

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

200 704 B

(22) Bejelentés napja: 1985.03.08.

(21) 2181/85

(33) AT

(32) 1984.03.09.

(31) A 797/84

(86) PCT/EP85/00089

(87) WO 85/04111

(51) Int Cl⁵

B 01 D 13/04

C 08 L 89/00

B 01 D 53/22

B 01 J 13/02

B 01 J 47/00

(41) (42) Közzététel napja: 1987.11.30.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma

a Szabadalmi Közlönyben: 1990.08.28. SZKV/1990.08.

(72) (73) Feltalálók és szabadalmazók:

Sleytr Uwe B., Sara Margit, Bécs (AT)

(54) ÖSSZEFÜGGŐ PÓRUSOKKAL RENDELKEZŐ MEMBRÁN-SZERKEZETEK

(57) KIVONAT

A találmány olyan szerkezetekre vonatkozik, amelyek legalább egy, összefüggő pórusokkal rendelkező membránból állnak, ahol a pórusok átmérője a 2–200 nm tartományba esik. A találmány tárgya továbbá az ilyen szerkezetek előállítása, amelyet úgy végeznek, hogy bacillus sejtburkokból vizes közegben, kaotropikus szerek és/vagy felületaktív anyagok adagolásával és/vagy a pH megváltoztatásával protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat vagy ezekből felépülő réteg-fragmen-

seket választanak le, oldatba, illetve szuszpenzióba viszik, majd a kaotropikus szerek és/vagy felületaktív anyagok koncentrációjának csökkentésével és/vagy a pH megváltoztatásával a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák vagy az ezekből felépülő réteg-fragmensek membránokká történő rendeződését idézik elő.

A kialakított membránok ultraszűrő membránokként alkalmazhatók.

A leírás terjedelme: 9 oldal, 6 ábra

HU 200 704 B

A találmány olyan szerkezetekre vonatkozik, amelyek legalább egy, összefüggő pórusokkal rendelkező membránból állnak, ahol a pórusok átmérője a 2–200 nm tartományba esik. A találmány tárgya továbbá az ilyen szerkezetek előállítására.

Összefüggő, 2–200 nm átmérőjű pórusokkal rendelkező membránszerkezeteket, pl. ultraszűrő membránokat különböző, molekulatömegű nagy-molekulájú szerves anyagok elegyeinek frakcionálására vagy koncentrálására használnak. Aszimmetrikus ultraszűrő membránokat számos helyen, ipari és kísérleti üzemi célra használnak; ezek nagyon vékony, általában 100–200 nm vastagságú elválasztó filmből — amely meghatározza a membránon keresztül történő tömegáramlást és az elválasztás szelektivitását — és durván porózus támasztó rétegből állnak. Az elválasztó filmek különféle polimerekből állhatnak, így előnyösen cellulózszármazékokból vagy poliszulfonokból. Az ilyen ultraszűrő membránok vagy fázisváltással készült membránok, vagy összetett membránok lehetnek. A fázisváltással készült membránokat úgy állítják elő, hogy homogén polimer-oldatot kicsapószerrel hoznak érintkezésbe, ekkor a polimer-oldat és a kicsapószer érintkezési felületén membrán képződik, ez egyesíti magában a durván porózus támasztó filmet és a finom porózus filmet. Az összetett membránok esetén az elválasztó filmet és a támasztó filmet külön-külön állítják elő, és utólag illeszti össze.

Az ismert ultraszűrő membránok esetén a pórusátmérő mérete nem állandó, hanem egy átlagérték körül véletlenszerűen oszlik meg. Az ultraszűrő membránok viselkedését a visszatartási görbével lehet jellemezni. A visszatartási görbét úgy állapítják meg, hogy különböző ideális tesztmolekulákra (ezek töltéssel nem rendelkező gömbalakú molekulák), különböző molekulatömegeknél (MW) meghatározzák az ultraszűrő membrán visszatartási arányát (R) százalékban. A visszatartási görbe az ezen tesztértékek közötti interpolációt képviseli, és a visszatartási arány (R) és a molekulatömeg logaritmus [log(MW)] közötti összefüggést mutatja.

Az 1. ábra három, kereskedelemben kapható ultraszűrő membrán visszatartási görbéjének diagramját mutatja, éspe dig:

- A görbe: PSED (Millipore) membrán, Millipore, Bedford, Ma, USA gyártmány;
- B görbe: PSVP 1000 (Millipore) membrán, ugyanannak a cégnek a gyártmánya;
- C görbe: PM 30 (Amicon) membrán, Amicon, Danvers, Ma, USA gyártmány.

Amint a visszatartási görbékből látható, ezekkel az ultraszűrő membránokkal az egymástól kissé eltérő molekulatömegű molekulákat nem lehet élesen elválasztani.

Az ultraszűrő membránoknak egy másik jellemzője az úgynevezett átfolyási arány. Ez azt a vízmennyiséget jelenti, amely a membránon m^2 -enként és óránként egy előre meghatározott, a membrán két oldalán fennálló nyomáskülönbségnél átfolyik. Az ismert, fázisváltással készült membránok esetén, amelyek 100–200 nm vastagságú elválasztó filmet tartalmaznak, a membrán jelentős ellenállást fejt ki az átfolyó vízre. Az átfolyási arány annál

magasabb, minél nagyobb a membrán egységnyi felületén elhelyezkedő pórusok száma, vagy minél kisebb az effektív pórusmélység, azaz a pórusokat alkotó csatornák hossza. Emellett az ultraszűrő membránok fontos minőségi jellemzője a kémiai és/vagy termikus stabilitás.

A találmány célja olyan szerkezet kialakítása, amely legalább egy, összefüggő pórusokkal rendelkező membránból áll, ahol a pórusok átmérője 1 és 8 nm közötti, és amellyel — ultraszűrőként történő alkalmazáskor — egymástól kissé eltérő molekulatömegű molekulák éles elválasztása lehetséges és jobb átfolyási arány érhető el, mint az ismert ultraszűrő membránokkal, és amely jó kémiai és termikus stabilitást mutat.

A kitűzött célt a találmány értelmében egy olyan szerkezet megalkotásával értük el, amelyben a membránt vagy membránokat — amelyek sík, gömbölyt, hengeres vagy sejtyszerű felületet alkotnak — legalább egy, egymáshoz csatlakozó, kristályrácsban elhelyezkedő molekulák rétegéből alakítjuk ki, nevezetesen bacillus sejtfalából. Így ezekben a rétegekben a kristályrácsnak megfelelően összefüggő pórusok maradnak szabadon a molekulák között. A membránokat megfelelő porózus hordozó anyaghoz kapcsoljuk vagy abban alakítjuk ki, vagy támasztó filmhez kapcsoljuk. A membránokban a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák egyszeres rétegét vagy több egymással összefüggő rétegét alakítjuk ki kristályrácsnak megfelelően, ahol a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák nem-kovalens kötéssel kapcsolódnak egymáshoz.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti szerkezetet úgy alakítjuk ki, hogy mono- vagy bifunkciós molekulákat kapcsolunk a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák reaktív csoportjaihoz. Ezek a reaktív csoportok lehetnek karboxil- és/vagy aminos- és/vagy szulfhidril- és/vagy hidroxilcsoportok. A kapott szerkezet olyan membránokat tartalmaz, amelyek protein molekulákból vagy proteint tartalmazó molekulákból álló réteggel rendelkeznek, ahol ezeket a molekulákat a reaktív helyeknél idegen molekulák kötik össze.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint a membrán protein molekuláit vagy proteint tartalmazó molekuláit bifunkcionális idegen molekulákkal intramolekuláris kovalens keresztkötésekkel kapcsoljuk össze és/vagy az ugyanazon membránhoz vagy két szomszédos membránhoz tartozó protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulákat kovalens keresztkötésekkel egymáshoz kapcsoljuk — alkalmas bifunkcionális idegen molekulákon keresztül — és/vagy a protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat — alkalmas bifunkcionális idegen molekulákon keresztül — keresztkötésekkel hordozó anyaghoz kapcsoljuk.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint az idegen molekulák bejutnak a membrán pórusainak azon zónájába, amely a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák közé nyúlik be.

A találmány egy még további előnyös megvalósi-

tási módja szerint a membránok olyan protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat és/vagy idegen molekulákat tartalmaznak, amelyekben disszociálható csoportok találhatók, ezek a membrán működése közben disszociálnak, így a működési feltételektől függően, előre meghatározott elektromos töltést tudnak felvenni. A membránokat előnyösen úgy alakítjuk ki, hogy a membrán párhuzamos felületein ezek a disszociálható csoportok eloszlásukra és/vagy típusukra nézve aszimmetrikusan helyezkedjenek el.

