseudomonas putida* F1 baktérium, mely képes a különböző szénhidrogének lebontására, melyre akár technológiát is lehetne fejleszteni. A *Pseudomonas putida* Gram-negatív, pálcika alakú, talajlakó aerob baktérium, életmódját tekintve szaprotróf. Prokarióta, a baktériumok királyságba, *Proteobacteria* törzsbe, a *Gamma Proteobacteria* osztályán belül a *Pseudomonadaceae* családba, a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozik. Ellentétben más *Pseudomonans* fajokkal (pl. *P. aeruginosa*, *P. syringae*) nem patogén-a vélemények ezzel a ténnyel kapcsolatban megosztottak.

A szakirodalom alapján a *P. putida* F1 az egyik legjobban tanulmányozott, szénhidrogéneket és azok származékait bontó faj; képes ezen vegyületeket oxidálni, szénforrásként felhasználni növekedéséhez. A talajban és a vizekben előforduló monoaromás szénhidrogének (benzol, toluol, etil-benzol, xilolok), ill. a halogénezett szénhidrogének (triklór-etilén/TCE) degradációjában jelentős szerepet játszik.

### **Gyakorlat menete:**

**Feladatok**, napokra lebontva:

1. nap: táptalaj készítés, sterilizálás, inokulum leoltása
2. nap: a fermentor leoltása inokulummal, mintavétel óránként
3. nap: a fermentáció leállítása, fermentor mosása.

## 1. nap:

**Táptalaj készítés:**a *Pseudomonas putida* tenyésztéséhez az ún. BSM (Basalt Salt Medium) táptalajt használjuk.

Az inokulumhoz 2x150 ml táptalajt készítünk, amit 2 db 500 ml-s Erlenmeyer-lombikba öntünk. A fermentációhoz pedig 4,7 l BSM táptalajt kell összemérni. Mivel ez a fermentáció hajlamos a habzásra, az inokulum és a főfermentáció táptalajához is habgátlót (literenként 2 csepp PEG6000-t) kell adagolni sterilizálás előtt.

A BSM táptalaj összetétele:

Anyag	g / l táptalaj
pepton	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,3
KNO <sub>3</sub>	0,8
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,34
Nyomelem oldat	1 ml/l

A nyomelem oldat (pH= 7,2) összetétele:

Anyag	g / l
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	5
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	5
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	5
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	5
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> × 10 H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,1

**Inokulum sterilizése:**A lombikokra papírsapkát teszünk, majd alufóliába csomagoljuk. Az inokulum táptalajt certoklávban sterilizzük 121°C-on, 1bar nyomáson, 20 percig. Sterilizálás után nyomelemoldatot adunk hozzá. (A nyomelem oldatot szűrővel előre sterilizáljuk, koncentrációja a táptalajban 1%).

A certoklávban az inokulummal egyidőben sterilizálni kell a leoltólombikot is.

**Inokulum leoltása:**Kétfajta módszert is alkalmazhatunk: Petri-csészén kinőtt szilárd táptalajú tenyészethez steril táptalajt adunk, majd szélesztő bottal feldörzsöljük a tenyészetet, végül a

szuszpenzióval leoltjuk az inokulomot. A másik lehetőség során oltókacs segítségével szilárd táptalajról telepeket juttatunk a lombikba. Ezt követően rázógépbbe tesszük, ahol 28 °C-n, 200 rpm fordulatszámmal 1 éjszakán át rázatjuk.

**Fermentor sterilizése:** a fermentorba beleöntjük a 4,7 l BSM táptalajt + habgátlót, majd összeszerelés után autoklávban sterilizáljuk.

## **2. nap:**

**Fermentor leoltása inokulummal:** A fermentorokat kivesszük az autoklávból, a szükséges szereléseket, beállításokat elvégezzük.

Az inokulum a rázógépbben egy éjszaka alatt kellő sejtsűrűséget ér el ahhoz, hogy le lehessen oltani vele a fermentort. Az inokulum átöntését a leoltólombikokba steril körülmények között végezzük, lamináris box alatt. A leoltólombikba öntjük az inokulomot, s hozzáadjuk a steril nyomelem oldatot (koncentrációja a táptalajban 1%). A leoltólombik tartalmát a leoltó csonkon át a fermentorba juttatjuk (közben a levegőt el kell zárni!).

A fermentáció elindult. Meg kell győződni a paraméterek beállításának helyességéről (pH 7.0, hőmérséklet 28 °C, kevertetés 300 rpm, beáramló levegő mennyisége 100 L/h).

A 0 h-s mintavételt most kell elvégezni. A fermentor alján található mintavevő csonkon át történik majd a mintavétel. Mivel a baktériumok generációs ideje rövid, (kb. 30 perc) ezért óránként kell mintát venni a növekedés nyomonkövetéséhez. Az optikai denzitás méréshez a kultúrából óránként mintát veszünk. Ennek mérjük az abszorbanciáját 600 nm-en, így jutunk az OD<sub>600</sub> értékekhez. Ha az abszorbancia érték meghaladta az 1.0-t, a mintát úgy kell hígítani, hogy az OD<sub>600</sub> értéke 0 és 1 közé essen (pl. 2x, 5x, 10x-re hígítani).

## **3. nap:**

3. napon leállítjuk a fermentációt. A fermentort szét kell szerelni és elmosni. A növekedési görbét és a fermentációs paramétereket grafikonon ábrázoljuk az idő függvényében!

## 6 Kemosztát elvű fermentáció gyakorlati megvalósítása laboratóriumi léptékben

Batch (szakaszos) fermentációról akkor beszélünk, ha a tápoldatba a leoltást követően már semmilyen más anyag (a levegőn kívül) nem kerül. Ekkor a tenyészet állapota folyamatosan változik, az egyedszám növekedésével változások mennek végbe az egész kultúrában. Monod munkájának köszönhetően lehetővé vált a mikrobák növekedésének matematikai leírása ebben a rendszerben. Monod az alábbi összefüggést írta le:

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{[S]}{K_s + [S]} \right)$$

$\mu$  – specifikus növekedési ráta  $(h^{-1})$

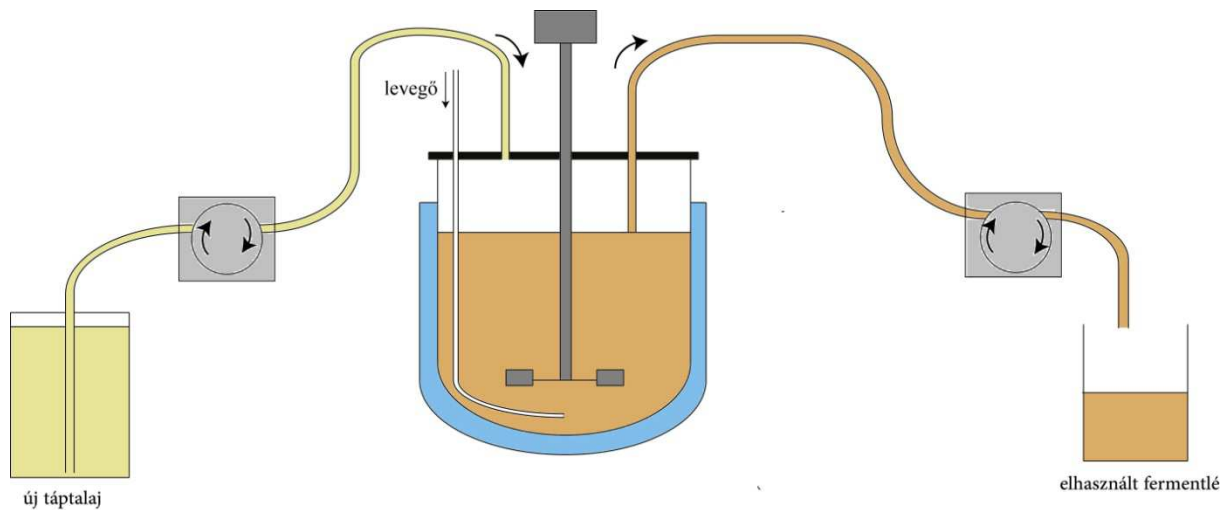
$\mu_{max}$  – specifikus növekedési ráta maximuma  $(h^{-1})$

$[S]$  – szubsztrátum koncentráció

$K_s$  – a maximális növekedési ráta feléhez tartozó egyensúlyi szubsztrátkoncentráció

A növekedés addig tart, míg valamilyen, a növekedéshez szükséges komponens limitáló tényezővé válik. A növekedés szakaszai e tenyésztési módszer alkalmazása során: a lag-, gyorsuló, exponenciális, lassuló növekedés, stacioner, és pusztuló szakaszokra oszthatjuk. A fed-batch (ráadagolásos) fermentációk jellemzője, hogy a limitáló komponens, vagy a termék képződéséhez szükséges komponenseket szakaszosan vagy folytonosan adagoljuk a tenyészethez. Ezzel meghosszabbíthatjuk a növekedési szakaszt, de gátat szab a fermentáció lefolyásának a térfogat növekedés, hiszen ezen tenyésztési rendszerben az elhasznált fermentlé elvétele nem jellemző.

Folytonos fermentációk alkalmazásával tudunk olyan tenyészetet létrehozni, amikor az egyedszám és vele más fontos paraméter is állandó. A folytonos fermentációk egyik típusa a kemosztát, melynek során a következő paraméterek állandóak: pH, tápanyag koncentrációk, sejtkoncentráció. Ezt úgy érjük el, hogy az exponenciális növekedésben lévő tenyészetet „befolytonosítjuk”, ami azt jelenti, hogy megfelelő pumpák segítségével friss tápfolyadékot adagolunk hozzá, de ugyanakkor a beadagolttal azonos mennyiségűt el is veszünk belőle.



A kemosztát matematikai leírásához szükséges bevezetni a hígítási rátát ( $D$  – Dilution rate), ami a kemosztát fermentáció jellemző paramétere.

$$D = \frac{F}{V}$$

ahol,

- $F$  – bemenő tápoldat adagolási sebessége (L/h)
- $V$  – fermentor térfogata (L)
- $D$  – hígítási ráta ( $\text{h}^{-1}$ )

Az egyensúlyi állapot eléréséhez az alábbi paramétereket kell figyelembe vennünk:

$$\frac{F}{V}x_0 - \frac{F}{V}x + \mu x - \alpha x = \frac{dx}{dt} = 0 \text{ (egyensúlyesetén)}$$

ahol,

- $\frac{F}{V}x_0$  - a bemenő sejtek mennyisége (ez steril táptalaj esetén zérus)
- $\frac{F}{V}x$  - fermentorból kivett sejtek mennyisége
- $\mu x$  - biomassza gyarapodás mértéke
- $\alpha x$  - setpusztulás mértéke (optimális esetben zérus)

A fenti két összefüggést felhasználva felírhatjuk az alábbi kapcsolatot:

$$\frac{F}{V}x = \mu x$$

$$\frac{F}{V} = \mu$$

$$\mu = D$$

Kemosztát fermentációknál tehát egyensúly beállása esetén a specifikus növekedési ráta megegyezik a hígítási rátával. Ennek köszönhetően ez az egyetlen fermentációs technológia, mellyel előre beállítható egy tenyészet növekedési rátája, természetesen a mérési hibán belül. A hígítási ráta nem növelhető tetszőlegesen, maximális értéke a tenyészetnek az adott táptalajon elérhető legnagyobb növekedési sebességtől ( $\mu_{\max}$ ) függ. E fölött a sejtek kimosódnak. A kemosztátban a legkisebb hígítási sebességet a mikrobák pusztulásának sebessége határozza meg. Amíg a pusztulás kisebb mint a növekedés, fenntartható az állandó állapot. A kemosztát paramétereit alapvetően a hígítási rátával megválasztjuk, a többi jellemző érték automatikusan beáll.

Folyamatos tenyészetek alkalmazása leginkább a kutatás területén terjedt el. Alkalmos a technológia a gyorsabban növekvő mutánsok izolálására. De előszeretettel alkalmazzák az állandósult állapot meglétét az adott növekedési sebességhez tartozó gének kifejeződésének vizsgálatára. Gyors és lassú növekedés mellett a tenyészet szekunder metabolit termelésnek tanulmányozására is használható. De számos ipari jelentőséggel bíró folytonos tenyésztési eljárást alkalmaznak, melyek a teljesség igénye nélkül a következők lehetnek: biomassza és SCP (single-cell protein) előállítása, primer metabolitok (etanol, tejsav, aceton) előállítása, szennyvíztisztítás. A folytonos fermentációk iparban való elterjedésének gátat szab az eszközök igénybevételenek hosszú ideje valamint nehezen lehet a folytonos fermentációban a fertőzést elkerülni.

### **Gyakorlat menete:**

A gyakorlat során *Pseudomonas putida* szaprotróf talajlakó baktérium tenyészzel végzünk kemosztát elvű fermentációt. A gyakorlat célja az, hogy meghatározzuk az adott táptalajra nézve, különböző hígítási ráta mellett elérhető sejtkoncentrációt. Ennek megvalósításához két, geometriailag azonos fermentort és két különböző hígítási rátát alkalmazunk:  $D=0,2$  és

$D=0,5$ . A fermentor tökéletesen kevert, a benne lévő fermentlé térfogata állandó. Ez az állapot úgy tartható fenn, ha a fermentorba folyamatos tápanyag ráadagolás és elvétel történik, mely pumpák segítségével valósul meg. Ha a ráadagolás és az elvétel sebességét állandó értéken tartjuk, a fermentáció során elérjük az állandósult állapotot, mind a fizikai, kémiai jellemzők és a tenyészet sejtsűrűsége is állandó lesz. A bemenő tápfolyadék steril, tehát a bemenő ágról érkező tápfolyadékból nem kerülhet mikroba a fermentorba. Az elhasznált fermentlevet, mely szubsztrátot és sejteket is tartalmaz, gyűjtőtartályba vezetjük. A fermentoron, mint más fermentációs eljárásoknál is használhatunk szenzorokat (hőmérsékletmérő, pH mérő, DO szenzor, habszenzor), így szabályzás történhet a mért paraméterekre. Az állandósult állapotot a sejtkoncentráció mérésével határozzuk meg.

### 1. Inokulum tenyészet készítése

Az inokulum tenyészet táptalaja, a fermentációs táptalaj és a ráadagolt táptalaj összetételét illetően megegyezik.

