

PE Mérnöki Kar Őszi Tudományos Diákköri Konferencia'18



A kiadványt összeállította:

Egedy Attila, Varga Tamás és Gyurik Livia

ISBN 978-963-396-120-9

A konferencia támogatói

Emberi Erőforrások Minisztériuma – Nemzeti Tehetség Program: NTP-HHTDK-18-0015

Pannon Egyetem, Mérnöki Kar



A konferencia szervezői

Pannon Egyetem

Mérnöki Kar

KTDT elnök:

Dr. Varga Tamás

egyetemi docens

KTDT elnök

Folyamatmérnöki Intézeti Tanszék

Pannon Egyetem

Mérnöki Kar

KTDT titkár:

Dr. Egedy Attila

egyetemi adjunktus

KTDT titkár

Folyamatmérnöki Intézeti Tanszék

Tudományos bizottság

Dr. Balogh Szabolcs

Dr. Egedy Attila

Dr. Gubicza László

Dr. Hodai Zoltán

Dr. Horváth Ottó

Dr. Járvas Gábor

Dr. Kovács Kristóf

Dr. Padisák Judit

Dr. Somogyi Viola

Soósné Dr. Balczár Ida

Dr. Stenger-Kovács Csilla

Dr. Tímár Imre

Dr. Tóth Imre

Dr. Varga Csilla

Dr. Zsirka Balázs

Bobek Janka

Boros Adrienn

Borza Beáta

Nagy Enikő

Simon-Stóger Lilla

Előszó

Napjaink rohanó világában egyre inkább fontosságot nyer az utánpótlás-nevelés, legyen szó bármilyen területről. Nincs ez másként a tudományos utánpótlás-nevelés esetén sem, amelynek az elmúlt időszakban jelentős kihívásokkal kellett, hogy megbirkózzon. A Tudományos Diákköri (TDK) mozgalom egyik alapvető célja, hogy lehetőséget biztosítson az olyan tehetséges, elhivatott, munkájukra igényes fiataloknak, akiket vonz az ismeretlen, amely megismerése nem megijeszti, mint inkább bátorítja őket.

A TDK mozgalomban való részvétel már az egyetemi tanulmányokat megelőzően, a középiskolában is elkezdődhet. Az elért eredmények bemutatására a Mérnöki Kar minden félévben konferenciát szervez, ahol mind az alap-, mind az alkalmazott tudományokhoz kapcsolódóan lehetőségük van a résztvevőknek az elért eredményeik bemutatására. A bemutatott tudományos munkákat kutatási területeiken elismert kutatókból álló, tudományos bizottságok értékelik és javaslatot tesznek az országos konferencián való részvételre. A Mérnöki Karon hagyományosan a Biológia, Fizika Földtudományok és Matematika, a Kémiai és Vegyipari valamint a Műszaki Tudományi szekciókhoz tartozó tudományterületeken.

2018-ban azért hívtuk életre ezt a kötetet, hogy a Karon végzett TDK munkák közül, a legkiemelkedőbbeket bemutassuk és ezzel is kedvet csinálva azon hallgatóknak, akik szívesen végeznének ilyen munkát, de nem feltétlen tudják, hogy mi is az, ami leginkább érdekelné őket.

Kötetünk két fő részre bontható. Az első felében a 2018. november 21-én megtartott Intézményi TDK Konferencián bemutatott pályamunkák rövid összefoglalóit mutatjuk be, míg a második felében az első helyezett pályamunkák közül azokat, amelyek szerzője ehhez hozzájárulását adta.

Ezúton is szeretnénk megköszönni a Témavezetőknek, Bírálóknak, Bizottsági Tagoknak a munkát, valamint természetesen a Hallgatóknak az elhivatottságot, lelkesedést és alázatot, ami ahhoz vezetett, hogy tudományos kutatást végezzenek, és annak eredményeit ilyen magas színvonalon bemutassák.

Az olvasónak pedig jó szórakozást kívánunk. Reméljük, hogy kötetünk inspirációul szolgál a jövő kutatói számára.

A Szerkesztők

Tartalomjegyzék

1. Konferencián bemutatott pályamunkák összefoglalói	5
Biológia Szekció	6
Biológia tagozat	6
Kémiai és Vegyipari Szekció	12
Kémiai és Vegyipari I. tagozat	12
Kémiai és Vegyipari II. tagozat	19
Műszaki Tudományi Szekció	26
Műszaki Tudományi I. tagozat	26
Műszaki Tudományi II. tagozat	31
Névjegyzék	37
 2. Konferencián első helyezett pályaművek	 38
Czédli Diána: Mesterséges és természetes hidroxipapatit adalékokból előállított bioüvegkerámiák vizsgálata	39
Fonyó Máté: Módosított TiO ₂ fotokatalizátorok előállítása és aktivitásuk vizsgálata a látható fény tartományában	74
Füvesi Balázs: Forgócellás adagoló GPU-val gyorsított DEM szimulációja	140
Kovács Noémi: A glikoproteinek diagnosztikai analízise során használt peptid-N glikozidáz F enzim termeltetése és tisztítása	177
Szekér Patrik: Arzén(III) megkötésére kifejlesztett flagelláris fehérjék létrehozása és jellemzése bioszenzorikai alkalmazásra	230
Takács Piroska: Biogáz előállítása elektrofermentációs úton	291
Tálosi Gréta: Útépitési kötőanyagok minőségjavítási lehetőségeinek vizsgálata	315
Viola Gergely: Bicikli-ABS működésének vizsgálata és fékteljesítményének mérése saját tervezésű tesztpadon	352