A találmány szerinti membránokat úgy állítjuk elő, hogy protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat, amelyeket sejtek burkából nyerünk, vagy ilyen molekulák rétegének fragmenseit, ahol ezek a molekulák egymáshoz kapcsolódnak, oldatba, illetve szuszpenzióba visszük. Az alkalmazott folyadékfázis, célszerűen vizes közeg, kaotropikus szereket, például guanidin-hidrokloridot vagy karbamidot és/vagy felületaktív anyagokat is tartalmaz. A kapott oldatban, illetve szuszpenzióban azután csökkentjük a kaotropikus szereket és/vagy felületaktív anyagok koncentrációját, és/vagy változtatjuk a közeg pH-ját, így olyan körülményeket hozunk létre a közegben, hogy a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák és/vagy réteg-fragmensek olyan membránokká rendeződnek, amelyekben a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák kristályrács-szerűen helyezkednek el egymás szomszédságában. Ekkor a molekulák közötti kristályrács szerint rendeződő pórusok szabadon maradnak. Az így kialakított membránokat egy hordozóra vagy hordozóba helyezjük, ahol célszerűen mono- és/vagy bifunkcionális idegen molekulákkal végzett kezeléssel a protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat relatív csoportjaikon keresztül intramolekuláris keresztkötésekkel egymáshoz és/vagy a hordozóhoz kapcsoljuk. A protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák és/vagy az ilyen molekulákból felépített réteg-fragmensek oldatának, illetve szuszpenziójának létrehozásakor előnyösen úgy járunk el, hogy olyan típusú sejtburkokból indulunk ki, amelyeknek belső rétege kristályrács-szerűen egymás mellett elhelyezkedő protein molekulákból vagy proteint tartalmazó molekulákból épül fel, ahol a rétegben a molekulák közötti kristályrács-szerűen elrendeződő összefüggő pórusok szabadon maradnak. Kaotropikus szereket és/vagy felületaktív anyagok adagolásával és/vagy a közeg pH-jának módosításával a protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat vagy az ilyen molekulákból felépített réteg-fragmenseket a sejtburkokról leválasztjuk, és a sejtburkok maradékát a közegtől elválasztjuk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák elválasztását úgy végezzük, hogy a közeg pH-ját 7,0 és 13,0 közötti, előnyösen 7,0 és 9,5 közötti értékre emeljük, vagy 1,0 és 7,0 közötti, előnyösen 2,5 és 7,0 közötti értékre csökkentjük.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint a kaotropikus szereket és/vagy felületaktív anyagok koncentrációjának csökkentését és/vagy a pH változtatását, amivel a protein mole-

kulák vagy proteint tartalmazó molekulák és/vagy elválasztott réteg-fragmensek membránná rendeződését megindítjuk, dialízissel hajtjuk végre.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint olyan mono- és/vagy bifunkcionális idegen molekulákat alkalmazunk, amelyek a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák karboxil-, amino-, szulfhidril- és/vagy hidroxilcsoportjaival reagálnak.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák és/vagy réteg-fragmensek membránná rendeződése szilárd fázis — folyadék fázis határfelületen megy végbe.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák és/vagy réteg-fragmensek önrendeződésével kialakult membránok maximális mérete 100 μm alatti, előnyösen 15 μm alatti tartományban van, bármely dimenzióban.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint a membránokat egy hordozóra ülepítjük.

A találmány szerinti módszerrel kialakított szerkezetek a következő területeken alkalmazhatók:

– ultraszűrőként, gáz-elválasztóként vagy ioncserés folyamatokban elválasztóként;

– hordozószerkezetként más félígáteresztő membránokhoz, amelyek a membránok pórusaiban helyezkednek el, ahol ezeket a másik félígáteresztő membránokat közvetlenül vagy bifunkcionális idegen molekulákkal létrehozott, a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák karboxil-, amino-, szulfhidril- és/vagy hidroxilcsoportjain keresztül keresztkötésekkel kapcsoljuk. Az ilyen másik félígáteresztő membránok lehetnek például hiperszűrő membránok, célszerűen felületaktív vagy ilyenszerű lipoid hiperszűrő membránok, ioncserés eljárások elválasztószerkezete, bepárló eljárások elválasztó szerkezete vagy oldószer diffúziós membránok;

– oszlopkromatográfia elválasztó oszlopaként, ahol a membránokat célszerűen hólyagocskák formájában alakítjuk ki;

– anyagok burkolóanyagaként, amikor ezt a burkolóanyagot biológiailag lebomló csomagolóanyagként vagy orálisan adagolandó gyógyszerkészítmények kapszulájaként alkalmazhatjuk.

Néhány bacillus sejtburkának a belső rétegében a tömegeloszlás elektronmikroszkopos meghatározásával periodicitás mutatható ki, ami arra enged következtetni, hogy ezeknek kristályos szerkezetük van. Ez a belső réteg, amelyet a következőkben S-réteggént említünk, vizes közegben, kaotropikus szereket adagolásával elválasztható a sejtburkokból közvetlenül alatta elhelyezkedő, peptidoglikánt tartalmazó rétegtől, és oldatba vihető. Hogyan ez biokémiai módszerekkel meghatározható, ez az S-réteg a legtöbb esetben azonos molekulákban áll, mégpedig protein molekulákból vagy proteint tartalmazó molekulákból. Ha a kaotropikus szer koncentrációját például dialízissel csökkentjük az oldatban, ezekből a molekulákból önrendeződéssel kis membrán fragmensek képződnek, amelyeknek felületi mérete 10–15 μm -ig terjed, és amelyek

ugyanolyan tömegeloszlást mutatnak, mint az eredeti S-réteg. Ezeket a membrán-fragmenseket a továbbiakban P-membránként említjük. Mivel ezek a F-membránok a kaotropikus szerek koncentrációjának emelésére ismét szétesnek, illetve a kaotropikus szerek koncentrációjának ismételt csökkentésére ismét kialakulnak, feltételezhető, hogy a P-membránok egymás mellett, egymáshoz kapcsolódó, kristályrácsban elrendeződő protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák rétegéből épülnek fel, és a P-membránokat képező molekulák reverzibilis oldódása, illetve rekonstitúálása a molekulák nem-kovalens kapcsolódása következtében megy végbe.

Az előzőleg meghatározott tömegeloszlásból felismerhető a rácsszerkezet típusa, amely négyzetes, hexagonális vagy ferdeszögű lehet. A 2-4. ábrán bemutatunk háromféle rács típust, amelyeken felismerhető a protein molekulából, illetve proteint tartalmazó molekulából felépítendő S-réteg, illetve P-membrán. A 2. ábra egy p4-szimmetriájú négyzetes rácsszerkezetet mutat, a 3. ábra egy p6-szimmetriájú hexagonális rácsszerkezetet mutat, és a 4. ábra egy p2-szimmetriájú ferdeszögű rácsszerkezetet mutat. Az S-rétegek és P-membránok elektronmikroszkóppal meghatározott tömegeloszlása alapján feltételeztük, és a 2-4. ábrákon sematikus ábrázoltuk, hogy az S-rétegeket és P-membránokat képező molekulák között jellemző formájú és méretű összefüggő pórusok helyezkednek el. Ahogy a későbbiekben részletesen tárgyaljuk, ez a feltételezés bizonyítást nyert.

A továbbiakban az első példában és az 5-7. ábrával egy olyan szerkezet kialakítását ismertetjük, amelyhez P-membránt alkalmaztunk, és amely ultraszűrőként használható.

1. példa

Bacillus stearothermophilus 3c/NRS 1536 sejtekből indulunk ki, amelyeknek a sejtburkát citoplazma membrán, peptidoglikánt tartalmazó réteg és S-réteg képezi. Ahogyan az a mikrobiológiai gyakorlatban szokásos, a sejteket először ultrahang-kezeléssel felnyitjuk, a citoplazma membrán fragmenseket detegensek segítségével dezintegráljuk, és a maradék sejtmembrán fragmenseket mosással megtisztítjuk a sejt komponensektől. Ezután az S-réteget a peptidoglikánt tartalmazó rétegtől vizes közegben elválasztjuk úgy, hogy kaotropikus szerként 5 mol/l guanidin-hidrokloridot adagolunk, és oldatba visszük. Az oldatból ezután centrifugálással elválasztjuk a peptidoglikán fragmenseket, és a tiszta oldatot 10 mmol/l CaCl_2 -t tartalmazó pufferoldattal szemben dializáljuk. A dialízis során, amikor a guanidin-hidroklorid koncentrációja az oldatban gyakorlatilag nullára csökken és a CaCl_2 koncentrációja emelkedik, P-membránok képződnek, amelyek 14 nm periodicitású négyzetes rácsszerkezetet (p4-szimmetriájú) mutatnak, és amelyeknek a felületi mérete legfőbb 15 μm . Ezeket a P-membránokat keveréssel a vizes közegben szuszpenzióban tartjuk.

Az ultraszűrő kialakításához az 5. ábrán bemutatott, 2 nyomás alatt működő berendezést használ-

juk. Ez 3 fenékrésszel rendelkezik, amelyen bordázott aljú, 4 hengeres horony van kialakítva, ebbe porózus 5 szinterlemez van beágyazva, az 5 szinterlemez alatti tér 6 kivezető csatornán keresztül 7 kivezetőcsővel van összekötve. A 3 fenékrészen 8 0-záró gyűrű közbeiktatásával plexiüvegből készült 9 hengeres fal van elhelyezve, amelyen egy második, 10 0-záró gyűrű közbeiktatásával 11 fedőrész van elhelyezve. A 11 fedőrészben 13, 14 csatlakozókkal ellátott 12 bevezetőcsatorna van kialakítva. A 13 és 14 csatlakozók bevezetőcső, illetve nyomógáz-forrás csatlakoztatására szolgálnak. A 11 fedőrész alsó részéhez 15 mágneses keverőegység van csatlakoztatva, amelynek 16 keverője leér a 9 hengeres fal alsó széléig. A nyomás alatt működő berendezés fenék- és fedőrészét működtetésekor egy, 17 és 17 helyre kapcsolt összekapcsoló eszköz tartja össze.