LB táptalaj összetétele:

Anyag	g/L
pepton	10
élesztőkivonat	5
NaCl	10

A fermentorok végtérfogata 1,5 L lesz. Az inokulum mennyisége baktérium fermentációk során általában 1%, így egy-egy fermentort 150 ml tenyészettel fogunk leoltani.

- 2 db 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba mérjük össze a 150 ml-nek megfelelő LB táptalaj komponenseit, majd oldjuk fel ioncserélt vízben.
- Certoklávban sterilezzük le a két lombikot 121 °C-on 1,1 bar túlnyomáson 20 percig.
- Sterilizést követően hagyjuk kihűlni a táptalajt lamináris boxban.
- Oltókacs segítségével jutattunk megfelelő mennyiségű baktériumot a Petri-csészén fenntartott *Pseudomonas putida* tenyészetből a kihűlt, lesterilezett lombikba.
- Helyezzük a két lombikot rázószekrénybe, melyeket 30 °C-on 200 rpm-en 24 óráig rázatunk.

## 2. Fermentor összeszerelése, sterilizáció

Kemosztát fermentációra 2 db 2 liter teljes és 1,5 liter hasznos térfogatú laboratóriumi üvegfermentort alkalmazunk, melynek vezérlésére az INEL BR92K típusú blokk folyamatirányító rendszerét használjuk.

- A fermentor összeszerelése és sterilizációja a 2.2. fejezetben leírtak szerint történik. Annyi különbséggel, hogy adagolócsonkra helyezzük a bemenő táptalaj szilikoncsövet és az elhasznált fermentlé kivezetésére egy üvegcsövet és a rá illesztett szilikoncsővel egészítjük ki a fermentor szereléseit.
- Összemérünk 1,5 liter LB táptalajhoz szükséges táptalaj komponenst, melyet 1,4 liter ioncserélt vízben oldunk fel, majd a fermentorba töltjük.
- A megfelelően előkészített fermentort autoklávban sterilizáljuk.

## 3. A perisztaltikus pumpák beállítása

A pontos hígítási ráta eléréséhez szükséges a perisztaltikus pumpák adagolásának beállítása.

1500 ml fermentációs térfogathoz  $D=0,2$  hígítási ráta esetén 300 ml/h adagolási sebességet kell beállítani, míg a  $D=0,5$  hígítási rátához 750 ml/h-t.

- A pumpa adagolását vízzel állítjuk be. (Megtehetjük, hiszen az LB táptalaj reológiai tulajdonságai közel azonosak a vízével.) A perisztaltikus pumpára kössük rá az alkalmazandó gumicsövet, melynek egyik vége egy vízzel telt edényben, másik végét pedig egy mérőhengerbe állítjuk.
- Állítsuk be a pumpa adagolását egy stopper és egy mérőhenger segítségével, hogy a kívánt áramlás alakuljon ki.

## 4. Fermentor leoltása

- A fermentor sterilizációját követően beállítjuk azokat a paramétereket amelyeket a fermentáció alatt tartani szeretnénk:

Fordulatszám: 250 rpm  
Hőmérséklet: 30 °C  
Bemenő levegő: 150 L/min

- Az inokulum tenyésztés leoltását követően 24 órával oltjuk át a tenyésztet a fermentorra egy arra kiképzett, úgynevezett leoltólombikon keresztül. A leoltás

sterilitása érdekében a leoltólombik gumicsövének végét és a leoltócsont is formalinos oldatba mártjuk, majd összeillesztjük a csövek végeit.

- A leoltás ideje alatt a levegőztetést leállítjuk a fermentoron.

## 5. A kemosztát elvű fermentáció végrehajtása

- A leoltást követően óránként mintát veszünk a tenyészetből a mintavevő csonkon keresztül.
- Spektrofotométerrel mérjük az fermentlé denzitását 600 nm-en. Vannak a steril táptalajt használjuk.
- Az óránként levett mintákat mérjük, és amint azt tapasztaljuk, hogy a tenyészet az exponenciális növekedési szakaszban van (a minta abszorbancia értéke 1 óra alatt 0,15-0,2-vel nő), elindítjuk a ráadagolást és az elvételt.
- A friss táptalaj adagolását a perisztaltikus pumpával az előzőleg beállított fordulatszámmal indítjuk. Az elvételt úgy oldjuk meg, hogy a folyadékfelszínhez állítjuk az üvegcső végét, mely egy gumicsővel folytatódik. A gumicsövet egy nagy fordulatszámmal működő perisztaltikus pumpára kötjük, így tudjuk a fermentáció folyadékszintjét állandó értéken tartani. A gumicső végét egy folyadéktároló edénybe vezetjük.
- 2-3 óránként mintát veszünk a kifolyó cső végén, majd spektrofotométerrel mérjük a denzitását.
- Ha 3 egymást követő mintavételből származó mérésből közel egyenlő OD 600 értékeket kapunk, akkor a tenyészet állandósult állapotban van.
- Az állandósult tenyészetből mintát veszünk és Bürker-kamra segítségével határozzuk meg a sejtkoncentrációt.

## 6. Eredmények kiértékelése

- A fermentáció befejezésével töltjük ki a fermentlevet egy nagyméretű mérőhengerbe, és olvassuk le a pontos térfogatot. A pontos térfogat és a bemenő táptalaj mennyiségéből pontosan ki tudjuk számolni, hogy mennyi volt a hígítási ráta a kemosztát fermentáció során.
- Ábrázoljuk az idő függvényében a sejtkoncentráció változását!
- Hasonlítsuk össze a két hígítási rátához tartozó sejtkoncentrációt!
- Mekkora lesz a két különböző hígítási ráta mellett a generációs ideje a tenyészetnek?
- Mekkora a tenyészet növekedési rátája?

## 7 Downstream műveletek

A biotechnológiában az Upstream műveleteket követően kiemelkedő szerepe van a Downstream folyamatoknak, hiszen a céltermékhez sosem lehet közvetlenül hozzájutni, mindenképp szükséges a fermentlé és a sejtek legoptimálisabb módszerekkel történő feldolgozása és megtisztítása. Magának a Downstream processing kifejezésnek nincs magyar megfelelője, leggyakrabban és általánosságban a termékkinyerés elnevezést használjuk. A termékkinyerés a fermentációt követően a céltermék kinyerését, tisztítását és a koncentrációját foglalja magába. Általában a hasznos termék mellett több szennyezőanyag (pl. antigén, toxin, pirogén anyag) is jelen van, mely szintén a Downstream műveletek jelentőségére és szükségességére hívja fel a figyelmet. A biotechnológiai folyamatokban élő rendszerekkel dolgozunk, ezért figyelembe kell vennünk a sejtek és a termék tulajdonságait is az optimális kinyerési módszerek megválasztásánál.

A kinyerés folyamata több részre osztható: az oldhatatlan anyagok elválasztására (pl. sejtömeg és fermentlé szeparálása), a termék kinyerésére és koncentrációjára, a termék tisztítására, valamint a végtisztításra. A feldolgozást több tényező is nehezíti; a fermentációk során a termék általában kisebb mennyiségben és vizes oldatban van jelen az egyéb szennyezők mellett, valamint maga a fermentáció is többfázisos rendszer (szilárd-, folyadék-, gáz fázis), ami szintén nem könnyíti meg a termékkinyerést. Mindenképp figyelembe kell venni: a kinyerési kívánt termékünk tulajdonságait, extracelluláris vagy intracelluláris, esetleg a periplazmatikus térben található-e meg, a fermentációban alkalmazott sejtípus prokarióta vagy eukarióta (élesztő, fonalas gomba, növényi- és állati sejtek) mivoltát. Amennyiben sejtfeltárás szükséges, számításba kell venni az alkalmazni kívánt módszer hatékonyságát, költségeit és alkalmazhatóságát ipari léptékben, stb. Láthatjuk tehát, hogy a termékkinyerés egy rendkívül összetett folyamat, ahol rengeteg tényezőt kell figyelembe venni, ezért külön felkészülést és tervezést igényel a megvalósítása.

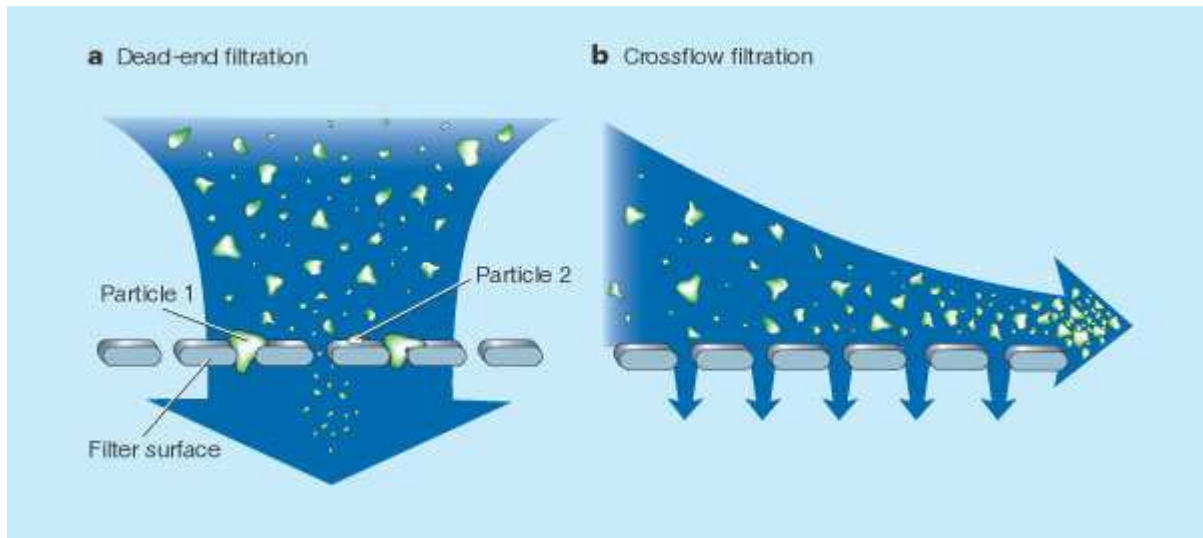
### 7.1 Szűrés

A fermentlevek feldolgozásánál az egyik legjelentősebb folyamat a szilárd- (sejtömeg) és a folyadékfázis (fermentlé) elválasztása. Ez többfajta módszer segítségével is végbemehet: ülepitéssel, centrifugálással, szűréssel. Leggyakrabban a szűrést alkalmazzák az élő sejtek elválasztására a fermentlétől, mivel egyszerű és jól definiálható vegyipari művelet.

A szűrés fogalmát legegyszerűbben a következőképpen fogalmazhatnánk meg, hogy: a folyadék lyukacsos szilárd rétegen történő áramoltatásával, nyomáskülönbség hatására lejátszódó hidrodinamikai művelet, melynek során a szilárd részecskék a réteg pórosainak méretétől függően a szilárd rétegen teljesen vagy részben fennakadnak, esetleg áthaladnak. A szűrés kivitelezésére számos laboratóriumi és ipari léptékű berendezés áll rendelkezésre, így az elválasztás lehet szakaszos és folyamatos. A szűrés iránya alapján megkülönböztethetünk hagyományos (dead end) és keresztáramú vagy tangenciális szűrést.

A hagyományos szűrésnél két fázis keletkezik: a szűrőrétegen átjutott folyadékfázis (szűrlet) és a szűrőfelületen visszamaradt szilárd fázis (szűrőlepény). A szűrőlepény kialakulásának megvan az előnye és a hátránya is. Megfelelő vastagságú szűrőlepényen már a legkisebb részecskék is fennakadnak, viszont a létrejöttével nyomásesést okoz, ami csökkenti a szűrés hatékonyságát. A biológiai rendszereknél az elválasztást gyakran nehezíti, hogy a sejtek vagy a sejttermékek a szűrőfelületen összetapadnak és egy sűrű, ragacsos, nyálkás, átjárhatatlan lepény alakul ki, mely rontja a szűrés hatékonyságát, ezáltal szakaszossá teszi a folyamatot (szükségessé válik a lepény eltávolítása a szűrőfelületről). Megfelelő előkezeléssel -szűrősegédanyag (filter aid) adagolása, pl. diatómaföld, hőkezelés-megakadályozható az átjárhatatlan szűrőlepény kialakulása. A másik lehetőség a szűrőlepény nélküli szűrés, melyre két potenciális berendezést alkalmaznak: vákuum dobszűrőt és keresztáramú tangenciális szűrést. A vákuum dobszűrőnél a dob felületéről folyamatosan kések segítségével eltávolítják a szűrőréteget, ezáltal tiszta szűrőfelületet hoznak létre.

Tangenciális szűrés esetében a szűrőfelülettel párhuzamosan egy turbulens áramlást hoznak létre, mely megakadályozza a szilárd részecskék lerakódását a szűrőfelületre. Ez a megoldás általában együtt jár a betöményített szuszpenzió elvételével, azaz a keresztáramú (cross flow) szűréssel. A keresztáramú szűrésnél két folyadékfázis lép ki a szűrőanyag (membrán) két oldaláról folyamatosan. Az egyik a szűrőn átlépő tisztított folyadék (szűrlet, permeátum), a másik a visszamaradt folyadék, amely értelemszerűen gazdagabb a szűrő által visszatartott anyagokban (koncentrátum, retentátum). A turbulens áramlást többfajta módszerrel tudják létrehozni: keringető szivattyú használatával fenntartott folyamatos áramlás, a szűrőelem forgatásával, vagy kevertetéssel közvetlenül a szűrőfelületnél.