1. Konferencián bemutatott pályamunkák összefoglalói

Biológia szekció

Biológia tagozat

Helyezés	Cím	Szerzők	Témavezető
I.	Urbanizáció hatása vízfolyások halközösségeinek sokféleségére	Kern Bernadett	Dr. Erős Tibor, Dr. Seress Gábor
II.	Assessment of the Physical-Chemical Water Quality Parameter of Lake Balaton	Mesfin Alemneh Alameraw	Dr. Juzsakova Tatjana, Kovács Zsófia
I.	Proteomic changes in the human entorhinal cortex during Alzheimer's disease	Szeitz Beáta	Dr. Rezeli Melinda, Erika Velásquez, Horváth Krisztián
II.	Mágneses nanoszálak előállítás magnetit-kötő flagelláris filamentum templátok alkalmazásával	Papp Lejla	Dr. Vonderviszt Ferenc; Husztiné Nagy Georgina
I.	A glikoproteinek diagnosztikai analízise során használt peptid-N glikozidáz F enzim termeltetése és tisztítása	Kovács Noémi	Dr. Jankovics Hajnalka

Bíráló bizottság

Dr. Padisák Judit

Dr. Stenger-Kovács Csilla

Dr. Járvas Gábor

Borza Beáta

Urbanizáció hatása vízfolyások halközösségeinek sokféleségére

*Készítette: Kern Bernadett
Környezettudomány mesterszak
Mérnöki Kar, Környezettudományi Intézet, Limnológia Tanszék*

Témavezető: Dr. Erős Tibor, Dr. Seress Gábor

A természetes élőhelyek nagyfokú átalakítása agrár, és urbán területekké nem csupán a szárazföldi élővilág sokféleségét befolyásolja, hanem nagymértékben kihat a vízfolyások biológiai sokféleségére és ökológiai állapotára is. Hiányos ismeretekkel rendelkezünk azonban arról, hogy a tájhasználatban történő nagy léptékű változások miként és milyen mértékben befolyásolják az élőlényközösségek szerkezetét vízfolyásokban. Ezen ismeretek hiánya pedig jelentős mértékben korlátozza az ökológiai állapotot javító intézkedések hatékony megvalósítását.

Kutatásunk célja, hogy feltárjuk, milyen módon befolyásolja a demográfiai növekedéssel együtt járó urbanizáció a vízfolyások halközösségeinek összetételét és a vízfolyások ökológiai állapotát a halak szerkezeti és funkcionális változói alapján. Ennek érdekében meghatározzuk, hogy mi jellemzi a halállomány szerkezetét és biológiai integritását (az ökológiai állapotot indikáló halbiológiai index értékét) urbán területeken áthaladó vízfolyásszakaszokon. Elemzéseink rávilágítanak arra, hogy milyen hatása van az urbanizációval együtt járó tájátalakításnak az élőhely fizikai és kémiai jellemvonásaira és ezen keresztül a halközösségek szerkezetére.

Assessment of the Physical-Chemical Water Quality Parameter of Lake Balaton

Student name: Mesfin Alameraw

Environmental Engineering MSc

Institute of Environmental Engineering, Faculty of Engineering,

Supervisors: Dr. Tatjana Juzsakova, Dr. Zsófia Kovács

In order to retain the good ecological status of the surface water of the Lake Balaton, the evaluation of the surface water quality parameters needs to be done at certain intervals with the goal to follow the water quality changes in the function of time. When the surface water has severe exposure due to human activities, either from recreational or economic activity the vulnerability becomes high and the surface water quality is compromised in significant extent. In the case of Lake Balaton, which is a shallow lake, and since it has been being used for recreational purpose by local residents as well as international tourists, there are plenty of activities which can cause the disturbance of the water dynamics. As it has been discussed in the literature the quality of the water has exhibited an improvement regarding the physical-chemical parameters during the recent years. In this study, the physical-chemical parameters of the water of the Lake Balaton have been assessed and the results have been compared with the previous year data and limit values. Fifteen sampling sites have been selected around the Lake, which have been considered as the representative for the waterbody. The sample collection as well as the site measurements have been done according to Hungarian National Standard (MSZ ISO 5667-4:1995). The following parameters have been measured at site by using Ponsel Odeon advance digital meter: pH, turbidity, electric conductivity, temperature, dissolved oxygen content and oxygen saturation. The following measurements have been carried out at the laboratory of the Institute of Environmental Engineering, University of Pannonia, Veszprém such as BOD, COD, NH_4^+ , NO_2^- , PO_4^- , TP and TOC/DOC. The comparisons of the measured parameters with limit values have been accomplished and the aquatic environment assessment procedure was implemented to assess the entire water body of Lake Balaton for 2018 year.