Az ultraszűrő előállításához a nyomás alatt működő berendezésben levő 5 szinterlemezre egy tárcsa formájú 18 mikroszűrőt helyezünk el (Nucleopore, Tübingen, NSZK gyártmány), amely az előállítandó ultraszűrő hordozójaként fog szolgálni. Ez a 18 mikroszűrő 10 μm vastag, egyenletes pórusméretű, 0,1 μm pórusátmérőjű polikarbonát-filmből áll. A fent ismertetett módon elkészített P-membrán-szuszenziót a 13 csatlakozón keresztül a 11 fedőrészbe öntjük olyan mennyiségben, hogy a mikroszűrőre cm^2 -enként 25 μg P-membrán jusson. Ezután a 14 csatlakozón keresztül 0,5.10⁵ Pa túlnyomással nitrogéngázt vezetünk be, aminek hatására a szuszpenzió folyadékfázisa a 18 mikroszűrőn és 5 szinterlemezen keresztül eltávozik, és a P-membránok a 18 mikroszűrőre lerakódnak. Ezután a 13 csatlakozón keresztül a lerakódott P-membránokra 3 ml 2,0 térf%-os glutáraldehid-oldatot (0,1 mol/l-es nátrium-kakodilát-pufferben, pH = 7,2) juttatunk. Ezután 2.10⁵ Pa túlnyomást létesítünk, ezzel a glutáraldehid-oldatot 20 °C-on 20 perc alatt átsajtoljuk a lerakódott P-membránokon és a 18 mikroszűrőn. A glutáraldehidben a molekula két végén két karbonilcsoport van, így a P-membránban található proteint tartalmazó molekulák lizin-jének ϵ -aminocsoportjaival bifunkcionális térhálósítószerként reagál. Abban az esetben, ha mindkét ϵ -aminocsoport ugyanabban a proteint tartalmazó molekulában helyezkedik el, akkor ez a reakció intramolekuláris, míg ha a két ϵ -aminocsoport két különböző, proteint tartalmazó molekulában helyezkedik el, akkor ez a reakció intermolekuláris.

Néhányszor megismételt mosás után a 18 mikroszűrőből és a lerakódott és térhálósított P-membránokból álló ultraszűrő lényegében kész, és eltávolítható a 2 nyomás alatt működő berendezésből. Azonban a fenti módon készített ultraszűrő membránt tartalmazó 2 nyomás alatt működő berendezés közvetlenül is alkalmazható ultraszűrő egységként.

A készített ultraszűrő membrán visszatartási jellemzőinek megállapítása céljából szűrési kísérleteket végeztünk 2.10⁵ Pa nitrogén-túlnyomás alkalmazása mellett, különböző tesztmolekulákat alkalmazva, különböző pH-nál, a tesztmolekulák töltéssel nem rendelkeztek, azaz izoelektromos pontjuknál (IEP) dolgoztunk. Tesztanyagként a következőket alkalmaztuk:

Protein	Molekula tömeg	IEP	A rajzokban
1. Mioglobin	17.000	6,6	M
2. Szubtilizin	27.000	9,4	S
3. Ovalbumin	43.000	4,6	O
4. Szarvasmarha szérum albumin	67.000	4,7	BSA
5. Ferriitin	440.000	4,3	F

A 6. ábra az ezen anyagok visszatartási aránya alapján meghatározott teszt értékek interpolációjával megszerkesztett visszatartási görbét mutatja. A visszatartási görbén éles határ mutatkozik a szubtilizin és az ovalbumin molekulatömege közötti értéknek megfelelő visszatartási arányban. A visszatartási görbe azt is igazolja, hogy a P-membránok azonos méretű összefüggő pórusokkal rendelkeznek. A visszatartási görbe formája alapján feltételezhető, hogy a pórusok átmérője 4–5 nm.

Az ezzel az ultraszűrő membránnal meghatározott átfolyási arány 2.10^5 Pa membrán-túlnyomás esetén mintegy 480 l/óra.m^2 . Az átfolyási arány azonban a lerakódott P-membránok mennyiségétől függ. Így, ha lerakódott P-membránok mennyisége $50 \mu\text{g/cm}^2$, ez az érték 220 l/óra.m^2 értékre csökken.

A fenti módon előállított ultraszűrő membrán további előnyös tulajdonságokkal rendelkezik, amelyeket a következőkben ismertetünk.

A szabad aminos- és karboxilcsoportok különbözőképpen járulnak hozzá az S-réteg-fragmensek, illetve a nemtérhálósodott P-membránok eredő elektromos töltéséhez, az őket körülvevő vizes közeg pH-jától függően. 9,0 pH-érték eléréséig az aminoscsoportok pozitív töltést eredményeznek, míg a karboxilcsoportok negatív töltést eredményeznek 2,0 pH-értékig. Egy bizonyos pH-értéknél, azaz az izoelektromos pontjuknál (IEP) a negatív és pozitív töltések kompenzálják egymást, így az S-réteg-fragmensek és P-membránok kifelé elektromosan semlegesnek mutatkoznak. A jelen példában a P-membrán potenciálisan pozitív töltéssel rendelkező csoportjai elvesznek azáltal, hogy a P-membránok proteint tartalmazó molekuláiban található lizin molekulák ϵ -aminocsoportjait glutáraldehiddel térhálósítjuk, ezáltal a térhálósított P-membrán EIP értéke a savas tartományba kerül, mégpedig kisebb érték lesz, mint $\text{pH} = 2,0$. A térhálósított P-membrán negatív eredő töltése sok esetben hatásos védelmet jelent a membrán pórusok eltömődése ellen fiziológias körülmények között végzett szűrések esetén.

A 7. ábrán szematikusan bemutatjuk a jelen példa szerint előállított ultraszűrő membrán egy részletét. A 18 mikroszűrő 19 összefüggő pórusai felületére lerakódtak a 20 P-membránok, és ott kereszt-kötéssel vannak rögzítve. Ezeket tehát olyan mennyiségben alkalmazzuk, hogy a P-membránok teljes felületének mennyisége mintegy két-háromszorosa legyen az ultraszűrő membrán felületének, így a P-membránok általában két rétegben helyezkedjenek el, és azok fedjék át egymást.

2. példa

Az 1. példától eltérően *Bacillus stearothermophilus* pV 72 sejteket alkalmazunk. Ezeknek a sejtburka szintén citoplazma membránból, peptidoglikánt tartalmazó rétegből és proteint tartalmazó molekulákból álló S-rétegből épül fel. A P-membrán-szuszpenziót az 1. példában leírt módon a sejtburkból állítjuk elő. Ennek a bacillusnak a sejtburkából nyert S-réteg, illetve P-membránok hexagonális (p6-szimmetriájú) rácsszerkezetet mutatnak 18 nm periodicitással.

Ultraszűrő membránként alkalmazható szerkezet előállításához a 2 nyomás alatt működő berendezésben egy tárcsa formájú, $150 \mu\text{m}$ vastagságú Ultipor n66 T típusú (Pall, Cortland, USA gyártmány) tárcsa formájú nylon mikroszűrőt helyezünk el hordozóként. Ez a mikroszűrő 1:1 arányban tartalmaz szabad aminos- és karboxilcsoportokat. Az 1. példa szerintihez hasonló módon eljárva a P-membrán-szuszpenziót olyan mennyiségben viszszük fel a mikroszűrőre, hogy a mikroszűrő cm^2 -jeire számítva $30 \mu\text{g}$ P-membrán legyen a szuszpenzióban. A P-membránok lerakódnak a mikroszűrőre, illetve beleszűrődnek a mikroszűrő szivacsos szerkezetébe, amikor 2.10^5 Pa túlnyomást alkalmazunk.

A 8. ábrán bemutatjuk a 21 mikroszűrő részletét, amely szabálytalan szivacszerű szerkezettel rendelkezik, egy átlagérték körül véletlenszerűen eloszló pórusméretekkel. A lerakódott 20 P-membránokat szintén ábrázoltuk.

A 20 P-membránokon és 21 mikroszűrőn 2.10^5 Pa túlnyomással 1 ml 0,1%-os dimetil-szuberimidát-oldatot (1 mól/l-es trietanol-amin-pufferben, $\text{pH} = 9,5$) sajtolunk át 4°C -on, 60 perc alatt. A dimetil-szuberimidát, lévén egy bifunkcionális imidoészter, egy aldehidhez hasonló módon intra- és intermolekulárisan reagál elsősorban a P-membránokban található proteint tartalmazó molekulák lizinjének ϵ -aminocsoportjaival, valamint a nylon mikroszűrő anyagának aminoscsoportjaival. Néhányszor ismételt mosás után az ultraszűrő membrán alkalmazásra kész.

A 9. ábra az ultraszűrő membrán visszatartási görbét mutatja. Az 1. példában ismertetett membránhoz hasonlóan itt is éles határ mutatkozik az elválasztható molekulatömegekben.

A dimetil-szuberimidát és az ϵ -aminocsoportok reakciójával kialakított amidinek pozitív töltést képviselnek a lizin ϵ -aminocsoportjaihoz hasonló módon, így a P-membránok eredő töltése alig változik a térhálósítással.