A dead end és a keresztáramú szűrés

(Forrás:ww.nature.com)

A biológiai anyagok elválasztásánál kulcsszerepe van a membránnak, mely egy szelektív átteresztő válaszfal. A membrán biztosítja a szeparáció során a szelektivitást, ugyanis lehetőséget biztosít oldott anyag-oldószer, oldott anyag-oldott anyag, részecske-oldott anyag, részecske-oldószer elválasztásra. Szerves és szervetlen anyagokból is készülhet, ideális esetben az oldószer számára könnyen átjárható, hővel szemben ellenálló, kémiai stabilitását megőrzi, megfelelő mechanikai szilárdsággal bír, olcsó és könnyen tisztítható. A membránokat a pórusátmérővel vagy a cut off (a részecskére vonatkoztatott móltömeg-érték, amelyet a membrán az anyagtranszport során 90 %-ban visszatart) értékkel jellemezhetjük. A membránok pórusai jól definiáltak és monodiszperzek (közel azonos az átmérőjük). A membránszűrés bizonyos eseteiben nagy nyomáskülönbséget kell alkalmazni, pórusok kis átmérője és nagy áramlási ellenállása miatt. A membránműveleteknél több anyagátadást elősegítő folyamatnak van szerepe: transzmembrán nyomásnak (TMP), ozmotikus nyomásnak, koncentráció vagy elektrokémiai gradiensnek és a relatív oldékonyságnak. A transzmembrán nyomás az bemenő oldali nyomás és a permeát oldali nyomás különbsége, melyet az alábbi képlettel számolhatunk ki:

$$TMP = \frac{(P_{be} + P_{ki})}{2} - P_{szűrlet}$$

ahol, a  $P_{be}$  a nyomás a betáplálási ágban,  $P_{ki}$  a nyomás retentát ágban,  $P_{szűrlet}$  a nyomás a permeát oldali ágban.

A membránműveleteket mérettartomány szerint az alábbi módon tudjuk csoportosítani:

- Ionok, kis molekulák kiszűrése: **reverz ozmózis**, elektrodialízis
- Makromolekulák (pl. fehérjék) kiszűrése: **ultraszűrés**. Mérettartomány: 500–100000 Da.  
Pórusméret: 1-1000 nm.
- Lebegő szilárd részecskék (pl. sejt) kiszűrése: **mikroszűrés**. Pórusméret: 0,1-1  $\mu\text{m}$ .

Mikroszűrést gyakran alkalmazzák a sejtömeg és a fermentlé elválasztására. A művelet során szilárd lebegő részecskéket választanak el a folyadékfázistól. A nagyobb szilárd részecskéket (sejt, sejtörmelék) a membrán visszatartja, míg a mikro- és makromolekulákat, valamint az oldott anyagokat átengedi. A mikroszűrésnél alkalmazott pórusméretek 0,1-1  $\mu\text{m}$  közé esnek. Amennyiben a tökéletes szilárd-folyadék elválasztása a cél, szükséges lehet még a koncentrátum centrifugálása is. Mikroszűrésnél a szűrlet fluxusa kisebb, mint a hagyományos szűrőknél, ezért mindenképp szükséges a szűrőfelület növelése („összehajtogatással”), melyre három alapkoncepció alkalmaznak az iparban: a keretes összeállítás, a spirálmembrán modul és a csőmembrán modul. Élelmiszeriparban gyakran használják a mikroszűrést.

## **Gyakorlat**

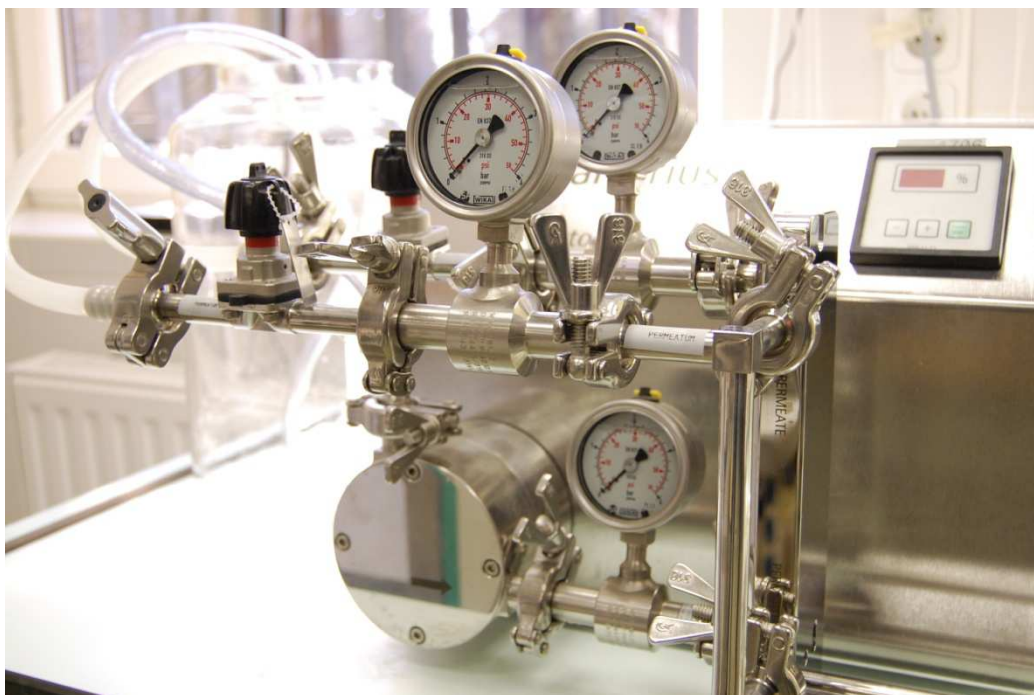
### **A gyakorlat célja:**

Keresztáramú szűrőberendezés működésének megismerése. Tiszta víz fluxus meghatározása. Optimális TMP érték meghatározása fermentlére.

### **Berendezések:**

Fermentor: INEL BR92K laboratóriumi blokkfermentor, 9 l bruttó/7 l nettó térfogatú

Keresztáramú szűrő: Sartorius JABSCO SartoJet, PUREFLO 21 – Diafragma Pumpa



A gyakorlaton használt Sartojet készülék

Membrán: Sartorius típusú Sartocon Slice Casette (membránszűrő kazetta), Hydrosart membrán, 0,45  $\mu\text{m}$  pórusátmérő.

**A membrán jellemzői:**

-Cellulóz membrán, hidrofil, széles pH és hőmérséklet stabilitás. Hidrofil tulajdonságánál fogva a fehérjék, vírusok nem adszorbeálódnak a membránhoz.

-Biotechnológiai és gyógyszeripari használatra kifejlesztett membrán. Alkalmos az alábbi részecskék töményítésére: emlős sejtek, baktériumok, élesztők, sejt lizátumok.

-Pórusméret: 0,2 és 0,45  $\mu\text{m}$  pórusmérettel kapható.

-Kazetta méret: Standard Casette: üzemi méret

Sartocon Slice: kisebb mennyiségű oldatok szűrésére

- $P_{\text{be}}$ : max 4 bar

-Hőmérséklet: max 50 °C

-pH stabilitás: 2-14.



Sartorius Hydrosart mikroszűrő kazetta és kazetta tartó

(Forrás: [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com))

### **Előkészületek a gyakorlathoz:**

A gyakorlaton *Pseudomonas putida F1* sejtenyészetet szűrünk. Ehhez a következő előkészületek szükségesek: nagyobb mennyiségű (6-7 l) fermentlé előállítás. A gyakorlat előtt 2 nappal le kell oltani az inokulumot és sterilizálni kell a fermentort. Az inokulum: 3x150 ml LB táptalajt (pH 7.0) plate-ről kacsál leoltunk *P.putida* sejtekkel, a lombikokat rázógépbe tesszük és overnight rázatjuk (28°C, 200 rpm). A fermentort összeszerelve, 5 l LB táptalajjal (pH 7.0) együtt autoklávban sterilizzük. A gyakorlat előtt 1 nappal az inokulummal leoltjuk a fermentor táptalaját (kevertetés: 200 rpm, hőmérséklet: 28°C, levegőztetés: 100 l/perc). A tenyészetet kb. 12 órán át növesztjük. Másnap ezt a tenyészetet szűrjük.

### **Keresztáramú szűrés nyomásviszonyai:**

A szűrés alatt különösen fontos a helyes nyomás viszonyok megtartása. Úgy kell a pumpát beállítani, hogy a belépő oldalon (feed) a nyomás legalább 0,5 bar legyen. De a legfontosabb arra figyelni, hogy a **membrán két oldalán a nyomáskülönbség** nem lehet nagyobb 0,5 bar-nál. Ennél nagyobb nyomáskülönbség hatására a membrán károsodik!

$$p_{\text{back}} = p_{\text{szűrlet}} - p_{\text{ki}} \leq 0,5 \text{ bar}$$

Hátsó nyomásról (back pressure) akkor beszélünk, ha a permeát (szűrlet) oldali nyomás nagyobb, mint a retentát oldali nyomás. Tehát a permeát oldali nyomás max. 0,5 bar-l lehet nagyobb a retentát oldali nyomásnál.

A szűrés kivitelezésénél a retentát és permeát oldali szelepekkel „játszunk”, azaz manuálisan úgy állítjuk be az áramlási értékeket és a retentát oldali nyomást, hogy a megfelelő nyomás és térfogati viszonyok érvényesüljenek. Általában a permeát oldali szelepet teljesen kinyitjuk, azaz a szűrlet „szabadon távozik”. Így lehet a legkönnyebben biztosítani, hogy ne alakuljon ki túl magas hátsó nyomás. Szokták azt javasolni, hogy a retentát oldali nyomásmérőn legyen a nyomás legalább 1 bar, ilyen módon a teljes kazetta felület szűr.

A gyakorlat napján a fermentációt le kell állítani és a fermentlevet leengedni (kb. 6 liter). Ezután következik a fermentlé szűrése a cross flow szűrőberendezéssel.

### 1. feladat: Tiszta víz fluxus meghatározása

A kezdeti tiszta víz fluxus értéket minden esetben az új kazettára meg kell határozni. Szűrés és tisztítás után mindig újra meg kell mérni. A kazetta áteresztő képessége minden használatnál romlik, soha nem lesz olyan jó, mint „új korában”. A tisztítás utáni víz fluxust összehasonlítva a kiindulási referencia értékkel, megtudhatjuk, milyen hatékony volt a tisztítás. Többszörös használat után az eredeti érték 70-80 %-t lehet visszkapni. Ha kevesebb, a tisztítást meg kell ismételni.

$$\text{Waterpermeability} = \frac{\text{Permeatefluxrate (LMH)}}{\text{TMP}}$$

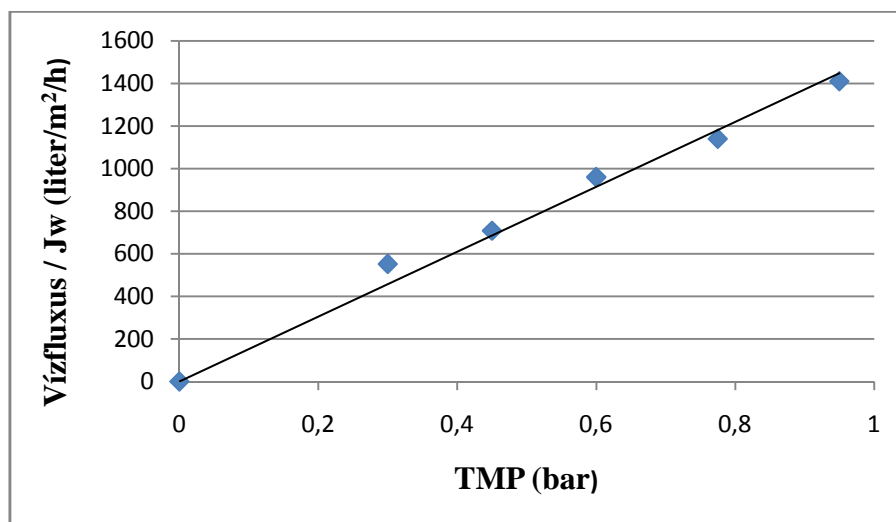
(LMH: liter/m<sup>2</sup>/óra)

Kivitelezés:

Beállítjuk a következő paramétereket: Pumpa sebesség: 10 %. Állandó pumpa fordulatszám mellett kell a nyomást változtatni.

$P_{be}$ (bar)	$P_{ki}$ (bar)	$P_{szűrlet}$ (bar) szelep teljesen nyitva
0,5	0,2	0
0,7	0,5	0
1	0,75	0
1,2	1	0
1,4	1,3	0

A mérést a legkisebb nyomáson kezdjük. Minden egyes nyomás értéknél megmérjük a retentát és permeát oldali áramlási sebességet (mérőhenger, stopper) 1 perc alatt. A kazetta szűrési felülete  $0,1 \text{ m}^2$ . Ábrázoljuk a különböző fluxus értékeket a TMP függvényében.



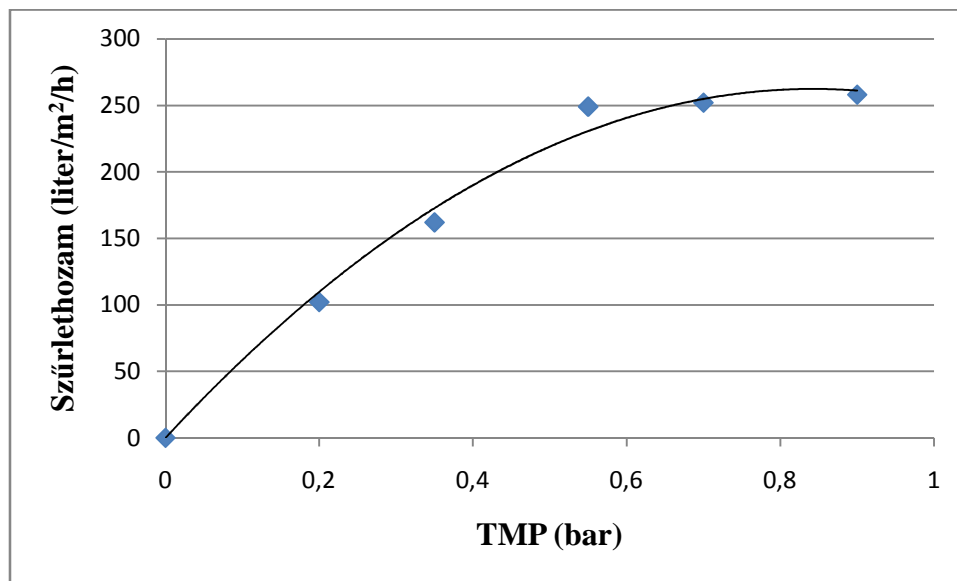
A Hydrosart membrán tisztavíz-áteresztő képességét meghatározó egyenes (példa)

## 2. feladat: TMP görbe felvétele:

Cél: adott fermentlére és membránra meghatározni az optimális TMP értéket

Azonos áramlási sebesség mellett beállítani különböző TMP értékeket, lsd. előző táblázat (a retentát oldali szelep fokozatos zárásával), és mérni a permeát oldali szűrlet mennyiségét időegységre vonatkoztatva. Ezt stopperrel és mérőhengerrel tehetjük meg. Először kis TMP értékeket állítunk be, majd fokozatosan növeljük. Minden egyes új nyomásnál 3-5 percig recirkuláltatni kell a fermentlevet, hogy beálljon az egyensúly. A kísérlet alatt végig teljes recirkuláció legyen, ne töményedjen be a fermentlé!