Keywords: Surface Water Quality, Lake Balaton, Physical-Chemical Parameters, Aquatic Environment Assessment

A humán entorhinális kéreg proteomikai jellemzése az Alzheimer-kór különböző stádiumaiban

Készítette: Szeitz Beáta

Vegyész mesterszak

Lund University, Faculty of Engineering, Dept. of Biomedical Engineering

Mérnöki Kar, Kémia Intézet, Analitikai Kémia Intézeti Tanszék

Témavezetők: Dr. Rezeli Melinda, Erika Velásquez, Dr. Horváth Krisztián

Az Alzheimer-kór egy gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség, kialakulásának okát és a betegség pontos mechanizmusát a mai napig intenzíven kutatják. Fontos szerepet kap ebben a kutatásban a proteomika tudományterülete. A fehérjekészletben, valamint a fehérjék poszt-transzlációs módosulásában bekövetkező változások vizsgálata révén jobban megérthetjük a betegség során lezajló folyamatokat, valamint potenciális biomarkerek azonosítására nyílik lehetőség.

Munkánk során az Alzheimer-kór korai stádiumában érintett agyterület, az entorhinális kéreg proteomikai analízisét végeztük el. A fehérjék foszforilációjában, valamint a totál proteomban bekövetkező változásokat vizsgáltuk a betegség eltérő stádiumaiban. Összesen 22 humán *post mortem* agyszövet elemzésére került sor, csoportosításuk a Braak-féle felosztás szerint történt (kontroll, Braak I-II, III, IV, V-VI). A mintákat a Humán Agyszövet Bank (Simmelweis Egyetem, Budapest) biztosította számunkra.

A fehérjeextrakciót SDS-tartalmú pufferrel, az emésztést tripszinnel végeztük. A foszfopeptidek szelektív feldúsítása immobilizált fémion-affinitás kromatográfiával történt (Agilent Bravo AssayMap rendszer). A méréseket nano folyadékkromatográfiával csatolt tandem tömegspektrometriával végeztük (Ultimate 3000 nanoLC és Q Exactive HFX MS). A foszfopeptidek tömegspektrometriás analízisére DDA (adatfüggő), a nem foszforilált peptidek analízisére pedig DIA (adatfüggetlen) rögzítési módszert alkalmaztunk. Az automatizált dúsítási protokoll szelektivitását és reprodukálhatóságát technikai ismétlésekkel ellenőriztük.

Az adatok kiértékeléséhez a Proteome Discoverer v2.2, a Spectronaut Pulsar X v12 és a Perseus v1.6.2.2 szoftvereket használtuk. A betegség különböző fázisaiban eltérően expresszálandó fehérjéket azonosítottunk, melyek további vizsgálata a későbbiekben hozzájárulhat az Alzheimer-kór jobb megértéséhez.

Mágneses nanoszálak előállítása magnetit-kötő flagelláris filamentum templátok alkalmazásával

Készítette: Papp Lejla

Biomérnök alapszak

*Mérnöki Kar, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Bio-nanorendszerek
Kutatólaboratórium*

Témavezetők: Dr. Vonderviszt Ferenc, Husztiné Dr. Nagy Georgina

A baktériumok úszóképességét biztosító flagelláris filamentumot a flagellin fehérje több tízezer alegysége építi fel, melynek jellemző tulajdonsága, hogy felszíni doménje szabadon variálható az önszerveződképesség zavarása nélkül. Helyére tetszőleges kötőmotívumok építhetők, és eredményül jól szabályozható tulajdonságú, nagy kötőhely sűrűséggel rendelkező, könnyen kinyerhető fehérje nanoszálakat kapunk.

A mágneses nanokristályoknak jó néhány műszaki és orvostudományi alkalmazása ismert. Számos biológiai rendszerben a nanokristályok mérete és alakja fehérjék és egyéb mechanizmusok által pontosan szabályozva van. A kutatómunka egyik kiinduló gondolata, hogy - e fehérjék mintájára - a flagellin variábilis doménjét mágneses nanorészecskéket kötő motívumokra cserélve, mágneses nanoszálakat hozunk létre.

Munkám során génszabási módszerekkel három különböző magnetitkötő oligopeptidet építettem be a flagellin fehérje felszíni doménjének helyére. A proteinek expresszióját *Salmonella typhimurium* törzsekkel végeztem és vizsgáltam a képződő mutáns flagellin tulajdonságait. A módosítás mind a három variáns esetében pozitív eredményt hozott, a baktériumok képesek voltak hosszú filamentumokat képezni. Ennek megfelelően sötétlátóterű mikroszkóp segítségével és motilitás lemezen is jól úszó egyedeket figyeltem meg. Ezt a módosított baktériumokról készült transzmissziós elektronmikroszkóp felvételek is megerősítették. Próbaexpresszió során is megállapítottam, hogy a flagellin termelése legnagyobb mértékben a sejtek felszínén történik, ezért egyszerűen, viszonylag nagy mennyiségben termeltethető, tisztítható a fehérje.