Az 1. és 2. példában ismertetett, P-membránokból kialakított szerkezetek, amelyek előnyösen ultraszűrő membránokként alkalmazhatók, az idegen molekulákkal kialakított kereszt-kötések jelenléte következtében kiváló kémiai, termikus és mechanikai stabilitást mutatnak. Különösen proteolitikus degradációval szemben stabilak, így autoklávban kezelhetők, és savas vagy lúgos közegben (1 és 13 pH-érték között), valamint nagy koncentrációjú kationotropikus szerekkel (pl. 5 mól/l-es guanidin-hidroklorid, 8 mól/l-es karbamid) együtt is alkalmazhatók. A P-membránokból kialakított szerkezetek további fontos tulajdonsága, hogy szerves folyadékoknak, így ketonoknak, alkoholoknak és klórozott

szénhidrogéneknek ellenállnak.

Az ultraszűrő membránok szükséges pórusméretét lényegében véve úgy alakítjuk ki, hogy megfelelő mikroorganizmust választunk, amelynek sejtburka körülbelül a kialakítandó pórusméretnek megfelelő pórusokkal rendelkező S-réteget tartalmazza. A kívánt pórusméret változtatható úgy, hogy idegen molekulákat adagolunk, amelyek a P-membránok pórusainak területére bejutnak. Ezt a későbbiekben részletesen ismertetjük.

Az egy molekularétegből kialakított P-membránok rétegvastagsága mintegy 5–20 nm, a pórusok átmérője 1 és 8 nm között van.

A P-membrán-szuszenzió előállításával kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy a kaotropikus szerek, illetve felületaktív anyagok megválasztásával befolyásolható, hogy az S-réteg fragmensek csupán leváljanak a sejtburk peptidoglikán-tartalmú rétegéről, vagy maga az S-réteg is dezintegrálódjon és oldatba menjen. Így például, ha a kezelést 2,5 mól/l-es guanidin-hidroklorid-oldattal végezzük, az S-réteg fragmensek csak leválasztódnak, míg ha 5 mól/l-es guanidin-hidroklorid-oldatot alkalmazunk, az egyes protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák közötti kötődések elroncsolásával az S-réteg dezintegrálódását is elérhetjük, hogy az S-réteget tartalmazó oldat pH-ját jelentősen megváltoztatjuk, például a pH-t 7,0 értékről 2,5 értékre csökkentjük, vagy 7,0 értékről 9,5 értékre emeljük.

Az önrendeződéssel kialakított P-membránok felülete lehet sík, görbült, hengeres vagy hólyagos formájú. Az 1. és 2. példa szerint készített P-membránok felülete lényegében véve sík.

A 10. és 11. ábrán az 1. és 2. példa szerint előállított szerkezetek olyan változatát mutatjuk be, ahol a 20' P-membránok hólyagos formájúak.

A 12. ábra a 2. példa szerint előállított szerkezet egy további olyan változatát ábrázolja, ahol sík és hólyagos formájú 20 és 20' P-membránokat alkalmaztunk. A hólyagos P-membránokat főleg a 21 mikroszűrő felületére juttatjuk.

A P-membránok térhálósítására néhány további példát adunk meg az alábbiakban:

– Hexametilén-diizocianát

a P-membránokkal előnyösen az aminocsoportjaival reagál, majd miután ezek telítődtek, a hidroxilcsoportokkal, így mindkét funkció csoporton keresztül kialakuló intermolekuláris térhálósodás következik be. A hexametilén-diizocianátot például 1%-os oldatban alkalmazzuk 5%-os tetrahydrofuránnal (trietanol-amin-hidroklorid, pH = 8,0). A reakcióidő 20 °C-on például 4 óra.

N,N'-Dijód-acetil-hexametilén-diamin

a P-membránok szulfhidrilcsoportjait támadja, ahogyan más bifunkcionális alkil-halogenidek, megfelelő reakciókörülmények között azonban az aminocsoportokkal is reagál. Semleges vagy enyhén alkális közegben azonban ez a térhálósító szer a szulfhidrilcsoportokra specifikus. Térhálósításra az N,N'-dijód-acetil-hexametilén-diamint előnyösen 0,5%-os oldat (0,1 mól/l-es nátrium-acetát-pufferben, pH = 7,2) formájában alkalmazzuk. A reakcióidő 4 °C-on 3 óra.

– 1-Etil-3-[3-(dimetil-amino)-propil]-karbodi-

mid-hidroklorid (EDC)

A karbodiimidek, mint pl. az EDC savas közegben a P-membránok karboxil-, szulfhidril- és hidroxilcsoportjaival reagálnak. A szulfhidrilcsoportokat, ha nem akarjuk, hogy részt vegyenek a reakcióban, előzőleg védeni kell. Ha a karboxilcsoportokat EDC-vel blokkoljuk, a P-membránok pK értéke a lúgos tartományba tolódik. Desztillált vízzel készült 0,1 mól/l-es EDC-oldat (0,02 mól/l NaOH, pH = 8,0) reakcióideje szobahőmérsékleten 18 óra.

Az alábbiakban példaképpen felsorolunk néhány olyan idegen molekulát, amelyek a P-membránok protein molekuláihoz vagy proteint tartalmazó molekuláihoz adagolhatók, a térhálósított P-membránok pórusméretének szabályozása céljából:

– A porózus hordozóra, pl. mikroszűrőre lerakódott P-membránokra polikation formájú ferritin-oldatot (5 µg polikation formájú ferritin 1 ml vízben) rétegzünk, és 20 °C-on 5 percig inkubáljuk. Elektronmikroszkóppal megállapítható, hogy ilyen körülmények között minden protein molekulához vagy proteint tartalmazó molekulához egy ferritin molekula kapcsolódik elektrosztatikus kölcsönhatással. Az 1. példában ismertetetthez hasonlóan végzett utólagos glutaraldehides térhálósítással a ferritin molekulákat azután kovalensen kapcsoljuk a P-membránokhoz.

– A hordozóra lerakódott P-membránokra 1%-os ozmium-tetroxid-oldatot rétegzünk, és 20 °C-on 30 percig inkubáljuk. Ezután az oldat fölöslegét kimossuk, elektronmikroszkópiásan és röntgensugár mikroanalízissel megállapítható, hogy az ozmium kémiaiilag kötődött a P-membránokhoz. A P-membránok térhálósítását azután az 1. példa szerinti módon végezzük.

– A hordozóra lerakódott P-membránokat olyan bifunkcionális térhálósítószerekkel kezeljük, amely a P-membránok pórusméretének mérettartományába eső méretű hidakat hoz létre. A különböző híd hosszúságoknak megfelelően a következő bifunkcionális térhálósítószerek jöhetnek szóba:

– tartaril-di-(glicil-azid) (TDGA): 1,3 nm híd-hossz,

– tartaril-di-(ε-amino-kaprol-azid) (TDCA): 2,3 nm híd-hossz,

– bisz-metil-3,8-diazo-4,7-dioxo-5,5-dihidroxi-dokán-bisimidát (DEBE): 1,4 nm híd-hossz,

– bisz-metil-4,9-diazo-5,8-dioxo-6,7-dihidroxi-dokán-bisimidát (DOBE): 1,7 nm híd-hossz.

– a TDGA-val, TDCA-val, DEBE-vel vagy DOBE-vel végzett reakció (0,01 mól/l desztillált vízben, 1 mól/l trietanol-aminnal pH = 8,0) 4 °C-on egy óra hosszat vagy 20 °C-on 30 percig tart, majd a térhálósítást az 1. példa szerinti módon végezzük.

3. példa

Ebben a példában a találmány szerinti megoldás egy olyan változatát mutatjuk be, amely szerint nagyobb, 100 µm dimenziótartományba eső felülettel rendelkező réteget hozunk létre, amely egyrétegű P-membránból áll. Ehhez az 1. példa szerinti módon *Bacillus stearothermophilus* 3c/NRS 1536 sejtek burkából P-membrán-szuszenziót készítünk. Ennek a bacillusnak a sejtburkában levő S-rétegnek

a sejt külseje felé eső felülete elektromosan semleges, ahol az S-réteget alkotó proteint tartalmazó molekulák (glikoproteinek) szénhidrát-maradéakai helyezkednek el, míg az S-réteg másik felülete negatív eredő töltéssel rendelkezik. A P-membrán-oldat tehát az oldat felületén szabad proteint tartalmazó molekulákat is tartalmaz. Egy különösen sima felületű mikroszűrőt — ilyet alkalmaztunk az 1. példa szerint is — az egyik felületén Alcian Blue-val (0,1% desztillált vízben) kezelünk, és megszártjuk. Az Alcian Blue semleges közegben pozitív felületi töltést hoz létre a mikroszűrő felületén a P-membrán-oldatot ezután enyhe keverés közben fölviesszük a mikroszűrőre. Ezután a pozitív felületi töltés hatására a mikroszűrő felületének bizonyos részein a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák P-membránokká történő önrendeződése következik be még az oldatban, és egyrészt a P-membránok negatívan töltött oldala a pozitívan töltött mikroszűrő-felülethez kapcsolódik, másrészt a szuszpenzióban levő P-membránok, amelyek felületének maximális mérete rendszerint a 10 μm tartományban van, negatívan töltött oldalukkal a mikroszűrő felületének még üres részeihez kapcsolódnak. Az így kialakított P-membrán réteget térhálósítással stabilizáljuk, az 1. példában ismertetetthez hasonló módon.