Ábrázolni kell a fluxust (szűrlet hozamot) a TMP függvényében.



Szűrlethozam és TMP összefüggése egy fermentlére (példa)

### 3. feladat: Fermentlé betöményítése

Az optimális TMP közelében betöményíteni a fermentlevet a kétszeresére. Mennyi idő alatt töményedik be? Hogyan változnak a működési paraméterek a viszkozitás növekedésének hatására?

### 4. feladat: A membrán és készülék tisztítása:

A szűrés végeztével a membránt azonnal egy **tisztítási folyamatnak** kell alávetni, megakadályozandó a membrán eltömődését azáltal, hogy üledék réteg rakódik ki a fermentléből. Az idő előrehaladtával ez a réteg egyre tömörebbé válik és egyre nehezebb lesz eltávolítani. Ilyen módon a membrán hosszabb életű lesz és megtartja kívánt tulajdonságait. A tisztítás lépései:

- 5 perces mosás izotóniás sóoldattal. Kioldja a lebegő száraz anyagokat.
- 10 perces mosás 0,1 M NaOH oldattal
- 10 perces mosás 0,5 M NaOH oldattal. Recirkuláltatás.
- mosás desztillált vízzel, amíg semleges lesz a pH.

Ha a membránt hosszabb ideig nem használjuk szükséges még egy 20 %-s EtOH oldatos mosás is, a befertőződés elkerülésére. Ha pedig hónapokig nincs használatban, szétszerelés után a membránt 20 %-s EtOH oldatban zárható edényben kell tárolni.

### A jegyzőkönyv tartalmazzon:

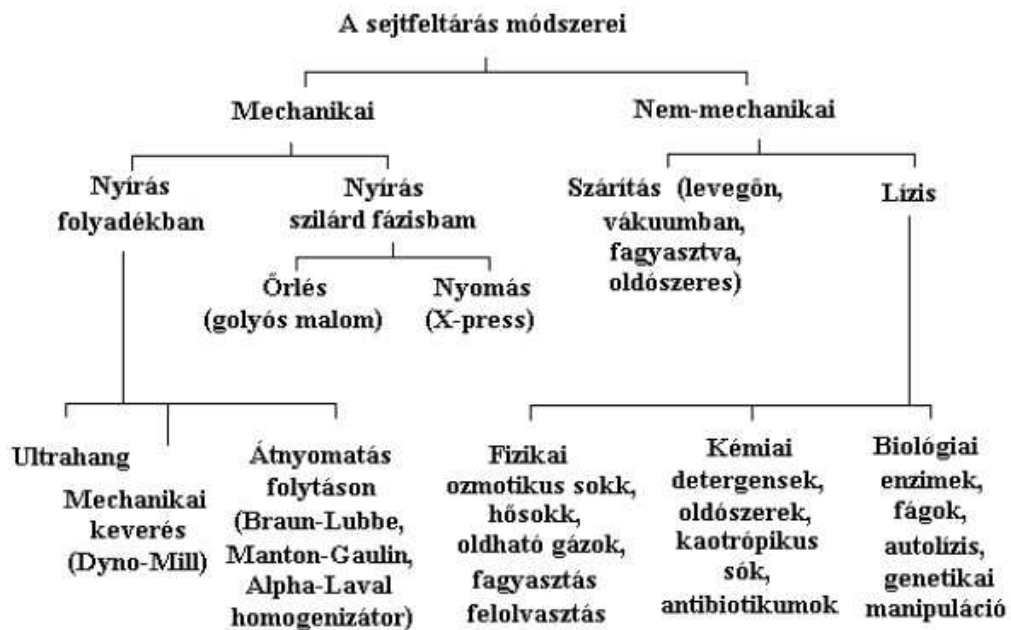
-Rövid elméleti bevezetést a tangenciális- és a mikroszűrésről.

-A gyakorlat leírását.

-Az első két feladatnál táblázatban megadni a különböző nyomás értékeket, a számolt TMP értékeket és diagramon kell ábrázolni a fluxust a TMP függvényében. A 3. feladatnál a tapasztalatok leírása.

## 7.2 Sejtfeltárás

A biotechnológiai fermentációs ipar számos fontos vegyületet, terméket állít elő, melyeket a legkülönbözőbb területeken (pl. orvosi terápia és diagnosztika, vegyipar, élelmiszeripar) használnak fel. Ezekre a termékekre minden esetben koncentrált és tisztított formában van szükség. Extracelluláris céltermék esetében nem szükséges a sejtek elroncsolása. Amennyiben a termék a periplazmatikus vagy az intracelluláris térben található, azt sejtfeltárási módszerek alkalmazásával lehet kinyerni a sejtből. A sejtfeltárás célja a sejt belüli termék szolubilizálása, miközben a termék megőrzi aktivitását és tulajdonságait. A feltárásnak gyorsnak, hatékonynak, lehetőleg teljesnek kell lennie amellet, hogy kellően gyenge a termékkel szemben. Mechanikai, fizikai, kémiai és már biológiai módszerek is rendelkezésre állnak a sejtek feltáráására. Bizonyos módszereket csak laboratóriumban használnak, viszont léteznek olyan készülékek és technológiák, melyeket akár félüzemben és üzemben is alkalmazni lehet.



A sejtfeltárás módszereinek, „családfája”

(Dr. Pécs Miklós: Feldolgozási műveletek-Sejtfeltárás)

A módszer megválasztásánál több tényezőt is figyelembe kell venni. Az egyik elsődleges szempont az alkalmazott sejtek (mikroorganizmusok) típusa; milyen sejtfallal rendelkeznek. Baktériumok esetében lehetnek Gram-pozitív és -negatív sejtek, melyek mechanikailag vagy kémiaailag ellenállóbbak. Az gombák sejtfala esetében nagyfokú diverzitást figyelhetünk meg. Ezek  $\beta$ -glükánt, cellulózt, kitint, fehérjéket tartalmazhatnak, melyek sejtfalat szilárdítják. A növényi sejtek nyomásnak ellenállnak, nyírásra pedig érzékenyebbek. Az állati sejtek nem

rendelkeznek sejtfallal, ebből adódóan sérülékenyek. Figyelembe kell venni továbbá, hogy a kinyerni kívánt termék megőrzi-e stabilitását az adott módszer alkalmazása során, feldolgozott mennyiséget és az elérhető maximális hozamot, azt hogy milyen lehetőségek állnak rendelkezésre a homogenizátum további feldolgozásához, valamint a módszer időigényét, sebességét, reprodukálhatóságát, megbízhatóságát és természetesen a költségeit is. A továbbiakban a laboratóriumi léptékben alkalmazható módszerek bemutatása következik.

### **Mechanikai módszerek:**

A mechanikai módszereket gyakran alkalmazzák nagy mennyiségű sejtömeg feltárására. Általában azoknál a sejteknél hatásos, melyek érzékenyek a nyíróhatásra.

### **Gyöngymalmok, kevertetés üvegyöngyökkel:**

A feltárás során a sejtszuspenziót meghatározott átmérőjű üvegyöngyökkel elegyítve kevertetik („turmixolják”) speciális készülékben. A gyöngyök kevertetés közben folyamatosan koptatják a sejtfalat, amíg az teljesen el nem tűnik. A módszer hátránya, hogy gyors hőmérsékletemelkedéssel jár, ezért szükséges a készülék, a rendszer hűtése. A legmodernebb készülékek folyamatos működésűek, hűtésük pedig biztosított. A feltárás hatékonyságát számos tényező befolyásolja: a készülék geometriája, elrendezése (horizontális vagy vertikális fekvésű) töltöttsége, a keverőelem alakja és elhelyezkedése, valamint sebessége, az üvegyöngyök mérete, hőmérséklet, betáplált szuszpenzió sejtkoncentrációja. A 80-88% körüli töltöttség az ideális a szakirodalom szerint, hiszen a töltöttség mértéke hatással van a feltárás hatékonyságára, valamint a készülék energia felvételére is. Valamint figyelembe kell venni a feldolgozandó sejtszuspenzió tulajdonságait is. A táptalaj összetétele, a sejtek mérete (nagyobb méretű sejtet könnyebb feltárni), a fermentálé reológiai tulajdonsága nagyban befolyásolja a feltárás hatékonyságát.

### **Potter alkalmazása:**

Laboratóriumi léptékben kisebb mennyiségű minták feldolgozása manuális technikával is kivitelezhető. Legegyszerűbb a dörzsmozsárban eldörzsölni a sejteket (pl. folyékony nitrogén alkalmazásával). A másik ismertebb manuális készülék a potter. A potter egy olyan üvegeszköz, melynek egybeilleszkedő részinek felülete érdesített, így a dörzsölés folyamata során hatékony feltárás érhető el. Gyakran alkalmazzák fonalas gombák intracelluláris enzimeinek kinyerésére.

### **French-press, X-press:**

A French-press alkalmazása során a mintát egy hengerbe helyezik állandó magas nyomáson (10,000-50,000 psi) egy fojtáson nyomják át. A fellépő nyíróerő a sejteket szétszakítja, károsítja. A folyamat során több sejtroncsoló tényező is fellép: nyíróerő, nyomáscsökkenés,

melegedés, ütközés. Mivel a feltárás során jelentősen emelkedik a hőmérséklet, mely az enzimek denaturációját okozhatja, szükséges a készülék hűtése (gázokkal, mint pl. N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>). Gyakran alkalmazzák intracelluláris fehérjék, DNS kinyerésére baktériumokból gombákból és növényi sejtekből.

Az X-press látszólag hasonló, mint a French-press, de jelentős eltérés ebben az esetben, hogy fagyasztott sejtszuszpenziót nyomnak át a szűk furaton extrém nagy nyomást (200-600MPa) alkalmazva. Ekkor a jég plasztikusan viselkedik és áthalad a szűk nyíláson. A nyomásváltozás hatására jégkristályok térfogatváltozása (csökkenése, majd növekedése) játszódik le, mely hatásos feltárást eredményez. A módszer nagy előnye, hogy nem szükséges a rendszer hűtése, valamint sejttípustól függetlenül hatékony feltárás érhető el.

### **Ultrahangos kezelés:**

Gyakran alkalmazott eljárás laboratóriumi léptékben. A roncsoló mechanizmust a kavitációs hatás okozza. Az összeroppanó buborékok által keltett lökeshullámok örvényeket hoznak létre, melyeknek a nyírófeszültsége koptatja a sejtfalet. A készülékek általában 15-25 kHz frekvenciák között működnek. Ebben az esetben is szükséges a minta hűtése, hiszen jelentős hőmennyiség keletkezik. Előnye, hogy a feltárás során használt készülék viszonylag egyszerű felépítésű, könnyen kezelhető. A módszer hátránya, hogy finom sejttörmelék keletkezik, mely a további feldolgozást hátráltatja, valamint e módszer bizonyítottan denaturálja az enzimeket.

### **Fizikai módszer-ozmotikus sokk:**

A gyengébb sejtfallal rendelkező mikrobák esetén alkalmazzák. Első lépésben a sejteket nagy ozmózisnyomású oldattal kezelik (pl. 1M glükóz, 1M szorbitol), majd hirtelen meghígítják a mintát (desztillált vízzel). A beáramló víz megnöveli a belső nyomást és ennek következménye, hogy a sejtek egyszerűen „kipukkadnak”. Az ozmotikus sokkot gyakorlatban kombinálják más módszerekkel (kémiai, biológiai) a hatékony feltárás érdekében.

A sejtfeltárás sikerességét számos módszerrel tudjuk nyomonkövetni. Ezekkel a módszerekkel egyrészt a célvegyületünk mennyiségét tudjuk megadni, másrészt a feltárási folyamat hatékonyságát is tudjuk ellenőrizni.

### **Közvetlen mérési módszer:**

Legegyszerűbb módszer a mikroszkóp (pl. Bürker kamra alkalmazása) vagy részecskeszámláló segítségével történő sejtszámlálás. Az élő sejteket differenciál festés segítségével tudjuk beazonosítani.

### **Közvetett módszer:**

Sejtfeltárás hatására a citoplazma eredetű anyagok (fehérjék, enzimek, DNS, stb.) kiszabadulnak sejtéből. A feltárás sikerességét enzimaktivitás mérésekkel, összfehérje mennyiségének meghatározásával ellenőrizhetjük (referenciaként a feltárt mintát használhatjuk).

### **Vezetőképesség mérés:**

Gyors információszerezésre használt módszer. Sejtfeltárás során a sejtéből kiszabaduló anyagok, ionok megváltoztatják a minta vezetőképességét. A mérést több paraméter is befolyásolja: hőmérséklet, elektrolit- és sejtkoncentráció. A készüléket kalibrálni kell mérés előtt, valamint a mérési módszert standardizálni.

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 vezetés:  $\text{mS/cm}$ .

## **Gyakorlat**

### **A gyakorlat célja:**

Különböző típusú sejtfeltárási technikák megismerése, alkalmazása és összehasonlítása baktérium sejt, illetve fonalas gomba micélium feltárására.

Mechanikai módszerek:

-potter

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

Fizikai módszerek:

ozmotikus sokk.

A sejtfeltárás nyomon követése fehérje tartalom, enzimaktivitás és vezetőképesség méréssel.

A megadott kalibrációs egyenesek alapján meghatározni a sejtekből kiszabadult fehérje, ill. enzim mennyiségét  $\text{mg/ml}$  és  $\text{U/mg}$  egységben.

### **Berendezések, módszerek:**

Centrifuga: Sartorius Sigma 2-16K, eppendorf centrifuga

Gyöngymalom: 1. Biospec Bead-Beater ( $100\text{-}500 \text{ ml}$  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: 1 ml minta

A Lowry (-Folin) módszer fehérjék mennyiségének kimutatására használt érzékeny eljárás. A reakció során a peptid kötés nitrogénjének koordinációja valósul meg a  $\text{Cu}^{2+}$  ionnal (színes komplexet képeznek) majd Folin-reagens tirozin általi redukciója következik be (színerősítés).