Mágneses szelekciós eljárással kiválasztottam azt a peptidet, amelyhez a magnetit a legnagyobb affinitással képes kötődni. Mindhárom konstrukciót termelő baktériumot, illetve a belőlük preparált filamentumot transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltam, hogy bizonyítsam a magnetitkötés meglétét vagy hiányát. A vizsgálatok alapján elmondható, hogy az MB1 konstrukció köti leginkább a magnetitet, az MB2 és MB3 jelű peptidek pedig kevésbé. A munka az ERA-CHEMISTRY NN-117642 és a BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017 projektek támogatásával készült.

A glikoproteinek diagnosztikai analízise során használt peptid-N glikozidáz F enzim termeltetése és tisztítása

Készítette: Kovács Noémi

Vegyésmérnök mesterszak

*Mérnöki Kar, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Bio-nanorendszerek
Kutatólaboratórium*

Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka

Az összetett cukrok vagy glikánok strukturális, fizikai és metabolizmusbeli szerepe a biológiai rendszerekben rendkívül jelentős. Egyik fontos csoportjuk az N-glikánok, melyek a fehérjék aszparagin aminosavához kapcsolódnak a proteinek poszttranszlációs módosulását követően. Fontos szerepet töltenek be a sejt-sejt, illetve receptor-ligandum kölcsönhatásokban, mivel befolyásolhatják a fehérjék feltekeredését, illetve biológiai aktivitásukat. Ez utóbbi a fehérjealapú gyógyszerek esetén fontos, hiszen a nem megfelelő cukormintázattal rendelkező készítmények akár egészségkárosodáshoz is vezethetnek. Emellett a glikánok diagnosztikai biomarker szerepe is fontos, mivel a fehérjékhez kötött és a sejtek felszínén található cukrok összetétele, struktúrája bizonyos betegségekre, elváltozásokra specifikus lehet. Egy jelenleg kidolgozás alatt álló diagnosztikai eljárásban a glikánokat enzimek segítségével kisebb egységekké hasítják, majd kapilláris elektroforézissel elválasztják. Az így kapott elektroferogramról minőségi információ nyerhető az adott sejt, fehérje cukorösszetételéről, mintázatáról. Az eljárás első lépése a teljes glikán szerkezet elválasztása a fehérjétől, melyet az aszparaginhoz kötött N-glikánok esetén a peptid-N glikozidáz F (PNGase F) enzimmel lehet megvalósítani.

Munkám célja a PNGase F enzim nagy mennyiségben, olcsón, szilárd hordozóra rögzíthető formában való előállítása volt, aktivitásának megőrzése mellett. A 6His-TEV-PNGase F génkonstrukció létrehozása után a fehérje hagyományos E. coli törzsekkel való termeltetése során azt tapasztaltam, hogy az oldhatatlan formában halmozódik fel a sejtek citoplazmájában, mely valószínűleg a megfelelő feltekeredéshez szükséges 3 diszulfid híd helytelen kialakulására vezethető vissza. A problémát a SHuffle baktérium törzsszel való fehérjetermeltetés körülményeinek optimalizálásával oldottam meg. A Ni^{2+} -affinitás kromatográfiával tisztított fehérjéről kimutattuk, hogy annak aktivitása összemérhető a kereskedelmi forgalomban kaphatóval, és ezt a hosszútávú tároláshoz szükséges glicerinnel való hozzáadása sem csökkenti.

Kémiai és Vegyipari Szekció

Kémiai és Vegyipari I. tagozat

Helyezés	Cím	Szerzők	Témavezető
III.	Aldehidek vaskatalizált deformilezési reakciói	Csendes Viktória Flóra	Kripli Balázs, Dr. Kaizer József
II.	Funkcionális aldehid deformiláz enzim modellek előállítása	Török Patrik	Dr. Kaizer József
II.	Aminokarbonilezési reakciók vizsgálata mágnesesen elválasztható palládium katalizátorok jelenlétében	Fütyű Júlia	Papp Máté, Skodáné dr. Földes Rita
I.	Arzén(III) megkötésére kifejlesztett flagelláris fehérjék létrehozása és jellemzése bioszenzorikai alkalmazásra	Szekér Patrik	Dr. Jankovics Hajnalka
II.	Halloysit-TiO ₂ hibridek előállítása, vizsgálata és alkalmazhatósága modell szennyezőanyag bontásában	Harta Péter	Dr. Horváth Erzsébet, Dr. Zsirka Balázs
I.	Módosított TiO ₂ fotokatalizátorok előállítása és aktivitásuk vizsgálata a látható fény tartományában	Fonyó Máté	Szabóné Dr. Bárdos Erzsébet

Bíráló bizottság

Dr. Horváth Ottó

Dr. Balogh Szabolcs

Dr. Tóth Imre

Nagy Enikő

Aldehyde vaskatalizált deformilezési reakciói

Készítette: Csendes Viktória Flóra

Vegyésszmérnök alapszak

Mérnöki Kar, Kémia Intézet, Szerves Kémia Intézeti Tanszék

Témavezetők: Dr. Kaizer József, dr. Kripli Balázs

Koordinációs kémiai szempontból, a nem-hem típusú vastartalmú oxidoreduktáz enzimek modellezése növekvő érdeklődésnek örvend, ahogy egyre több enzim kerül karakterizálásra. Hidrogén-peroxiddal való terminális oxidációjuk során azonban egymással párhuzamosan két reakcióút feltételezhető. Egyrészt Fenton-reakció, mely $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ rendszert és rendkívül reaktív hidroxil-gyököt képez, másrészt pedig nagy-vegyértékű $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ intermedier képződése, mely jó kihozattal szelektív termékeket ad. Tehát vastartalmú metalloenzimek esetében dilemma, hogy az adott oxidációs folyamat milyen intermedieren keresztül valósul meg.