A 13. ábra az így kialakított szerkezet részét ábrázolja, amely szintén használható ultraszűrő membránként a 21 mikroszűrővel, továbbá szilárd — folyékony fázisú áron önrendeződéssel kialakított P-membránt, amely nagyobb felületmérettel rendelkezik. Ultraszűrőként alkalmazva az ilyen szerkezet a visszatartási jellemzőkben olyan éles molekulatömeg elválasztást mutat, mint az 1. példa szerinti szerkezet.

Nagy általánosságban elmondható, hogy a találmány szerinti eljárásban a P-membránok hordozófelületeként más anyagokat is alkalmazhatunk, így például peptidoglikán tartalmú rétegeket, pszeu-domurein-, lipid-, polimer-rétegeket, géleket stb. Ha ezeknek a rétegeknek az összefüggő pórusai nagyobb méretekkel rendelkeznek, mint a P-membránok, akkor ezek a P-membránok permanens hordozójaként szolgálhatnak, vagy segédretek lehetnek, amelyeket a P-membrán-réteg kialakítása után eltávolítunk, például szerves oldószer segítségével. A segédretegről elválasztott P-membrán-rétegeket azután térhálósítás után olyan végső hordozóra vihetjük fel, amely jobban megfelel a találmány szerinti szerkezet alkalmazásához. Ehhez a hordozóhoz szintén kovalensen kapcsolhatjuk a P-membránokat. A „hordozó felület felületi tulajdonságai, mint például hidrofíl vagy hidrofób jellege és/vagy fajlagos eredő töltése és a töltés-eloszlás a „hordozó felületen lehetővé teszi — a 3. példában bemutatottakhoz hasonlóan —, hogy a P-membránok és/vagy a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák orientálva kötődjenek a „hordozó felületen, és így elősegítik a P-membrán-réteg kialakulását. Az ilyen felületi tulajdonságoknak olyanoknak kell lenniük, hogy — többek között — a „hordozó felület és a protein molekulák, illetve proteint tartalmazó molekulák közötti kötőerők elég gyengék legyenek ahhoz, hogy ne

akadályozzák az említett molekulák P-membránokká történő rendeződését, ami a hordozó felületen megy végbe. Ez fontos olyan P-membránok képződése szempontjából, amelyek kevés hibahe-lyet tartalmazhatnak a rácsszerkezetben.

A fenti példák és változataik olyan P-membrán-szerkezeteket ismertetnek, amelyekben a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák egy rétegben kapcsolódnak egymáshoz. A 14. ábra a találmány szerinti megoldásnak egy további olyan változatát ábrázolja, ahol porózus mikroszűrőre — például olyanra, mint a 2. példában — olyan P-membrán-réteget viszünk fel, amelyben a 22 P-membránokból álló réteg protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák két rétegéből — 23 és 23' rétegből — áll, amelyek egymásnak tükröképei. A két réteg eltérő felületi topográfiával rendelkezik a belső és külső felületen, és a két réteget kis energiájú kapcsolat tartja össze. Emellett a két réteget kovalensen egymáshoz, illetve a 22 P-membránokat a 21 mikroszűrőhöz kapcsolhatjuk.

A találmány szerinti megoldás néhány további, kereskedelmi szempontból fontos előnyös alkalmazási formája

A találmány szerinti szerkezetek ultraszűrő membránként történő alkalmazás mellett felhasználhatók gáz-elválasztó berendezések és ioncserélő berendezések elválasztószerkezeteként is.

További előnyös alkalmazási forma az, ahol a találmány szerinti szerkezet más, a szerkezet P-membránjainak pórusain elterülő félígáteresztő membránok hordozójaként szolgál. Ilyen félígáteresztő membránok lehetnek például hiperszűrő membránok, különösen mono- és bimolekuláris hiperszűrő membránok. Az ilyen hiperszűrő membránok, különösen a felületaktív és felületaktív-szerű lipoid hiperszűrő membránok általában csupán 2–6 nm vastagok és különösen törékenyek. Hiperszűrő membránokat különösen tengervíz-sótalanításra, szennyvíz-kezelésre, szerves folyadékelegyek elválasztására használnak, különösen szénhidrogének elválasztására bepárlással vagy optikai antipódok elválasztására királis elválasztó rétegeken.

A 15. ábra egy olyan, találmány szerinti szerkezet részletét ábrázolja, amelyet a 2. példa szerinti módon állítottunk elő (lásd 8. ábra), és amelynek 24 P-membrán-rétegre 25 hiperszűrő membránt vitünk fel. A találmány szerinti szerkezetek hiperszűrő membránok hordozójaként történő alkalmazásakor a szűrő, illetve elválasztó hatást lényegében véve a hiperszűrő membrán határozza meg. A 24 P-membrán-réteg hibái, például kisebb lyukak vagy hasonlóak nem szükségszerűen zavarhatnak. A térhálós P-membrán-réteg különösen alkalmas hiperszűrő membránok hordozójaként, mivel megfelelő mechanikai stabilitással rendelkezik ahhoz, hogy a szokásos ultraszűrő membránok hordozó rétegeinek pórusain, illetve durva felületein elterülve vagy azokat feltöltve a törékeny hiperszűrő membránok, különösen a térhálós monoretegek egyenletesen leválaszthatók legyenek rajta. Ezen kívül a P-membrán-rétegek megfelelően vékonyak és porózusak ahhoz, hogy a hiperszűrő membránokkal kombinálva megfelelően nagy átfolyási arányt biztosítsanak.

Különösen sima P-membrán-réteget kapunk a

következő módszerrel. Az 1. példában ismertetett módon, P-membrán-réteget hozunk létre és térhálósítunk különösen sima polikarbonát hordozón. A polikarbonátot ezután kloroformmal feloldjuk, így 5–100 nm vastagságú kohéziós P-membrán-réteget kapunk, amelyet azután eredeti, nagyon sima felületével felfelé egy másik porózus hordozóra visszük fel. A P-membrán-rétegnek erre a nagyon sima felületére visszük fel azután a hiperszűrő membránt és alkalmas módon térhálósítjuk a P-membrán-réteggel.

P-membrán-réteget és hiperszűrő membránt tartalmazó „vegyületek szintén előállíthatók úgy, hogy hiperszűrő membránon, amely „támasztó felület-ként szolgáló, meghatározott eredő töltéssel rendelkező hiperszűrő membránon — például a 3. példában leírtakhoz hasonló módon — P-membrán-réteget alakítunk ki, és az utóbbit alkalmas módon térhálósítjuk a hiperszűrő membránnal.

A hiperszűrő membrán és a P-membrán-réteg közötti kovalens keresztkötések kialakítására mindenek előtt azok a reakciók jöhetnek szóba, amelyekben karboxil-, hidroxil-, amino- és szulfhidril-csoportok vesznek részt. Glikoprotein P-membránok és cukor-maradékokat tartalmazó egyrétegű hiperszűrő membránok között szénhidrát-kémiai reakciók is alkalmazhatók.

P-membrán-réteget és hiperszűrő membránt tartalmazó vegyületek maguk is szolgálhatnak „támasztó felület-ként második hiperszűrő membrán vagy P-membrán-réteg kialakításához. Az ilyen sokrétegű vegyületek szintén térhálósíthatók az egyes rétegeken belül vagy a rétegek között kovalens kötésekkel. Két hiperszűrő membránt és azok két oldalán P-membránt tartalmazó szendvics vegyületek közé idegen molekulák, például enzimek vagy töltéshordozók iktathatók be, amelyek alapvetően befolyásolják az ilyen szendvics vegyületek viselkedését.

Az előbb ismertetett vegyületek, illetve többretegű vegyületek előnyösen zárt hólyagocskák formájában is kialakíthatók, ilyenkor egy hiperszűrő membránból vagy P-membrán-rétegből álló „kiindulási hólyagocskából indulunk ki.

A találmány szerinti szerkezetek előnyösen alkalmazhatók továbbá oszlopkromatográfiában elválasztható oszlopként. A 16. ábra egy ilyen 26 kromatografáló oszlop részletét ábrázolja sematikusán, amelybe hólyagocskák formájú, alkalmas módon intra- vagy intermolekulárisan térhálósított 20' P-membránok vannak töltve, ahol a hólyagocskák belső átmérője 1–3 µm-es. Az elválasztandó anyagokat az oszlop tetejére tápláljuk. Miután az anyagot átengedtük és eluáltuk, a nagyobb molekulák előbb megjelennek a kromatografáló oszlop alján, mint a kisebb molekulák, és a kromatogrammban éles frakcionálás mutatkozik a P-membránok pórusméretének tartományában.

Egy előnyös változat szerint az elválasztó oszlop átfolyási aránya növelhető úgy, hogy a 20' P-membrán-hólyagocskákat kovalens kötéssel morfológiai- meg meghatározott és kémiai- stabil aggregátumokká kombináljuk. Ezeket az aggregátumokat úgy állítjuk elő, hogy P-membrán-hólyagocskák sűrű üledékét vékony rétegben gyorsfagyasztjuk, fo-

lyékony nitrogénben kis fragmensekké porlasztjuk, majd fagyasztva, pl. –80 °C-on metanol és glutáraldehid elegyével kezeljük, amikor a térhálósodás a glutáraldehid segítségével következik be. Az így kapott aggregátumokat azután tovább aprítjuk, méret szerint osztályozzuk, és kiválasztjuk azokat a méreteket, amelyeket az elválasztó oszlop töltetként fogunk használni. Emellett az aggregátumokat az oszlopba történő töltés előtt vagy után pufferbe vihetjük és/vagy az aggregátumokon kémiai vagy enzimatisz átalakítást hajthatunk végre.