- 1 ml minta + 1 ml Reagens A → 10 percig áll szobahőmérsékleten
- majd 0,5 ml Reagens B hozzáadása → 30 percig áll szobahőmérsékleten
- 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 Folin-reagens, 5 tf. deszt. víz

$\beta$ -galaktozidáz aktivitás mérés:

500  $\mu\text{l}$  mérendő mintát előinkubálunk vízfürdőben 30 °C-n 5 percig, majd 500  $\mu\text{l}$  szubsztrát oldatot (6 mM o-nitro-fenil-galaktozid) pipetázunk 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 fotométerrel 400 nm-n.

A  $\beta$ -galaktozidáz az orto-nitrofenil-béta-d-glükopiranozid (oNPG) mesterséges szubsztrátumot bontja, a folyamat eredményképpen orto-nitrofenolát keletkezik, mely lúgos pH-n sárga színt ad az oldatnak.

### **Sejtfeltárás a gyakorlaton:**

#### **Baktérium sejtek feltárása ozmotikus sokkal:**

Kimérünk 0.4 g lecentrifugált *P. putida* sejtszuszpenziót 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, majd 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 µl mérendő minta).

#### **Baktérium sejtek feltárása laboratóriumi homogenizátorral:**

Kimérünk 0.5 g lecentrifugált *P. putida* sejtszuszpenziót műanyag centrifuga csőbe és hozzáadunk 5 ml Na-foszfát puffert (pH 7,0). Két eppendorf csövet megtöltünk 1 ml térfogatú üveggyönggyel, majd mindkettőbe 0,75 ml sejtszuszpenziót 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 sejtszuszpenzió felülúszója lesz. A feltárás hatékonyságát összehasonlítjuk a két különböző időpontú kevertetés esetében, illetve összevetjük az ozmotikus sokk hatékonyságával.

#### **Fonális gomba micélium feltárása potterral:**

Ha a *Penicillium chrysogenum*-ot laktóz tartalmú táptalajon növesztjük,  $\beta$ -galaktozidáz enzimet termel, mind extra-, mind intracellulárisan. A szűréssel megszabadulunk az extracelluláris enzimtől, tehát a potterezés után mért enzimaktivitás csak a sejtől kiszabaduló  $\beta$ -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 7,0) mértünk. Ezt az oldatot öntjük a potter készülékbe. Jégen tartva a mintát, 5 percig potterezünk, majd centrifugálunk. A felülúszóból enzimaktivitást mérünk (500 µl mérendő minta). Összehasonlító oldat a leszűrt, pufferben felvett micélium felülúszója.

#### **Fonális gomba micélium feltárása gyöngymalommal:**

100 ml fermentléből szűréssel távolítjuk el a gomba micéliumot. A kapott sejtömeget felvesszük 60 ml Na-foszfát pufferben (pH 7,0). A gyöngymalomba teszünk 120 ml térfogatú üveggyöngyöt. (Az üveggyöngyök átmérője: 500 µm.). Majd beletesszük a sejtszuszpenziót (üveggyöngy : sejtszuszpenzió 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.

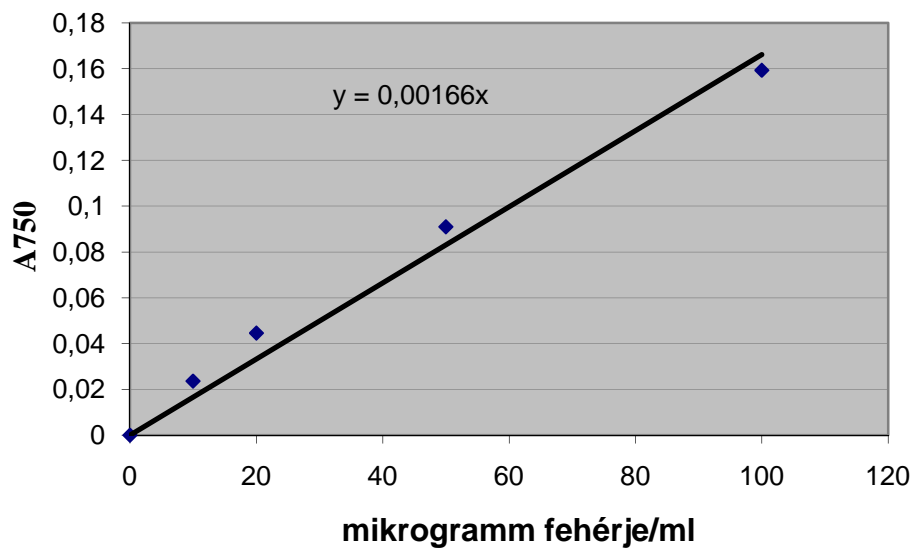
Megmérjük a minta vezetőképességét és enzimaktivitását (100 µl mérendő minta) feltárás előtt és után. Összehasonlító oldat a leszűrt, pufferben felvett micélium felülúszója.

**A jegyzőkönyv tartalmazzon:**

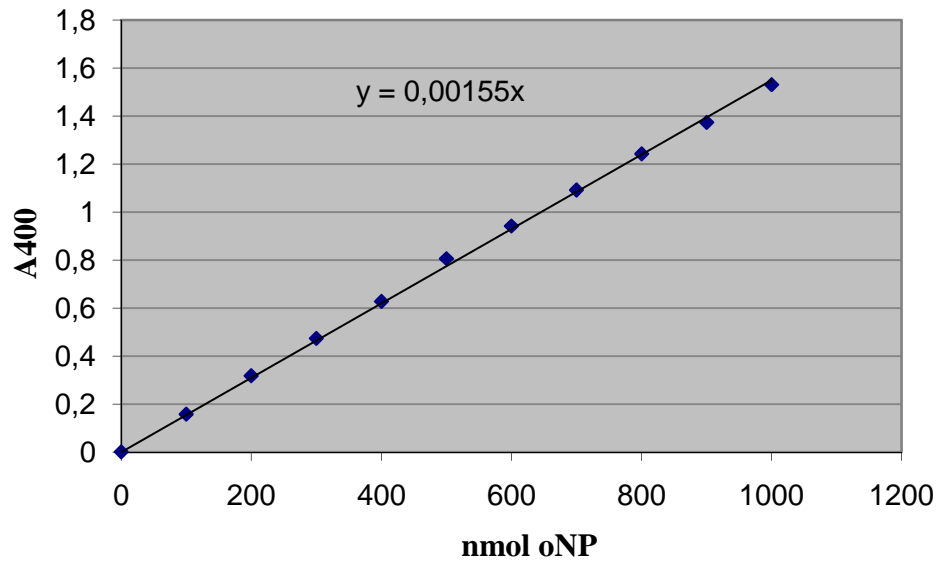
- rövid elméleti bevezetést, az alkalmazott módszerek bemutatásával
- a gyakorlat leírását és a szerzett tapasztalatokat.

**Kalibrációs egyenesek:**

**Fehérje kalibráció Folin reagenssel**



o-nitrofenolát kalibráció beta-galaktozidáz aktivitás méréshez



### 7.3 Béta-glükozidáz enzim tisztítása vizes kétfázisú extrakcióval

A sejtfeltárást követő lépés lehet a termék koncentrációja. Erre az egyik legalkalmasabb módszer az extrakció. A vizes kétfázisú extrakció egy olyan művelet, mely lehetőséget biztosít biomolekulák koncentrálására, leredukálja kinyerési folyamatok lépéseit, ezáltal csökkentve a költségeket. Ez a módszer hatékony és könnyen kivitelezhető folyamatból áll, mely figyelembe veszi a biokompatibilitást.

#### **Az extrakcióról röviden:**

Az extrakció folyamata az egymással nem elegyedő fázisok közötti anyagmegoszláson alapszik. A művelet során a kiindulási anyagból (extrahálható közeg) a célkomponens kinyerése (átvitel, átoldása) történik egy másik fázisba szelektív oldószerrel (extraháló közeg). Ezt a molekulák polaritása teszi lehetővé: a poláros részecskék a poláros oldószerben (pl. víz), míg az apolárosok az apoláros oldószerben (szerves oldószerek) oldódnak jobban. Az extrakciós művelet egyszerűsített alapelve, hogy megfelelő kevertetés közben a fázisok között megtörténik az anyagátvitel, majd a fázisok szétválnak egymástól. A komponens megoszlását a két fázis között a megoszlási hányadossal tudjuk leírni:  $K = \frac{x}{y}$ , ahol x a komponens koncentrációja az extraktumban, y pedig a komponens koncentrációja a raffinátumban.

Az extrakciós műveleteket többfajtképpen lehet csoportosítani, leggyakrabban a fázisok alapján teszik meg.

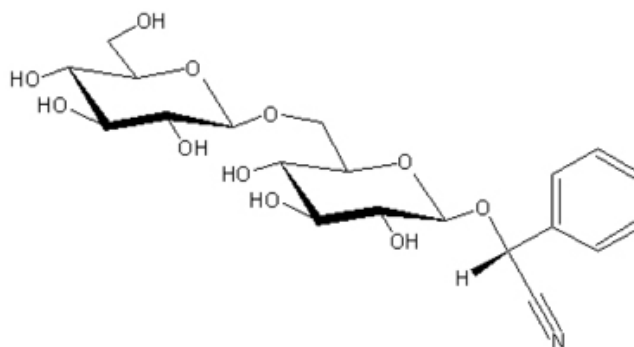
Extrahálható közeg	Extraháló közeg	Extrakciós módszer
szilárd	folyadék	szilárd-folyadék extrakció
szilárd	szuperkritikus folyadék	szuperkritikus extrakció
folyadék	folyadék	folyadék-folyadék extrakció
folyadék	szilárd	szilárdfázisú extrakció
gáz	folyadék	elnyelés
gáz	szilárd	adszorpció

Az extrakciós módszerek csoportosítása fázisok alapján

A fermentlevek feldolgozásánál általában a folyadék-folyadék extrakciót használják. Célszerű továbbá ezt a műveletet alkalmazni, ha a kinyerendő molekula hőérzékeny vagy illékony, desztillációval nem lehet elválasztani, vagy fennáll az azeotróp képződés lehetősége.

A vizes kétfázisú extrakciót gyakran használják fehérjék, nukleinsavak, antitestek és vírusok koncentrálására, tisztítására, kinyerésére fermentléből. Az eljárás alapja az, hogy a rendszerben felhasznált két hidrophil polimer vizes oldatban elválik egymástól, külön fázisokat alkotnak, mivel eltérő lesz a fázisok polaritása és sűrűsége. A fehérjék megoszlását a két fázis között sok paraméter befolyásolja. Pl. a fehérje és a polimerek molekulatömege, a fehérje töltésállapota, a közeg pH-ja, ionerőssége és hőmérséklet. A két hidrophil fázisban a kis molekulák gyakran azonos koncentrációban oszlanak meg. A módszert széles körben alkalmazzák vírusok, nukleinsavak, antitestek és fehérjék koncentrálására. A koncentráló folyamat egyszerű, gyors, olcsó és könnyen méret növelhető így laboratóriumban és iparban is alkalmazható. A két fázis kialakítására leggyakrabban dextrans-PEG illetve PEG-só (pl.  $K_2HPO_4$ ) rendszereket használnak.

Gyakorlaton emulzin  $\beta$ -D-glükózidáz ( $\beta$ -D-glükózid glükohidroláz, EC 3.2.1.21) enzim koncentrációját végezzük vizes kétfázisú extrakció alkalmazásával. Az emulzin  $\beta$ -D-glükózidáz csonthéjas növények magjában található (pl. édes mandula), a glükózidos kötés hasítását végzi. A növények magjában található természetes szubsztrátja az amigdalinnal keletkező prunasin, melyben a glükózidos kötet elhasítva aglikon keletkezik. A létrejött aglikont a  $\beta$ -hidroxinitril-liáz tovább bontja hidrogén-cianidra és bezaldehidre. Az enzimek a növényi szövetekben külön kompartmentekben helyezkednek el, mechanikai sérülés hatására játszódik le a folyamat. A növény tulajdonképpen a növényevők elleni védekezésben használja a felszabaduló HCN-t.