A természetben számos enzim működik hasonló elven, melyek zsírsavakat és aldehideket szénhidrogénekké szintetizálnak. Jelen korunk energiagazdálkodását tekintve, ezen enzimfolyamatok mechanizmusának feltérképezése kulcsfontosságú lehet az üzemanyagipar számára is.

Az ehhez hasonlatos enzimek aktív centrumának funkcionális modelljei az olyan vas-központtal rendelkező metalloenzimek, melyek köré N- és O-kötő ligandumok koordinálódnak. Ezek az enzimutánzó komplexek hidrogén-peroxiddal való reakció során olyan intermediereket képeznek, melyek meghatározott körülmények között az enzimatis reakcióknak megfelelően viselkednek.

Vizsgálataink során tehát ilyen paraméterekkel rendelkező bioutánzó rendszereket dolgoztunk ki. Modelljeinkhez jól definiált $[\mu\text{-}1,2\text{-oxo}]$, $[\mu\text{-oxo-}1,2\text{-peroxo}]$ és $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ komplexeket választottunk, melyeken keresztül vizsgáltuk a hidrocinnamaldehyd, mint szubsztrátum oxidációs reakcióját. Katalitikus és sztöchiometrikus oxidációs reakciók kidolgozásával, továbbá a részletes reakciókinetikai méréseken keresztül javaslatot tettünk a vizsgált reakciók lehetséges mechanizmusára, és ezen ismeretek birtokában az enzim hatásmechanizmusára. Kutatásaink egyrészt alap kutatás jellegűek, másrészt ipari felhasználással is kecsegtetnek.

Funkcionális aldehid deformiláz enzim modellek előállítása

Készítette: Török Patrik

Kémia alapszak

Mérnöki kar, Kémia Intézet, Szerves Kémia Intézeti Tanszék

Témavezető: Dr. Kaizer József

Kutatómunkám során a természetben fontos szerepet betöltő nemhém-típusú cianobakteriális aldehid deformiláz enzimet modellezem és különböző szubsztrátvegyületekkel vizsgálom az enzimmodell deformilezési reakcióját. Kiindulásként Fe(II) prekursor komplexeket használok, melyekből *in situ* képzem, H₂O₂ hozzáadásával, a modellként szolgáló kétmagvú Fe(III) peroxo komplexet. Szubsztrátként fenilacetaldehidet és 2-fenil-propionaldehidet használok. A lejátszódó reakciót UV-Vis spektroszkópiával követem, illetve a katalitikus reakciót GC-MS technikával vizsgálom. Ezen eredmények segítségével közelebb juthatunk az oxidoreduktáz enzimek működésének megértéséhez.

Aminokarbonilezési reakciók vizsgálata mágnesesen elválasztható palládium katalizátorok jelenlétében

*Készítette: Fütyű Júlia
Vegyészmérnök alapszak
Mérnöki Kar, Kémia Intézet, Szerves Kémia Intézeti Tanszék*

Témavezető: Papp Máté, Skodáné dr. Földes Rita

Az elmúlt években számos cikk foglalkozott a Pd katalizált aminokarbonilezési reakciókkal, melyek jól alkalmazhatók különféle amidok és α -ketoamidok előállítására. Mindkét vegyülettípus funkciós csoportja megtalálható kedvező biológiai aktivitással rendelkező származékokban, így a reakció hatékonyságának növelése gyakorlati szempontból is fontos. A Szerves Kémia Intézeti Tanszéken folyamatosan végeznek új vegyületek előállítására irányuló kísérleteket, melyek elvégezhetők homogén és heterogén katalitikus úton is. A heterogén katalizátorok könnyebben visszanyerhetők és újrahasznosíthatók, az utóbbi időben pedig a szelektivitásuk is jelentős javulást mutat.

Munkám során olyan katalizátorokat készítettem és vizsgáltam, amelyeknél az előzőektől eltérően a szilárd hordozó mágneses nanorészecske volt, erre rögzítettem az ionfolyadékot és a megfelelő palládium vegyületet. Ezen új hordozók nagy előnye a korábbiakkal szemben, hogy a nanorészecskék mágnesességének köszönhetően a katalizátor erős mágnes segítségével könnyen elválasztható a termékelegtől. Az elkészített katalizátorokat jódbenzol és morfolin reakciójában, DMF oldószerben, CO atmoszféra alatt, trietil-amin bázis jelenlétében vizsgáltam. Jó hozammal és nagy szelektivitással nyertem kettős karbonilezett terméket. A katalizátor 10 körön keresztül felhasználhatónak mutatkozott az aktivitás csökkenése nélkül. Továbbá megvizsgáltam a hozamok alakulását és a szelektivitást különböző szubsztrátumok jelenlétében.