A találmány szerinti szerkezeteket továbbá a legkülönbözőbb anyagok burkolóanyagaként használhatjuk. Ez a burkolóanyag térhálós P-membrán-réteg lehet, amelyet ismertetett módon állítunk elő segédretegen vagy „támasztó felületen, majd a segédreteget alkalmas módon eltávolítjuk. Az így kialakított filmek előnyösen alkalmazhatók anyagok csomagolására, és önmagukban megvan az az előnyük, hogy biológiailag lebonthatók. A lebomlás sebessége befolyásolható a térhálósítás típusával és fokával.

Az ilyen típusú P-membrán-rétegek orális adagolásra szánt gyógyszerkészítmények kapszulázására is alkalmazhatók, ilyenkor a hatóanyag kiszabadulása az emésztő traktus meghatározott részén bekövetkező proteolitikus bomlás hatására megy végbe. A burkoló membrán P-membrán-rétegének szelektív kémiai átalakításával a lebomlás sebessége és így a hatóanyag kiszabadulásának ideje meghatározható. A kapszula tartalma már a P-membrán-réteg elbomlása előtt is kiszabadulhat, ilyenkor a pórusméret a meghatározó. Ezen kívül a pH is befolyásolhatja a kiszabadulást.

A példákban alkalmazott *Bacillus stearothermophilus* 3c/NRS 1536 és *Bacillus stearothermophilus* pV 72 mikroorganizmusok az Österreichisches Zuckerforschungsinstitut, A-2286 Fuchsenbigl, Niederösterreich típusgyűjteményében vannak letétbe helyezve.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Legalább egy, összefüggő pórusokkal rendelkező membránból álló szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy a sík, görbült, hengeres vagy hólyagocskákat képező felülettel rendelkező membránok egymás mellett, egymáshoz kapcsolódó és kristályrács-szerkezetnek megfelelően elhelyezkedő, *Bacillus* sejtfalból eredő protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák — ahol adott esetben a reaktív csoportokhoz idegen csoportok csatlakoznak — legalább egy rétegből állnak, ahol a rétegben a rácsszerkezetnek megfelelően összefüggő pórusok maradnak szabadon a molekulák között, és ahol a membránok egy megfelelő porózus hordozóanyaghoz vannak kötve vagy azzal vannak kombinálva vagy egy meg nem támasztott filmbe vannak rögzítve.

2. Az 1. igénypont szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, amelyekben a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák kristályrács-szerkezetnek megfelelően, egy rétegben egymás mellett, egymáshoz kapcsolódva helyezkednek el.

3. Az 1. igénypont szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, amelyekben a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák kristályrács-szerkezetnek megfelelően, több egymás melletti rétegben, egymáshoz kapcsolódva helyezkednek el.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy a réteg(ek)ben egymáshoz kovalens kötésekkel kapcsolódó, egymás melletti protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat tartalmaz.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy a protein molekulák vagy proteintartalmú molekulák reaktív csoportjaihoz kapcsolódó idegen csoportok mono- és/vagy bifunkcionális molekulák csoportjai.

6. Az 5. igénypont szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy reaktív csoportként karboxil- és/vagy amino- és/vagy szulfhidril- és/vagy hidroxilcsoportokat tartalmaz.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy protein molekulákból vagy proteint tartalmazó molekulákból álló membránokat tartalmaz, ahol az említett molekulák ugyanazon reaktív helyeihez idegen molekulák kapcsolódnak.

8. Az 5–7. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, amelyeknek protein molekulái vagy proteint tartalmazó molekulái bifunkcionális idegen molekulákon keresztül intramolekuláris kovalens keresztkötésekkel vannak ellátva.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, amelyeken az ugyanahhoz a membránhoz vagy két egymás melletti vagy szomszédos membránhoz tartozó, egymás melletti vagy szomszédos protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák kovalens keresztkötésekkel vannak egymáshoz kapcsolva, célszerűen bifunkcionális idegen molekulákon keresztül.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, amelyeken a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák keresztkötésekkel a hordozó anyagához vannak kapcsolva, adott esetben bifunkcionális idegen molekulákon keresztül.

11. A 6–10. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membráno-

kat tartalmaz, ahol az idegen molekulák a membránoknak a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák közötti pórusaiba bejutnak.

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, amelyekben a protein molekulák vagy proteint tartalmazó molekulák és/vagy az azokhoz kapcsolódó idegen molekulák olyan disszociálható csoportokat tartalmaznak, amelyek a szerkezet működési körülményei között disszociálnak, és előre meghatározott elektromos töltést vesznek fel.

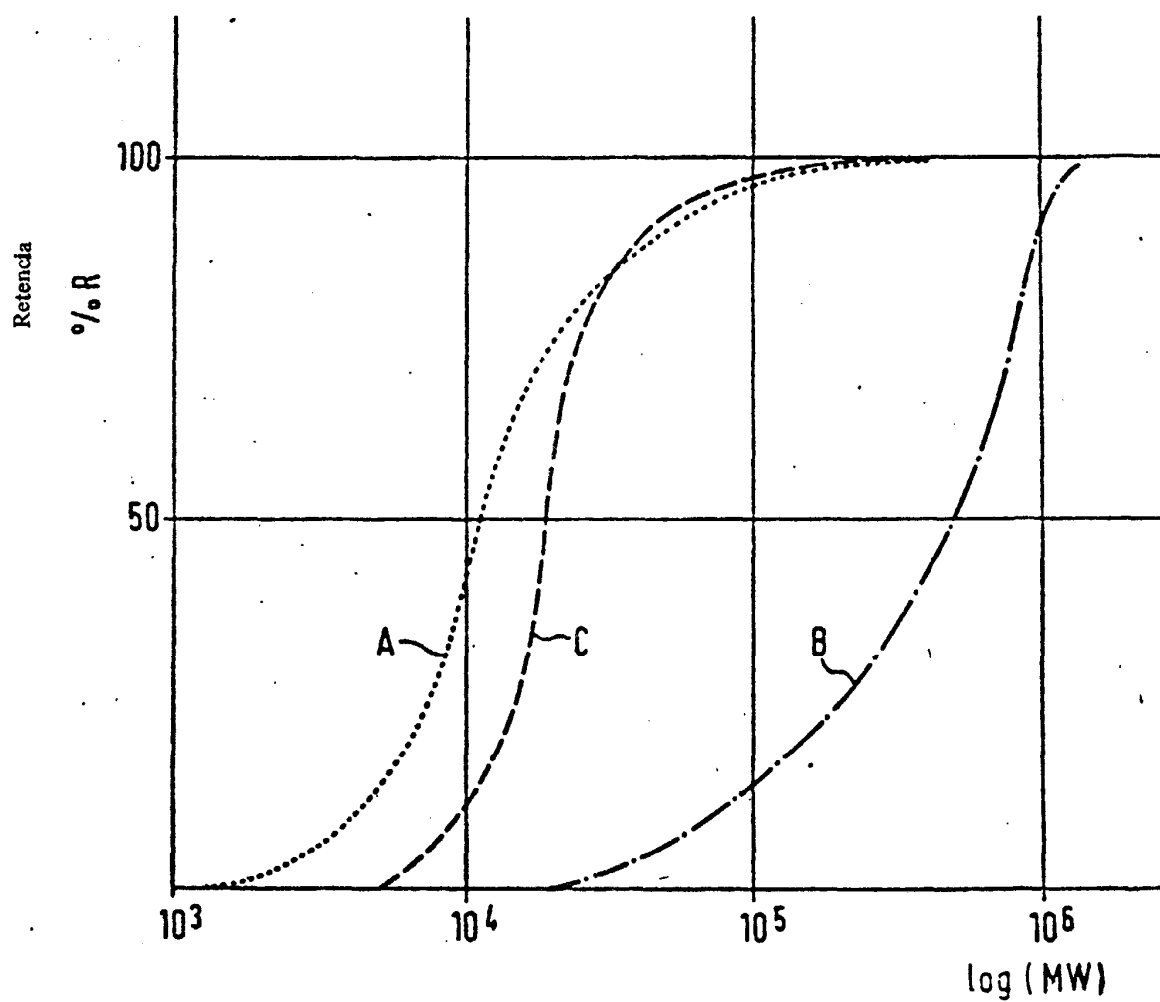
13. A 12. igénypont szerinti szerkezet, *azzal jellemezve*, hogy olyan membránokat tartalmaz, ahol az egyes membránok két párhuzamos oldala a disszociálható csoportok típusára és/vagy eloszlására nézve aszimmetrikus.

14. Eljárás az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti membrán-szerkezet előállítására, *azzal jellemezve*, hogy *Bacillus* sejtburkokból protein molekulákat vagy proteint tartalmazó molekulákat vagy ilyen egymáshoz kapcsolódó molekulákból álló réteg-fragmenseket állítunk elő, ezeket kaotrópikus szert, előnyösen guanidin-hidrokloridot vagy karbamidot és/vagy felületaktív anyagokat tartalmazó közeggel oldatba, illetve szuszpenzióba visszük, majd a kaotrópikus szerek és/vagy felületaktív anyagok koncentrációját csökkentjük és/vagy a pH-értéket 7,0-ról legfeljebb 13,0 értékre, előnyösen 9,5 értékre emeljük vagy pedig 7,0-ról 1,0 értékre, előnyösen legalább 2,5 értékre csökkentjük, és az így kapott membránt kívánt esetben porózus hordozóhoz kötjük.