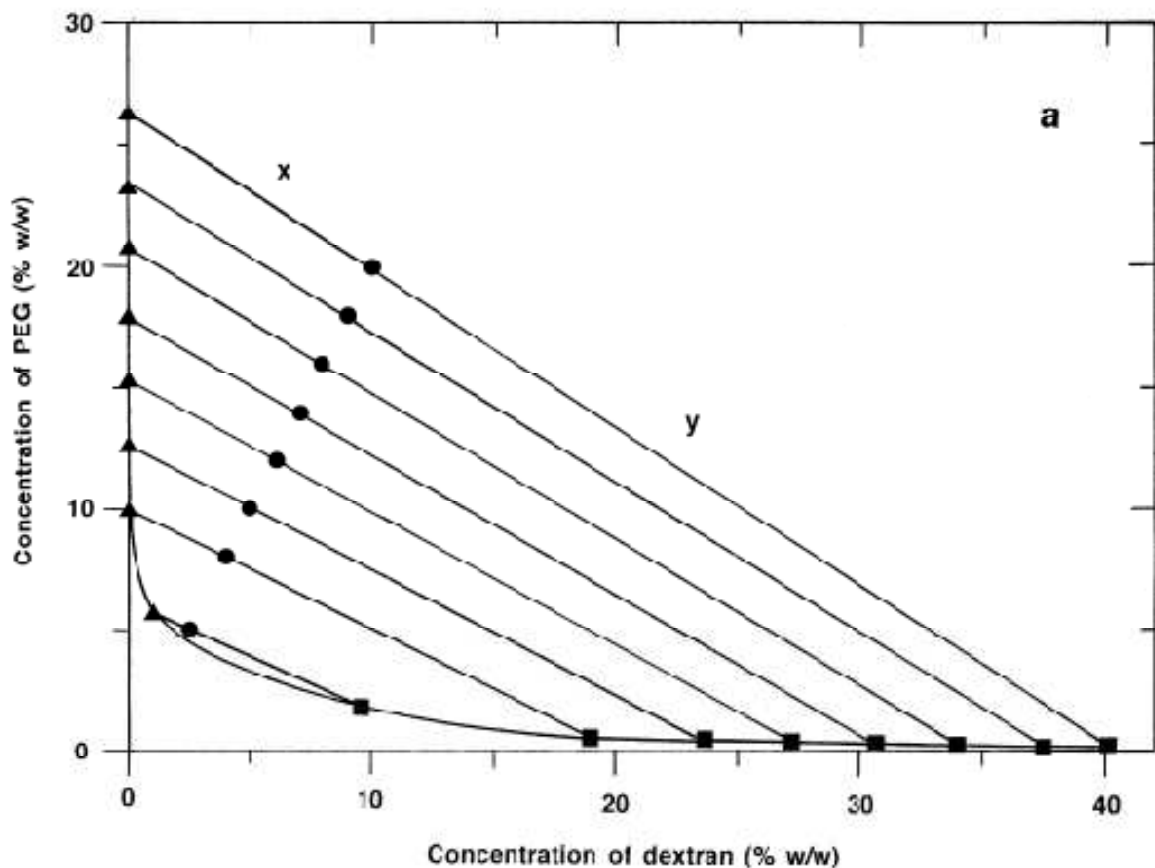
Az amigdalinnal képlete

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

Az enzim széles szubsztrátspecifitással is rendelkezik, képes a laboratóriumokban gyakran alkalmazott *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glükopiranozid (PNP- $\beta$ -Glc) mesterséges szubsztrátban található kötést is hasítani. A reakció során keletkező PNP lúgos közegben sárga színű a fenolát anion miatt. Korábbi vizsgálatok szerint az enzimmél a katalitikus nukleofil csoport egy glutamát-karboxilát, míg a proton donor egy aszpartát karboxil csoportja. A  $\beta$ -glükozidázok általános hasítási mechanizmusában résztvevő két ionizálódó aminosav oldallánc közül az egyiknek deprotonálódnia kell, míg a másiknak protonált állapotban kell maradnia az enzim aktivitásához.<sup>[1]</sup>

### **Gyakorlat:**

Az elvégezendő feladat célja az emulzin  $\beta$ -D-glükozidáz ( $\beta$ -D-glükozid glükohidroláz, EC 3.2.1.21) enzim koncentrációja vizes kétfázisú extrakcióval. A gyakorlaton dextrán-PEG rendszert alkalmazunk az enzim koncentrálására, a felső fázis főként PEG-et tartalmaz, az alsó dextránt. A gyakorlaton alkalmazott rendszert leíró fázisdiagram az alábbi ábrán látható.



PEG 8000-Dextrán 500 rendszer fázisdiagramja

(Johansson G, Reczey K: Concentration and purification of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998 Jun 26;711(1-2):161-72.)

**Felhasznált anyagok:**

- Dextrán 500;
- PEG 8000;
- "E" puffer: 50 mM KSCN, 1 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 8,5;
- Emulzin béta-glükozidáz (6U/mg): 5,54 mg 50 ml pufferben;
- „A” puffer: 0.15 M citromsav-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=5,2 puffer;
- „B” puffer: 0.2 M bórsav-NaOH, pH=10,0 puffer;
- *p*-Nitrofenol (PNP) 10<sup>-4</sup> M oldat;
- Szubsztrát oldat: 5 mM PNP-β-Glc "A" pufferben feloldva

**Felhasznált eszközök:**

- automata pipetták, kémcsövek, centrifugacsövek, kémcsőállvány
- kanál, mérleg, centrifuga (Sigma 2K-16)
- stopper óra, vízfürdő

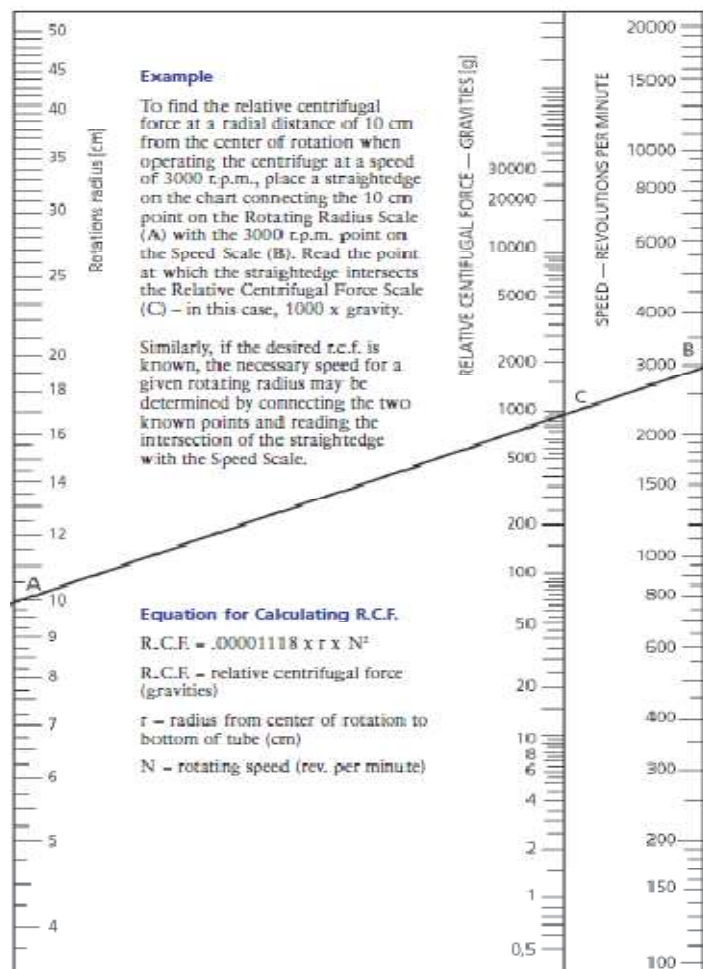
**A gyakorlat lépései:**

1. Mérjünk be centrifugacsőbe 0,15 g Dextrán 500-at (3%)
2. Oldjuk fel a dextránt 5 ml enzim oldattal, óvatos kevergetéssel.
3. Másik centrifugacsőbe mérjünk be 0,8 g PEG 8000-t.
4. Az enzimet tartalmazó dextrán oldatot öntsük át a szilárd PEG-et tartalmazó csőbe, oldjuk fel a PEG-et is (16%)
5. Rázzuk össze az oldatot alaposan, majd centrifugáljuk 1000 g gyorsulással 10 percig. A fordulatszám kiszámításához használjuk a nomográfot és a centrifuga rotor adatait.
6. A centrifugálás után Pasteur pipettával óvatosan szívjuk le a felső fázist egy harmadik centrifugacsőbe.

7. Mérjük meg az enzim oldatok aktivitását, használjunk 20 µl enzim oldatot az aktivitásméréshez a kiindulási enzim oldatból (E0), az alsó fázisból (E 1a) és a felső fázisból (E1f).

8. Extraháljuk a felső fázist újabb alsó fázissal, amit úgy állítunk elő, mint az első extrakciónál (1-6 pont) azzal a különbséggel, hogy az oldást puffer oldattal végezzük. Alapos összerázás után centrifugáljunk az 5. pont szerint.

9. Mérjük a második extrakció alsó (E2a) és felső (E2f) fázisának enzim aktivitását.



Nomográf centrifuga gyorsulások és fordulatszámok átszámításához

**A p-Nitrofenolát kalibrációs egyenes felvétele**<sup>[2]</sup>:

Mérjük össze a táblázatban található mennyiségeket az „A” és „B” puffer elegyéből és a 0.1 mM p-nitrofenolát törzsoldatból.

<b>Mintaszám</b>	<b>0.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>	<b>5.</b>	<b>6.</b>	<b>7.</b>	<b>8.</b>	<b>9.</b>	<b>10.</b>
<b>PNP oldat (mL)</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>	<b>10</b>
<b>A+B (1:2) mL</b>	<b>3</b>	<b>2,9</b>	<b>2,8</b>	<b>2,7</b>	<b>2,6</b>	<b>2,5</b>	<b>2,4</b>	<b>2,3</b>	<b>2,2</b>	<b>2,1</b>	<b>2</b>

Az elkészített oldatokat  $\lambda=400$  nm-nél fotometráljuk, vak oldatként a 0. számú mintát használjuk. A kapott abszorbancia értékeket bemért PNP ionok (nmol-ban) mennyiségének függvényében ábrázoljuk. Az enzimaktivitás mérések során a kapott kalibrációs görbét alkalmazzuk.

**Az extrahált enzimoldatok aktivitásának meghatározása:**

Az enzimaktivitás mérés során feliratozott kémcsövekbe 100  $\mu$ l szubsztároldatot és 880, ill. 860 $\mu$ l „A” puffert mérünk be. Ezt követően 37 °C-os vízfürdőbe helyezzük a kémcsöveket, majd 5 perces előinkubálás után 20, ill. 40  $\mu$ l enzimoldat-részlettel 30 másodperces időtartam elteltével elindítjuk a reakciót. Az 5 perces reakcióidő elteltével 2mL „B” puffer hozzáadásával leállítjuk a reakciót, szintén 30 másodperces különbséggel. Az keletkezett oldatokat 400nm-nél fotometráljuk és megállapítjuk a felszabadult *p*-nitrofenolát mennyiséget. Kiszámítjuk a reakciósebességet nmol/perc egységekben.

	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>	<b>5.</b>
<b>A</b>					
<b>v (nmol/perc)</b>					

**A jegyzőkönyvben megválaszolendő kérdések:**

1. Milyen a fázisarány a gyakorlaton alkalmazott PEG-Dextrán rendszerben?
2. Hogyan tudná megfordítani a fázisarányt?
3. Melyik fázisban dúsul fel a béta-glükozidáz enzim?
4. Van-e szükség további extrakcióra?

5. Az alsó, vagy a felső fázist extrahálná tovább?

[1];[2]: A kísérletek kivitelezésének forrása: Dr. Kandra Lili:Biokémiai gyakorlatok,  
6.javított, bővített kiadás,( DE, Természettudományi Kar, Biokémiai Tanszék) Debrecen,  
2006., 89-90.oldal.

## 7.4 Lizozim enzim kinyerése és tisztítása tojásfehérjéből ioncserélő kromatográfia alkalmazásával

### Röviden az ioncserélő kromatográfiáról:

A kromatográfias eljárásokat gyakran alkalmazzák a biotechnológiai termékek megtisztítására a nehezen eltávolítható molekuláktól, akár végtisztítási lépésként is. A kromatográfias módszerek diffúziós anyagátadási műveletek, melynek során az elválasztandó minta komponensei a rendszer álló- és mozgófázisai között megoszlanak. Alapja, hogy a minta komponensei képesek az állófázissal különböző mértékű és típusú kölcsönhatást kialakítani. Ennek eredményeképpen a mozgófázis áthalad a rendszeren, míg a minta komponensei eltérő ideig tartózkodnak az állófázison, attól függően, milyen erősen kötődtek hozzá; bizonyos molekulák gyorsabban vagy lassabban haladnak át a rendszeren. A kromatográfias folyamat célja szerint megkülönböztethetünk preparatív (az elválasztás fontos) és analitikai (detektálás lényegesebb) kromatográfiát. Mozgófázis halmazállapota szerint is lehet csoportosítani a kromatográfias eljárásokat:

	<b>mozgófázis</b>	<b>állófázis</b>	<b>példa</b>
<b>Gázkromatográfia (GC)</b>	gáz	szilárd szilárd fázison kötött folyadék	Gáz-szilárd kromatográfia (GSC) Gáz-folyadék kromatográfia (GLC)
<b>Folyadékkromatográfia (LC)</b>	folyadék	szilárd folyadék szilárd fázison kötött folyadék	Gélkromatográfia (SEC) Folyadék-folyadék kromatográfia (LLC) Folyadék-szilárd kromatográfia (LSC)
<b>Szuperkritikus folyadékkromatográfia (SFC)</b>	szuperkritikus állapotban lévő CO <sub>2</sub>	szilárd	Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC)

A kromatográfias eljárások csoportosítása

Az ioncserélő kromatográfia során a mintában található töltéssel rendelkező molekulák kölcsönhatásba lépnek az ellenétes töltésű állófázissal, az ellentétes töltések egymásra gyakorolt reverzibilis kölcsönhatása végett. Ezt a kromatográfias eljárást ioncserélők

segítségével valósítják meg. Az ioncserélők olyan szilárd halmazállapotú anyagok, melyek képesek ionokat megkötni a mintából és azonos töltésű, de eltérő minőségű ionokat juttatni vissza. Az ioncserélőket csoportosítani lehet anyagi minőségük szerint: természetes vagy szintetikus; vagy szelektivitás szerint: szelektív vagy nem szelektív ioncserélők. Az ioncserélők ionos csoport jellege alapján megkülönböztetünk kationcserélőt, anioncserélőt és amfoter közeget. A kationcserélő negatív töltésekkel, míg az anioncserélő pozitív töltésekkel rendelkezik, továbbá megkülönböztetünk erős (széles pH tartományban megőrzi töltött állapotát) és gyenge kation-/anioncserélőt. Gyakran alkalmaznak Q Sepharose Fast Flow (erős anioncserélő) és SP Sepharose Fast Flow (erős kationcserélő) állófázisokat, melyek erős ioncserélő csoportokat tartalmazó felülettel rendelkeznek. Ezek a csoportok széles pH tartományom belül képesek megtartani töltésüket, nagy kötési kapacitással rendelkeznek. Q Sepharose Fast Flow (erős anioncserélő) és SP Sepharose Fast Flow (erős kationcserélő) ioncserélő fázisok nagyon népszerűek és széles körben alkalmazzák őket a kutatásban és az ipari termelésben egyaránt. Az ioncserélőről történő elúciót a pH és a só koncentráció (növekvő NaCl gardiens) megváltoztatásával tudjuk elérni. Ezt az teszi lehetővé, hogy mozgó fázis anionjai vagy kationjai helyet cserélnek a minta ionjaival az állófázison, tehát leszorítás történik. A gyakorlaton CM-Trisacryl ioncserélő gélt használunk. Ez egy szintetikus ioncserélő mátrix, amely akril-kopolimer gömbszimmetrikus szemcsékből áll. A polimer karboxi-metil ioncserélő csoporttal rendelkezik, mely megtalálható a polimer gömbök felületén és belsejében is. Mivel szintetikus, ellenáll a mikrobiális és enzimatis degradációnak, ellenáll továbbá savnak és lúgnak is (pH1-11), 2-30°C között megőrzi stabilitását. Kizárási mérete nagyobb, mint 10<sup>7</sup>Da, a legtöbb fehérje elválasztására alkalmas.