A katalizátorok palládium-tartalmát ICP-AES módszerrel határozták meg. A termékek szerkezetét GC-MS méréssel igazoltuk, a hozamok megállapítása gázkromatográfiás módszerrel történt.

Arzén(III) megkötésére kifejlesztett flagelláris fehérjék létrehozása és jellemzése bioszenzorikai alkalmazásra

Készítette: Székér Patrik

Vegyésszmérnök mesterszak

*Mérnöki Kar, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Bio-nanorendszerek
Kutatólaboratórium*

Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka

A *Salmonella* baktérium mozgásáért felelős flagellum legnagyobb részét a flagellin fehérjéből önszerveződő módon felépülő filamentum alkotja. A flagellin polimerizációjáért csak a fehérje terminális végei felelősek, míg a polipeptid lánc középső szakasza által meghatározott D3 domén a filamentum felszínén helyezkedik el. A flagellin fehérje átalakítható oly módon, hogy azt molekuláris felismerő funkcióval ruházzuk fel a D3 domén megfelelő idegen kötőfehérjével való helyettesítésével, a polimerizációs képesség hátrányos befolyásolása nélkül. Számos mikroorganizmusban találhatók olyan fehérjék, amelyek az arzén(III) erős, szelektív megkötésére képesek és sok arzénkötő fehérje esetében ismertek azok a szerkezeti motívumok is, amik meghatározó szerepet játszanak a célmolekula felismerésében és megkötésében. A rendelkezésre álló információk innovatív felhasználásával flagellin alapú arzénkötő fehérjéket hoztam létre, melyek képesek lehetnek a természetes vizekben található arzénszennyezés megkötésére és így kimutatására. Ezeket polimerizálva rendkívül nagy felületi kötőhelysűrűségű filamentáris nanorudak készíthetők, melyek bioszenzorok érzékelő elemeként szolgálhatnak. Az *Acidithiobacillus ferrooxidans* ArsR represszor fehérjéből származó 10 aminosavból álló oligopeptidet (ArsR10) és az *Escherichia coli* ArsR 15 aminosavból álló As-kötő, ciszteineket tartalmazó motívum rövidített változatait (ArsR6/7/9) építettem be a D3 doménjének helyére. Ezeket vizsgáltam meg As(III)-kötő és polimerizációs képesség szempontjából. Utóbbi alapján, a legígéretesebb jelölt a 9 aminosav hosszú motívumot tartalmazó flagellin (FliC-ArsR9) lett. Ennek nagy mennyiségű előállítására, annak cisztein tartalmát is figyelembe véve optimalizáltam egy fehérje termelési és tisztítási protokollt, amit az FliC-ArsR10-re is végrehajtottam. As(III)-kötő képességet izotermális titrációs mikrokálorimetriával és elektronmikroszkópos elemvizsgálattal vizsgáltam. A FliC-ArsR9-t filamentum formában chip felületre rögzítettük és az általam javasolt reakciókörülmények alkalmazásával elvégzett ciklikus voltametrias mérések igazolták az As(III)-kötést. Kutatásunkat az OTKA NN117849 és a BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017 pályázat támogatta.

Halloysit-TiO₂ hibridek előállítása, vizsgálata és alkalmazhatósága modell szennyezőanyag bontásában

*Készítette: Harta Péter
Vegyészmérnök alapszak
Mérnöki kar, Környezetmérnöki Intézet*

Témavezető: Dr. Kristóf Jánosné Dr. Horváth Erzsébet, egyetemi tanár
Dr. Zsirka Balázs, tudományos munkatárs

Napjainkban a környezetvédelmi törekvések megvalósítása világszerte kiemelt feladat. A környezeti elemek tisztításában, így a korszerű környezeti- és kárelhárítási technológiákban is igény mutatkozik az olcsó, természetes eredetű katalizátorok használatára. A halloysit egy 1:1 típusú filloszilikát, amely az iparban alkalmazott, olcsón hozzáférhető, természetes, környezetbarát alapanyag. A közelmúltban az 1:1 típusú agyagásványok és nanostruktúráik önálló fotokatalitikus aktivitásának vizsgálata kutatott területté vált, a potenciálisan katalizátorként használható agyagásványok aktivitása felületmódosítással jelentősen javítható [1-2]. A titán-dioxid egy jól ismert, intenzíven kutatott félvezető fotokatalizátor, amely agyagásvány hordozó felületére deponálható és így agyagásvány-titán-dioxid hibrid rendszerek hozhatók létre.

A dolgozatom célja egy kereskedelmi forgalomban kapható halloysit és egy természetes lelőhelyről származó halloysit felhasználásával halloysit-titán-dioxid hibrid rendszerek szintézise, majd ezek szerkezeti jellemzése és potenciális katalizátorként való alkalmazhatóságuk vizsgálata.

A halloysit-titán-dioxid preparáció folyamatát termikus analízissel (TG/DTG és DTA) követtem nyomon. A prekursor gél és az előállított nanohibridek szerkezetét infravörös spektroszkópiával (FTIR-ATR) vizsgáltam. A felületen kialakított titán-dioxid jelenlétének igazolását és polimorf módosulatának meghatározását Raman spektroszkópiával végeztem el. A fotokatalitikus aktivitás vizsgálatához 365nm-es UV bevilágítást és tesztvegyületként oxálsavat használtam, amelynek a reakció utáni mennyiségi meghatározásához permanganátos titrálási eljárást alkalmaztam.