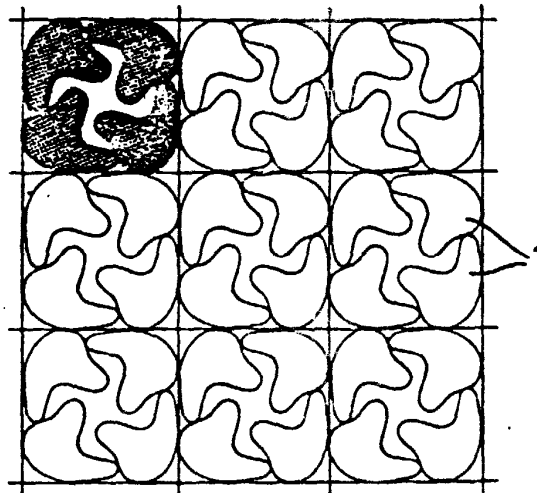
15. A 14. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a kaotrópikus szerek és/vagy felületaktív anyagok koncentrációjának csökkentését és/vagy a pH-érték változtatását dialízissel végezzük.

16. A 14. vagy 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a proteia molekulák vagy a proteint tartalmazó molekulák és/vagy réteg-fragmensek rendeződésével minden dimenziójukban legfeljebb 100 μm , előnyösen legfeljebb 15 μm mérettartományba eső membránokat állítunk elő.

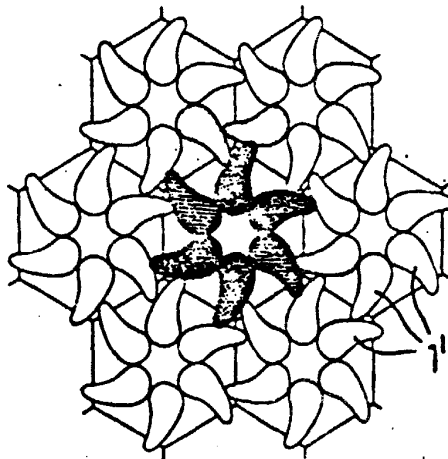
17. A 14–16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az előállított membránokat ülepítéssel porózus hordozóra, illetve hordozóba juttatjuk.