Az ioncserélő kromatográfiát töltéssel rendelkező fehérjék kinyerésére is felhasználhatjuk. A fehérje töltése függ az izoelektromos pontjától és a pH-tól. Az izoelektromos pont az pH érték, ahol a fehérje nem rendelkezik töltéssel. Az izoelektromos pont alatti pH-n pozitív, afeletti pH-n negatív töltése van a fehérje molekulának. A fehérje töltése a pH beállítással változtatható.

### **Lizozim:**

A lizozimot 1922-ben Alexander Fleming fedezte fel. Megfázása során vette észre, hogy az orrváladékát a baktériumokat tartalmazó táptalajra csöppentve, feloldotta a mikrobákat. Az antibakteriális enzimet lizozimnak nevezte el. Az enzim a gram-pozitív baktériumok pusztulását idézi elő, azok sejtfalának, a murein réteg roncsolásával; a N-acetil-glükóz-amin és N-acetilmuraminsav közötti glikozidos kötést bontja. A lizozim megtalálható

számos növényi és állati szövetben. Megtalálható könnyben, nyálban, anyatejben és más testváladékban is. A lizozim volt az első enzim, aminek 3D szerkezetét meghatározták. Tyúktöjásból (az összfehérje 8-10%-a) könnyen és olcsón kinyerhető, valamint genetikailag módosított mikrobákkal termeltethető, élelmiszeradalékként is használják. Molekulatömege kicsi ( $M_r=14,6 \times 10^3$  Da), izoelektromos pontja magas ( $pI=11$ ), ezért méretkizárásos és ioncserélő kromatográfiával is könnyen kinyerhető. Megfelelő kationcserélő és só gradiens megválasztásával a többi tojásfehérjétől könnyen megtisztítható; a negatív töltésű fehérjék nem kötődnek az állófázishoz, a pozitív töltésűek-köztük a lizozim is megkötődik az állófázison. Növekvő NaCl koncentrációt alkalmazva a szennyező fehérjéktől megtisztítható.

### **Gyakorlat:**

A gyakorlat során tojásfehérjét kromatografálunk CM-Trisacryl ioncserélő gélt használva. Meghatározzuk az eredeti tojásfehérje oldat, valamint az oszlopról eluált frakciók fehérjetartalmát és lizozim aktivitását. A fehérje koncentrációt biuret reakcióval mérjük, a lizozim aktivitást *Micrococcus lysodeikticus* sejtuszuspenzió zavarosság csökkenésével határozzuk meg.

### **Felhasznált anyagok:**

- oszlop (4 g CM-Trisacryl, 0,05 M TRIS-HCl pufferrel átmosva, pH 8,2)
- tojásfehérje oldat: 1 db tojás fehérjéje 5x-re hígítva TRIS-HCl pufferrel
- puffer: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2
- eluáló puffer: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, amely 0,1M ill. 0,75 M NaCl-t tartalmaz
- sejtuszuspenzió: *Micrococcus lysodeikticus* baktériumsejtek 0,2 g/l szuszpenziója
- puffer lizozim aktivitás méréshez: 0,05 M foszfát puffer, pH 6,3
- fehérje standard oldat: BSA 10 mg/ml
- Biuret reagens

### **Felhasznált eszközök:**

- pipetta, pipettahegyek kémcsövek, kémcsőállvány
- üvegtölcsér, vatta, mérőhenger
- fotométer, küvetta

### **Feladat:**

TRIS-HCl pufferrel 5x-re hígítjuk 1db tojás fehérjéjét, majd az oldatot átszűrjük vattán, üvegtölcsér segítségével. Ez lesz a kiindulási F0 oldat. Az előkészített oszlopok 4 g gélt tartalmaznak, TRIS-HCl pufferrel átmosva. A puffert leengedjük a géloszlop tetejéig, majd a

kupak visszahelyezésével elzárjuk a kifolyó nyílást. Ezt követően 5mL F0 oldatot pipetázunk az oszlopra, óvatosan. Ne keverjük fel a töltetet, körkörösén vigyük fel a mintát az oszlopra. Vigyázzunk, hogy ne fogyjon le a folyadék a töltetről az oldószercserék között sem.

Elkezdjük szedni a 3mL-es frakciókat. Ha az oszlop beszívja a mintát, az eluáló pufferrel (TRIS-HCl) mossuk tovább az oszlopot. Összesen 7 frakciót kell szedni az eluáló puffer cseréje előtt. A 7. frakció után következő, második eluáló pufferrel mossuk tovább az oszlopot, további 5 db 3 ml-es frakciót szedve. A második eluáló puffer 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, amely 0,1 M NaCl-t tartalmaz. Ezzel szennyező fehérjék távoznak az oszlopról. A 12. frakció után ismét puffercsere következik. A harmadik eluáló puffer 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, amely 0,75 M NaCl-t tartalmaz. Szedjük ismét 5 db 3 ml-s frakciót, ezekben fog a lizozim eluálódni az oszlopról.

Lépések: tojásfehérjét 5x-re hígítani 0,05 M TRIS-HCl pufferrel → 5 ml F0 az oszlopra; mosás 0,05 M TRIS-HCl pufferrel (1-7 frakció) → puffercsere: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, + 0,1 M NaCl (8-12 frakció) → puffercsere: 0,05 M TRIS-HCl puffer, pH 8,2, + 0,75 M NaCl (13-17 frakció)

Minidig 3mL-es frakciókat szedünk!

### **Lizozim aktivitás mérése:**

Az enzimaktivitás mérés során *Micrococcus lysodeikticus* baktérium sejtek oldatát használjuk (0,2 g/l, 0,05 M foszfát pufferben, pH 6,3) szubsztrátként. A lizozim csökkenti a baktériumszuspenzió zavarosságát, ugyanis az enzim bontja a baktériumok sejtfalában található mureinréteget. A zavarosság csökkenését fotométerrel követjük nyomon 450nm-en. Az baktérium szuszpenzió zavarosság (A) 0,6-0,8 között van, a lizozim koncentrációt hígítással kell úgy beállítani, hogy az abszorbancia csökkenés kb. 0,1 legyen, 1 perc alatt. Vak oldatként a foszfát puffert használjuk. A küvettába 1mL baktériumszuspenziót pipetázunk és megmérjük az abszorbanciáját. Ezt követően 1 mL enzimoldat-részletet adunk hozzá és követjük az abszorbancia változást 1 percig. A lizozim aktivitását az abszorbancia csökkenésből számítjuk ki;

aktivitás =  $\Delta A_{450}$  x hígítás

1 U az az aktivitás, ami 1 perc alatt 1  $\Delta A_{450}$  változást okoz! Az aktivitás méréshez az F0 oldatot 200x-ra kell hígítani, míg a frakciókat 50x-re. Kivétel a 13-14-es frakciók, melyekben a lizozim töményen eluálódik az oszlopról, ezeket 200 - 400x-ra kell hígítani.

### Fehérjekoncentráció mérése:

A frakciók fehérjetartalmát Biuret reagens segítségével határozzuk meg. A Biuret próbát gyakran alkalmazzák fehérjék kimutatására. A Biuret reagensben található  $\text{Cu}^{2+}$  ionok koordinációs komplexet képeznek a fehérjék peptidkötésével. Lúgos közegben ezt az ibolyás szín kialakulása jelzi.

A gyakorlat során BSA oldat (10mg/mL) felhasználásával kalibrációs görbét készítünk a fehérjekoncentráció meghatározásához. Mérjük össze a táblázatban található oldatokat:

Oldatok (ml)						
Kémcsövek	1	2	3	4	5	6
Fehérje standard	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
TRIS-HCL puffer	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Biuret reagens	4	4	4	4	4	4
Fehérje konc. a mérendő 1 ml mintában (mg/ml)						

30 perc elteltével mérjük meg az abszorbanciájukat 540 nm-en. A vak oldat csak Biuret reagenst és TRIS-HCl puffert tartalmaz. A kapott eredményeket ábrázolva megszerkesztjük a kalibrációs egyenest, majd meghatározzuk az egyes frakciók fehérjetartalmát.

A frakciókból 1-1 mL-t, az F0 oldatból 0,5 mL-t pipetta segítségével kémcsövekbe mérünk, majd 4 mL Biuret reagens adunk hozzájuk és összerázzuk alaposan. 30 perc elteltével 540nm-en mérjük az abszorbanciájukat.

Számítsuk ki a referenciasor alapján a frakciók és a tojásfehérje oldat fehérjetartalmát!

Az eredményeket foglaljuk táblázatba, mely tartalmazza az alábbiakat:

Frakció	Térfogat (ml)	Feh. konc. (mg/ml)	Össz feh. tart. (mg)	Lizozim akt. (U/ml)	Össz lizozim (U)	Spec. akt. (U/mg)
F0						
1						
2						
stb.						

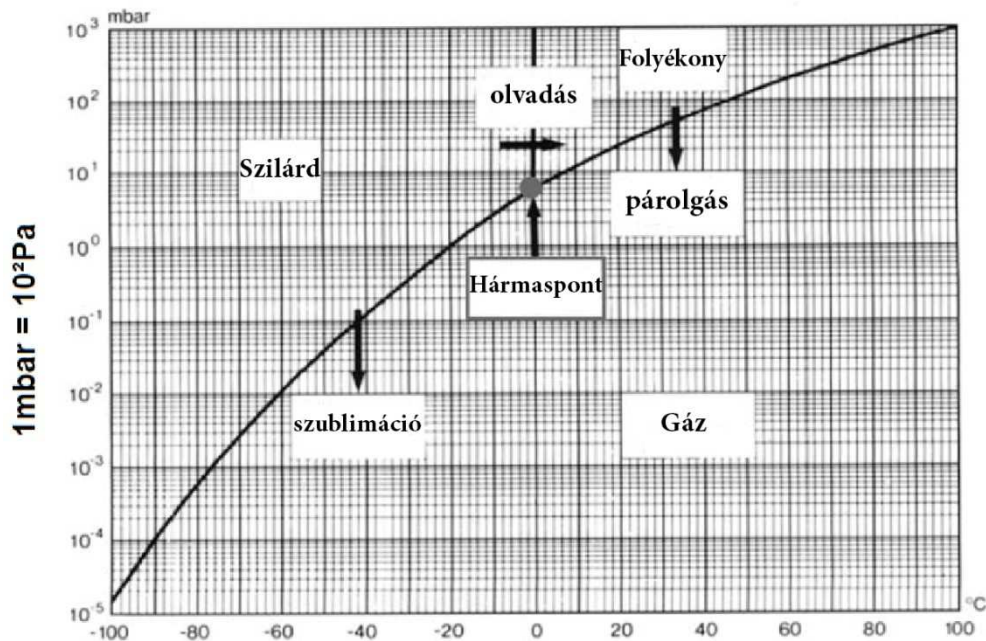
Számítsuk ki, hogy az oszlopra felvitt 5 ml F0 oldat fehérjetartalmának és lizozim aktivitásának hány %-t kaptunk vissza az eluált frakciókban. Hogyan változott a lizozimra vonatkoztatott specifikus aktivitás?

## 7.5 Élesztő tenyészet liofilezése

A fagyasztva szárítás, más néven liofilezés vagy liofilizálás egy víztelenítési eljárás, mely leginkább tartósításra szolgál. A víztelenített anyagokon a mikroorganizmusok nem tudnak elszaporodni (nincs szabad víz, amit felvehetnének) és az enzimek sem működnek, így a liofilezett anyagok vízmentes állapotban akár szobahőmérsékleten is évekig megővhetők a károsodástól, bomlástól. Emellett a liofilezés sokkal kevésbé károsítja a tartósított anyagokat, mint más, magasabb hőmérsékleten végzett vízelvonó módszerek. A fagyasztva szárítás általában nem jár a szárított anyag megkeményedésével vagy zsugorodásával. Az íz- és illatanyagok is változatlanul megmaradnak, ezért használják a módszert előszeretettel élelmiszerek tartósítására is. A liofilezett termékek gyorsan és könnyen rehidratálhatóak, mert a liofilezés során mikroszkopikus pórusok keletkeznek. Ez különösen fontos a gyógyszeripari alkalmazásokkor. Fagyasztva szárítást elterjedten alkalmazzák mikroorganizmusok hosszú távú fenntartásához, tárolásához, törzsgyűjtemények készítéséhez. Az ilyen módon fenntartott mikroorganizmusok akár több évtizedig megőrzik életképességüket.

A liofilezés során a vizes oldatot fagyasztjuk, majd vákuumot hozunk létre a rendszerben. Ha a vákuum megfelelően nagy, a vízmolekulák közvetlenül a szilárd fázisból a gáz fázisba szublimálnak, kiszakadnak a jégkristályból. Arról, hogy az adott hőmérséklethez milyen legyen az alkalmazott vákuum nagysága a víz fázisdiagramja ad információt.

## A víz fázisdiagramja



Például, ha a minta hőmérsékletét  $-20\text{ °C}$ -ra állítjuk, akkor ahhoz, hogy a vízmolekulák szublimáljanak legalább  $1,03\text{ mbar}$  ( $103\text{ Pa}$ ), vagy ettől alacsonyabb vákuumot kell alkalmaznunk. Az egyes hőmérséklethez minimálisan alkalmazandó nyomásokat az alábbi táblázat tartalmazza.