- [1] D. Kibanova, M. Trejo, H. Destailats, J. Cervini-Silva: Catalysis Communications, **2011** (12), 698–702.
- [2] P. Szabó, B. Zsirka, D. Fertig, E. Horváth, T. Csizmadia, J. Kristóf : Catalysis Today, **2017** (287), 37–44.

Módosított TiO_2 fotokatalizátorok előállítása és aktivitásuk vizsgálata a látható fény tartományában

Készítette: Fonyó Máté

Kémia alapszak

Mérnöki Kar, Kémia Intézet, Általános és Szervetlen Kémia Intézeti Tanszék

Témavezető: Szabóné dr. Bárdos Erzsébet

A heterogén fotokatalízis kulcsfontosságú eleme a kis méretű félvezető, melyet a tiltott sávjánál nagyobb energiájú fénnyel gerjesztve elektron-lyuk pár keletkezik. A részecskepár rekombinációjával versenghetnek a felületen lejátszódó töltésviteli folyamatok. Vizes közegben, oldott molekuláris oxigén jelenlétében nagy oxidációs potenciálú gyökök, gyökionok keletkeznek. A félvezetők ezen tulajdonságát használhatjuk a szennyvíztisztításban, a légtisztításban vagy akár öntisztuló, illetve antibakteriális felületek létrehozásakor is.

A módszer hátránya, hogy a legalkalmasabb félvezető oxid, a titán-dioxid nagy energiájú UV fénnyel gerjeszthető, így a napsugárzásnak csak kicsiny részét (4-5%) tudja hasznosítani. Ahhoz, hogy a katalizátort látható fényben is aktívvá tegyük, s tulajdonságait tovább javítsuk, egyik megoldás, ha a félvezetőt különböző nemfémes illetve fémes elemekkel módosítjuk (dópoljuk).

Munkám során látható fénnyel is gerjeszthető titán-dioxid előállítása volt a célom, melyhez a félvezetőt szol-gél eljárással, bór és bizmut módosító elem alkalmazásával állítottam elő.

Termikus analízissel követtük nyomon a kalcinálás során végbemenő folyamatokat. Raman spektroszkópiával és röntgendiffrakcióval vizsgáltuk a katalizátorok fázisösszetételét, valamint meghatároztuk fajlagos felületüket és gerjesztési küszöbenergiájukat is. Fotokatalitikus aktivitásukat egyrészt a hidroxilgyök képződési sebességével jellemeztük, másrészt a lebontási kísérletekben modellvegyületként oxálsavat és titánsárgát alkalmaztunk.

Megállapítottuk, hogy a bizmut jelenléte növeli a katalizátorok fajlagos felületét, valamint visszaszorítja a kalcinálás hatására végbemenő anatáz-rutil fázisátalakulást. A módosító elemeket együtt alkalmazva jelentősen csökkent a gerjesztési küszöbenergia, mely a látható fény hasznosítását valószínűsíti.

Ultraibolya tartományban a hidroxilgyök képződése bórral és bizmutteral módosított katalizátorokon nagyságrendekkel kisebb a Degussa P25 TiO_2 -hoz képest, míg az oxálsav bomlási sebessége már összemérhető volt a referencia katalizátor alkalmazásakor mért értékekkel. Látható tartományban nem tapasztaltunk hidroxilgyök képződést, és gyakorlatilag az oxálsav sem bomlott. Titánsárgát alkalmazva modellvegyületként, a bevilágított minták fényelnyelése csökkent, azaz a festékanyag átalakult.

A kutatás az EFOP-3.6.1-16-2016-0001 projekt és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-1 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság programjának támogatásával készült.

Kémiai és Vegyipari Szekció

Kémiai és Vegyipari II. tagozat

Helyezés	Cím	Szerzők	Témavezető
I.	Mesterséges és természetes hidroxiapatit adalékokból előállított bioüvegkerámiák vizsgálata	Czédli Diána	Eniszné dr. Bódogh Margit
II.	Korróziós inhibitorok védőhatásának és a védőhatás időfüggésének a vizsgálata savas közegben	Orbán Lehel	Dr. Lukács Zoltán, Dr. Kristóf Tamás
I.	Biogáz előállítása elektrofermentációs úton	Takács Piroska	Dr. Nemestóthy Nándor
II.	Ionos folyadékot tartalmazó támasztóréteges folyadékmembránok stabilitás vizsgálata gázszeparáció során	Ecker János András	Dr. Nemestóthy Nándor
II.	Homogenizálódás és áramlás vizsgálata recirkulációs keverőtartályokban	Tarcsay Bálint	Rippelné dr. Pethő Dóra
II.	Diffúziós folyamatok vizsgálata sztirol-divinil-benzol kopolimerben	Berzeviczy Gergely	Rippelné dr. Pethő Dóra

Bíráló bizottság

Dr. Hodai Zoltán

Soósné Dr. Balczár Ida

Dr. Gubicza László

Bobek Janka

Mesterséges és természetes hidroxiapatit adalékokból előállított bioüvegkerámiák vizsgálata