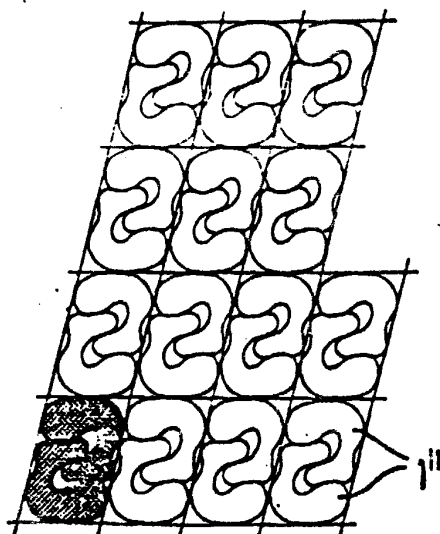
1. ábra



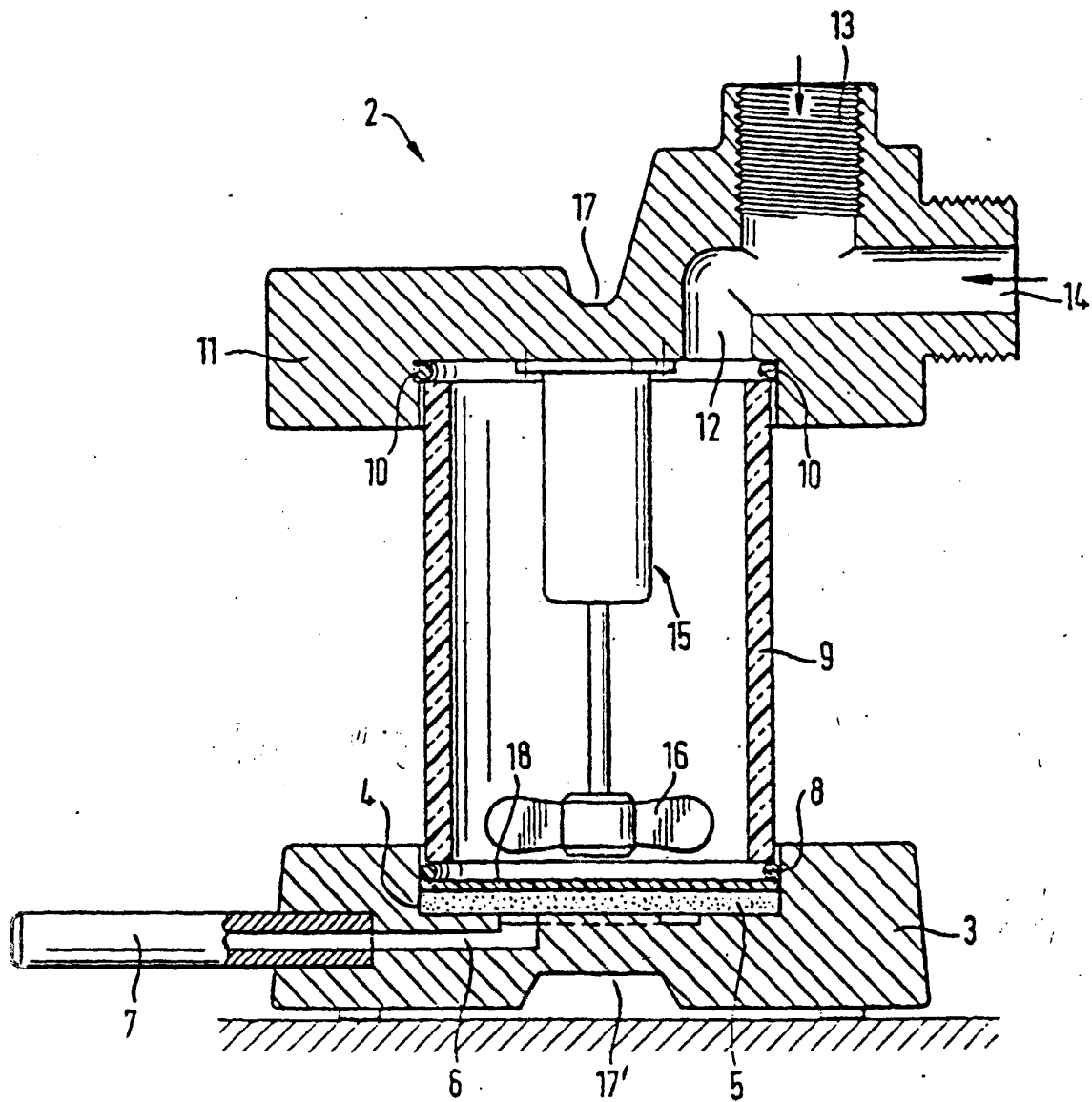
2. ábra



3. ábra

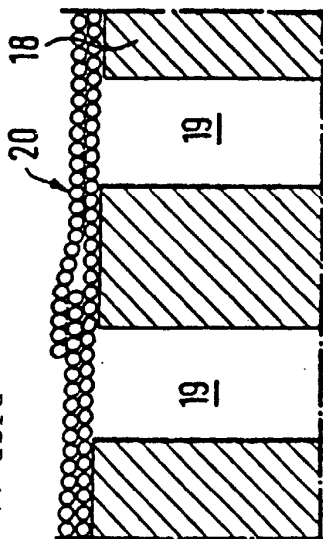


4. ábra

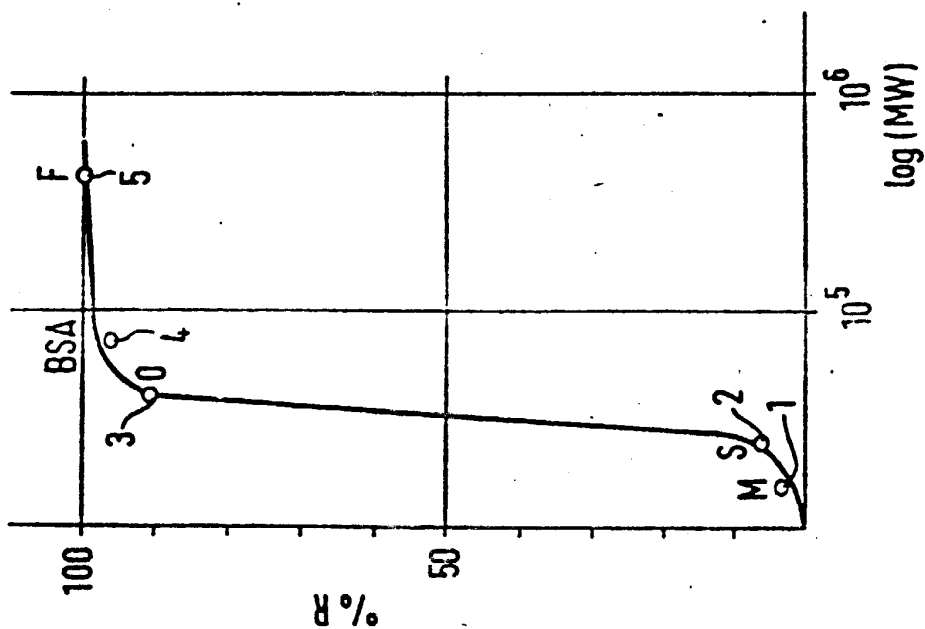
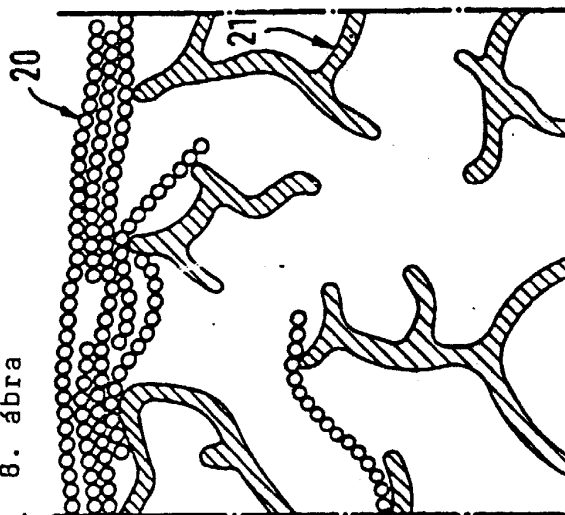


5. ábra

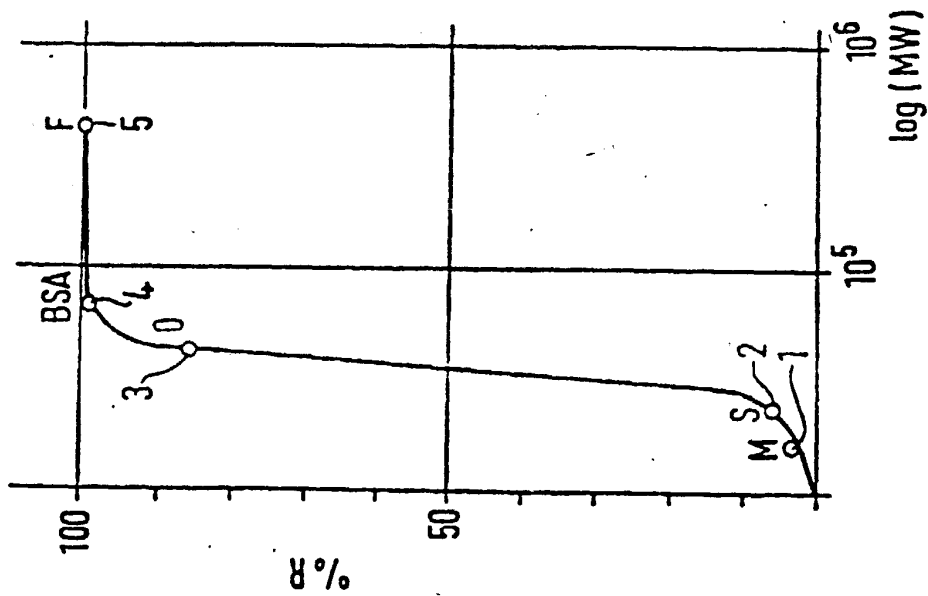
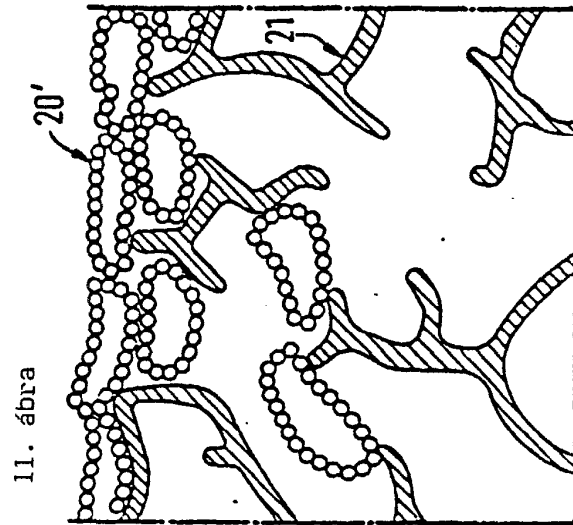
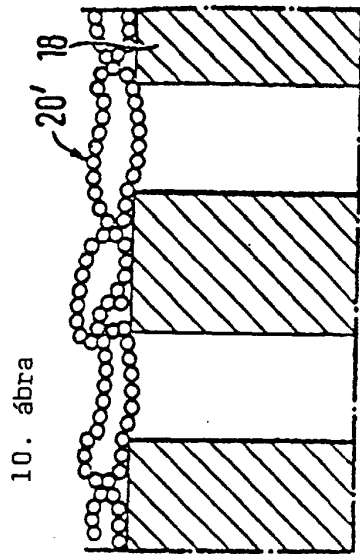
7. ábra

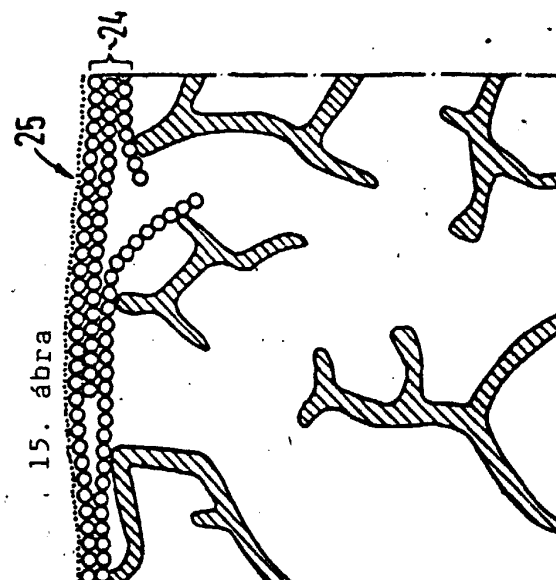
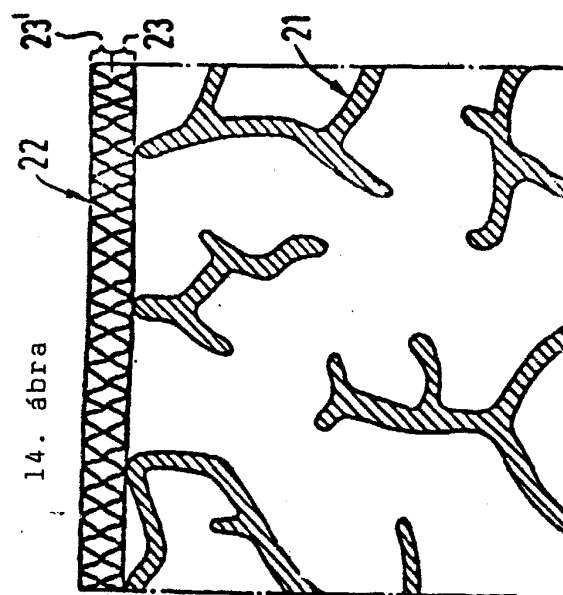
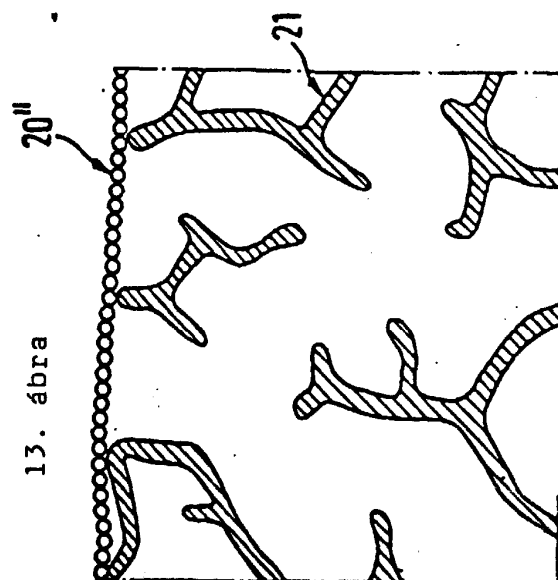
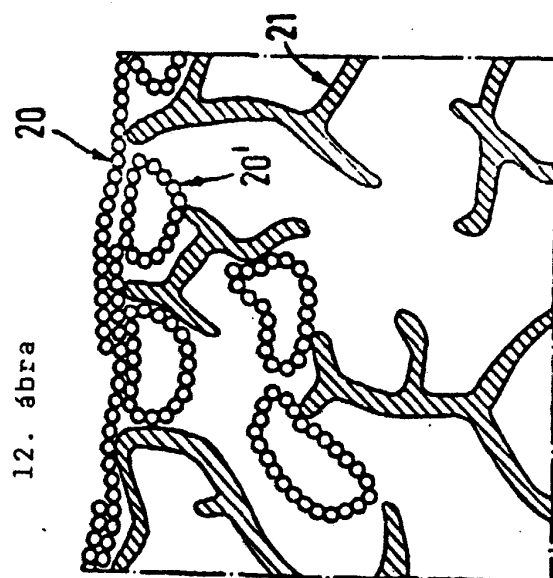


8. ábra



6. ábra





16. ábra