°C	≥mbar	°C	≥mbar	°C	≥mbar	°C	≥mbar
0	6,11	-20	1,03	-40	0,12	-60	0,011
-1	5,62	-21	0,94	-41	0,11	-61	0,009
-2	5,17	-22	0,85	-42	0,1	-62	0,008
-3	4,76	-23	0,77	-43	0,09	-63	0,007
-4	4,37	-24	0,7	-44	0,08	-64	0,006
-5	4,02	-25	0,63	-45	0,07	-65	0,0054
-6	3,69	-26	0,57	-46	0,06	-66	0,0047
-7	3,38	-27	0,52	-47	0,055	-67	0,0041
-8	3,01	-28	0,47	-48	0,05	-68	0,0035
-9	2,84	-29	0,42	-49	0,045	-69	0,003
-10	2,56	-30	0,37	-50	0,04	-70	0,0026
-11	2,38	-31	0,34	-51	0,035	-71	0,0023

-12	2,17	-32	0,31	-52	0,03	-72	0,0019
-13	1,98	-33	0,28	-53	0,025	-73	0,0017
-14	1,81	-34	0,25	-54	0,024	-74	0,0014
-15	1,65	-35	0,22	-55	0,021	-75	0,0012
-16	1,51	-36	0,2	-56	0,018	-76	0,001
-17	1,37	-37	0,18	-57	0,016	-77	
-18	1,25	-38	0,16	-58	0,014	-78	
-19	1,14	-39	0,14	-59	0,012	-79	

### **A fagyasztva szárítás lépései:**

Előkezelés:

A fagyasztás előtti kezeléseket jelenti, amelyek a következők lehetnek a terméktől függően: koncentráció, stabilitásnövelő anyagok hozzáadása, fajlagos felületnövelő anyagok, krioprotektáns oldatok adagolása. A liofilizálással tartósított tenyészetek szuszpenzióját olyan, vízben jól oldódó úgynevezett krioprotektív anyagokkal való kiegészítés, melyek az alkalmazott eljárás alkalmával védő hatást biztosítanak a fagyasztáskor és felengedéskor az élő szervezetek számára. Ezek az anyagok jellemzően polihidroxi vegyületek, mint például cukrok, polialkoholok és származékai. A sejteknek a krioprotektív anyaggal való összekeverése és a hűtési folyamat megkezdése között kiegyensúlyozódási időt kell hagyni, mely általában minimum 15 perc, de 40-50 perctől nem lehet több. Ez utóbbi esetén a krioprotektív anyag már toxikus hatást fejthet ki.

Fagyasztás:

Ennek a lépésnek a célja, hogy az anyag a víz hármaspont alatti hőmérsékletére legyen lehűtve. A minta gyors fagyasztása előnyös a mikroorganizmusok sejtsztruktúrájának megőrzése érdekében. A gyors fagyasztás során apró jégkristályok képződnek, melyek kevésbé roncsolják a sejteket, szemben a lassú fagyasztáskor képződő nagyméretű jégkristályokkal. Erre alkalmas megoldás lehet a folyékony nitrogénbe, száraz jégbe vagy legalább -60 °C, -80 °C-os fagyasztóba való behelyezés.

Elsődleges szárítás:

Az elsődleges szárítás során a nyomás fokozatosan lecsökken néhány mbar-ra, így a szublimáció megkezdődik. A szárítás idejét úgy kell megválasztani, hogy körülbelül a 95%-a víznek elszublimáljon az anyagból.

### Másodlagos szárítás:

A másodlagos szárítás célja, hogy a meg nem fagyott vízmolekulák is elszublimáljanak. Ebben a szakaszban a hőmérsékletet az elsődleges szárítás során alkalmazottnál magasabb értékre kell emelni, akár 0 °C-ra is, ahhoz hogy megtörjük a fizikai-kémiai kapcsolat a vízmolekula és a szárított anyag között. A nyomást alacsonyabb, pár µbar értékre kell állítani. A fagyasztva szárítást követően az anyag víztartalma nagyon alacsony, 1-4 % körüli érték.

### Gyakorlat menete:

Az élesztő sejtek törzsfenntartására jól alkalmazható eljárás a liofilezés. A gyakorlaton végrehajtandó feladat első lépéseként a *Saccharomyces bayanus* élesztőtörzset fel kell szaporítani folyékony közegben. A tenyészet egy meghatározott mennyiségét krioprotektáns oldattal előkezeljük és ALPHA 2-4 LSC típusú liofilizáló készülék segítségével hajtjuk végre a fagyasztva szárítást. A liofilezést követően megvizsgáljuk a minták életképességét, melyet decimális hígítási sor készítését követően szilárd táptalajra való szélesztéssel ellenőrizzük.

### Sejttenyészet készítése:

100 ml YM táptalaj készítése egy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban. A táptalaj összetétele: élesztőkivonat 3 g/L, malátakivonat 3 g/L, pepton 5 g/L, dextróz 10 g/L. A táptalaj sterilizálása után oltjuk le steril körülmények között egy kacsnyi *Saccharomyces bayanus* élesztőt. Kb 20-24 óra alatt a tenyészet elszaporodik 28 °C-on 200 rpm rázatás mellett.

### Eszközök, oldatok előkészítése:

- A liofilizáló üvegek sterilizálása hőlégsterilizátorban 160 °C-on.
- Liofilizáló kupakok sterilizálása certoklávban 121 °C-on 1,1 bár túlnyomáson.
- Krioprotektáns oldatok készítése. Sovány tejpor 30%-os, nátrium-glutamát 30%-os és trehalóz 30%-os oldatát 1:1:1 arányban, vagy kettőt közülük 1:1 arányban elegyíteni. A sovány tejpor oldatot certoklávban sterilizáljuk le, a nátrium-glutamát és a trehalóz oldatokat szűrővel csíramentesítjük.

### A liofilezés lépéseinek megírása a készülékben:

1. lépés: Loading. (Mindig ez az első lépés)
2. lépés: Freezing. 1,5 óra, -20 °C, Vacuum: -, Safety pressure: -, dT: -
3. lépés: Freezing. 4 óra, -20 °C, Vacuum: -, Safety pressure: -, dT: -

4. lépés: Main Drying. 1 óra, -20 °C, Vacuum: 0,85 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  5. lépés: Main Drying. 3 óra, -20 °C, Vacuum: 0,85 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  6. lépés: Main Drying. 1 óra, -15 °C, Vacuum: 1,03 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  7. lépés: Main Drying. 3 óra, -15 °C, Vacuum: 1,03 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  8. lépés: Main Drying. 1 óra, -10 °C, Vacuum: 1,03 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  9. lépés. Main Drying. 3 óra, -10 °C, Vacuum: 1,03 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  10. lépés: Final Drying. 30 perc, -5 °C, Vacuum: 0,001 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  11. lépés: Final Drying. 30 perc, 0 °C, Vacuum: 0,001 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  12. lépés: Final Drying. 30 perc, +5 °C, Vacuum: 0,001 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  13. lépés: Final Drying. 30 perc, +10 °C, Vacuum: 0,001 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
  14. lépés: Final Drying. 30 perc, +20 °C, Vacuum: 0,001 mbar, Safety pressure: 1,65 mbar, dT: off
- A program lementését követően, indítsuk is el a programot. Figyeljünk arra, hogy a liofilizáló teteje megfelelően legyen ráhelyezve a készülékre. Kapcsoljuk be a vákuumszivattyú főkapcsolóját és zárjuk el a készülék jobboldalán levő szelepeket.
  - A liofilizáló üvegekbe lamináris boksza alatt pipettázzunk 250 µl-t a kinőtt tenyészetből. Ehhez a mennyiséghez adjunk még 250 µl lioprotektáns oldatot. Pár percig hagyjuk elegyedni.
  - Az üvegek tetejére helyezzük a kupakokat félig nyitott helyzetben. A kupak nyílásain keresztül fog távozni a víz.

- A feliratozott és félig nyitott üvegeket gyorsan kell fagyasztani, melyet vagy folyékony nitrogénbe való mártásával vagy a -80 °C-os hűtőbe való helyezésével tudjuk elérni.
- A gyors fagyasztást követően helyezzük be a liofilizálóba az üvegeket. A liofilizáló tálcájának hőmérséklete ekkor már legyen -20 °C-os.
- Figyeljük a készüléket, hogy megfelelően hajtja-e végre a programot.
- A program befejezését követően tekerjük fel a tálcát addig, amíg az üvegek lezáródnak. Ekkor nyithatjuk ki a készülék jobb oldalán a két szelepet, majd kikapcsolhatjuk a vákuumszivattyút és a liofilizáló készüléket.

#### Liofilizált tenyészet életképességének vizsgálata:

- Steril körülmények között megbontjuk a liofilizáló cső kupakját.
- Steril pipettahegy segítségével friss tápközeget adagolunk a csőbe és szuszpendáljuk.
- YM táptalajjal megegyező összetételű, de 20 g/L agar-aggarral kiegészített szilárd tápközegre 100 µl-t pipettázunk, majd szélesztőbottal elterítjük a táptalaj felületén.
- A Petri-csészéket 28 °C-on inkubáljuk 2 napig, majd megszámloljuk a kinőtt telepeket.

## 8 Irodalomjegyzék

1. 'INEL' Műszaki Fejlesztő és Szolgáltató Kft: BR92K Laboratóriumi Blokkfermentor Gépkönyv, Budapest 1997. március
2. Raypa R.ESPINAR, S.L.: Instruction Manual For Use And Maintenance, Autoclaves For Sterilization AES-110
3. CertpClav Sterilizer GmbH: High Pressure-LABORATORY AUTOCLAVE, CertoClav EL Instructions,  
[http://www.google.hu/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fiers.be%2Fcms%2Fdownload.dhtml%3Furl%3D%2Fcms\\_files%2FN-246003-nlFile1.pdf%26filename%3Dcertoclaaf.pdf&ei=ma8jVaGzMtPWauyngJgN&usg=AFQjCNHZmeVCyxIFRGReft7FjG4BvIjuYw&sig2=2shG6kagqOfa5tH9wrOVXQ&bvm=bv.89947451,d.d2s&cad=rja](http://www.google.hu/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fiers.be%2Fcms%2Fdownload.dhtml%3Furl%3D%2Fcms_files%2FN-246003-nlFile1.pdf%26filename%3Dcertoclaaf.pdf&ei=ma8jVaGzMtPWauyngJgN&usg=AFQjCNHZmeVCyxIFRGReft7FjG4BvIjuYw&sig2=2shG6kagqOfa5tH9wrOVXQ&bvm=bv.89947451,d.d2s&cad=rja) [2015.április 7.]
4. Dr. Suhajda Égnes: Szakvélemény a Hypo használatáról,  
<http://m.cdn.blog.hu/bm/bme-ezk/hipo.pdf> [2015.április 7.]
5. DONAU CHEM: Nátrium-hipoklorit, <http://www.donauchem.hu/Products---Solutions/ProductView.aspx?productId=271>, [2015.április 7.]
6. Poós Tibor: Sterilizés,  
[http://www.google.hu/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&ved=0CGEQFjAH&url=http%3A%2F%2Fhost.epget.bme.hu%2Fen%2Fcomponent%2Fphocadownload%2Fcategory%2F48-ae2\\_elelmiszeriparitechnologiakesgepei%3Fdownload%3D706%3Aae2\\_141022\\_sterilezes\\_pt&ei=46TYVIGQHcHxaoLNgdgJ&usg=AFQjCNEi\\_r1ZfpZoNQsMkQpfEuY1qgyrJg&bvm=bv.85464276,d.d2s&cad=rja](http://www.google.hu/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&ved=0CGEQFjAH&url=http%3A%2F%2Fhost.epget.bme.hu%2Fen%2Fcomponent%2Fphocadownload%2Fcategory%2F48-ae2_elelmiszeriparitechnologiakesgepei%3Fdownload%3D706%3Aae2_141022_sterilezes_pt&ei=46TYVIGQHcHxaoLNgdgJ&usg=AFQjCNEi_r1ZfpZoNQsMkQpfEuY1qgyrJg&bvm=bv.85464276,d.d2s&cad=rja) [2015.április 7.]
7. Márialigeti Károly: Bevezetés a prokarióták világába,  
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/prokariotak/ch04s08.html>  
[2015.április 7.]
8. Formaldehid biztonsági adatlap,  
[https://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A0421\\_hu\\_HU.pdf](https://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A0421_hu_HU.pdf)  
[2015.április 7.]

9. **Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger Sz, Molnár ÁP, Szentirmai A, Karaffa L** (2014): Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *TheJournal of Antibiotics*, 67: 489–497.

## Vázlat laboratóriumi jegyzőkönyv elkészítéséhez

**A laboratóriumban elsődlegesen legyen fontos a jegyzőkönyv gondos és pontos kezelése úgy, hogy forrásként a jegyzőkönyvet használva a kísérletet, a jegyzőkönyv készítője, vagy más személy meg tudja ismételni.**

A gyakorlati jegyzőkönyv a gyakorlat során elvégzett munka leírását tartalmazza, kellő részletességgel. Ha a gyakorlaton a jegyzőkönyv készítője részt vett, akkor azt a jegyzőkönyvvel tanúsítja, ezért rendkívül fontos dokumentum. A laboratóriumi jegyzőkönyvnek rendszerezettnek, és kellően részletesnek kell lennie. A formai követelmények, amelyek itt szerepelnek, alapvetően megfelelnek azoknak, amelyeket az oktatási, ipari, üzleti és állami laboratóriumok alkalmaznak.

Név:

Dátum: év, hónap, nap

Szak:

Évf.:

### A gyakorlat címe

#### **1. Bevezetés**

A bevezetés a jegyzőkönyv első összefüggő szöveget tartalmazó részegysége. Röviden tartalmaznia kell a gyakorlat során elvégezendő feladatok, mérések elméleti háttérét. Az elvégezendő feladat rövid leírását.

#### **2. Felhasznált anyagok és eszközök**

A jegyzőkönyv ezen része az elvégezendő feladat során alkalmazott anyagok és eszközök felsorolását hivatott tartalmazni. Lehetőség szerint feladatonként csoportosítva.

#### **3. A gyakorlat menete**

A jegyzőkönyv 3. pontjába az elvégzett munkát, annak tényleges folyamatát kell dokumentálni, érthető követhető logikai sorrendben [megfelelő részletességgel]. Kiemelve a gyakorlati feladatok kritikus pontjait. A feladat jellegétől függően, rajzokkal ellátni a jegyzőkönyv ezen részét (pl. mikroszkópos vizsgálatok esetén a látott sejtalkotásokat).

#### **4. Kísérleti eredmények**

Ebben a pontban kell a kapott eredményeket feljegyezni. Az esetleges számolásokat elvégezni, valamint megfelelő magyarázatot írni a számítások, megfigyelések mellé, amennyiben szükséges.

#### **5. Diskusszió**

Más szóval, összefoglalás, levont következtetések összegzése. Ebben a pontban kell feljegyezni, hogy a kísérlet sikeresen teljesítésre került-e. Dokumentálni kell, hogy az esetlegesen elkövetett hibáknak, a gyakorlati leírástól eltérő körülmények, milyen következményei voltak a kísérlet kimenetelére és a kapott eredményekre.