*Készítette: Czédli Diána
Anyagmérnök alapszak
Mérnöki Kar, Anyagmérnöki Intézet*

Témavezető: Eniszné dr. Bódogh Margit

Az emberi test egyes részeinek, bizonyos funkcióinak helyettesítésére, illetve kezelésére különböző bioanyagok szolgálnak. Az emberi csontszövetek pótlását az ahhoz hasonló összetételű Ca-foszfátokkal tudják megoldani, melyek a testnedvekben feloldódva lehetővé teszik a felületükön a közvetlen csontképződést. Az orvosi gyakorlatban az egyik leggyakrabban használt ilyen anyag a hidroxiapatit (HA), amely biokompatibilis az emberi szövettel. [1]

Kísérleteim során olyan bioaktív üvegkerámiákat készítettem, melyeknél az előzetesen fritteléssel előállított bázisüveghez egyrészt CaF_2 adalékot tartalmazó csapadékos módszerrel előállított HA géllel, másrészt fehérjementesített állati csontok hőkezelésével nyert hidroxiapatit és β -whitlockit tartalmú örlemények hozzáadásával történik a kalcium és a foszfor bevitele. Munkám során a 65%(m/m) porított bázisüveg-frittet és 35%(m/m) különböző szemcseméretűre porított csapadékos módszerrel nyert HA örleményt és géllel, illetve kezelt állati csont örleményt tartalmazó homogenizált keverékekből hidraulikus préseléssel próbatesteket formáztam. A kalcium-fluorid tartalmú minták esetén a hidroxiapatit adalékok rovására 0,5%(m/m) CaF_2 -ot adagoltam a keverékekhez. Az 1050°C és 1100°C csúcshőmérsékleten hőkezelt minták tulajdonságainak összehasonlítását a fázisösszetétel, morfológia és porozitás vizsgálata alapján végeztem.

A kutatásom célja tehát a különböző Ca-foszfát kristályos fázist tartalmazó bioaktív üvegkerámiák tulajdonságainak vizsgálata a kristályos fázis szemcseméretének függvényében, s ezek alapján a legkedvezőbb oldhatóságot, beépülési sebességet és mechanikai szilárdságot eredményező összetétel kiválasztása.

[1] Hulbert, S. F., Hench, L. L., Forbers, D., & Bowman, L. S. (1982). History of bioceramics. *Ceramics international*, 8(4), 131-140.

Korróziós inhibitorok védőhatásának és a védőhatás időfüggésének a vizsgálata savas közegben

*Készítette: Orbán Lehel
Vegyésszmérnök alapszak
Mérnöki Kar, Kémia Intézet, Fizikai Kémiai Intézeti Tanszék*

Témavezetők: Dr. Lukács Zoltán, Dr. Kristóf Tamás

A vegyiparban jelentős gondokat okoz a fémek korróziója, ezért az ipar egyik fontos területe a korrózióvédelem. Számos módszer ismeretes a korrózió mértékének csökkentésére. Az egyik legfontosabb eljárás az inhibitorok alkalmazása. A korróziós inhibitorok olyan anyagok, amelyek a korróziós közeghez kis koncentrációban adagolva a korróziósebességet számottevően lecsökkentik. Az inhibitorok alkalmazása megoldást jelenthet mind korrózióvédelmi, mind gazdasági szempontból a csővezetékek, reaktorok és egyéb berendezések állagának megővésében. Az inhibitoros korrózióvédelem legnagyobb felhasználói a kőolaj- és földgáztermelés, -szállítás és -feldolgozás, az erőművek, és minden olyan vegyipari terület, ahol vizes hőcserélők üzemelnek.

Munkám során az urotropint, mint közismert korróziós inhibitor hatóanyagot vizsgáltam elektrokémiai és tömegvesztés-mérési módszerekkel, összehasonlítva a BPR81100 és LOSALT LS1508 kereskedelmi minőségű inhibitorok védőhatásával, amelyeket az ipari környezetben tipikusan fémfelületek tisztítására használt 10%-os sósav korróziós hatásának a csökkentésére alkalmaznak. A különböző módszerekkel kapott korróziósebességek jól korreláltak. Az eredmények szerint az urotropin adta a legjobb védőhatást akkor, ha hosszabb ideig hagytuk reagálni a savas közeggel. Az irodalom szerint az urotropin bomlástermékei között szerepel a metilamin, aminek homológjai közismerten jó korróziós inhibitorok.

Az eredmények alapján szükségesnek láttam tovább vizsgálni az urotropin védőhatásának időfüggését. Ezen méréseket a NACE TM 0169 szerint végeztem el, hogy árnyaltabb képet kapjunk a bomlással kapcsolatban. A vizsgálat időspecifikus tömegvesztés-mérésből és impedancia spektroszkópiai mérésekből állt. A vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy a védőképesség javulása az első órában bekövetkező folyamatoknak az eredménye.

Biogáz előállítása elektrofermentációs úton

Készítette: Takács Piroska

Vegyészmérnök mesterszak

Mérnöki Kar, Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutatóintézet

Témavezető: Dr. Nemestóthy Nándor

Az elektrofermentáció a hagyományos fermentációs technológiát elektrokémiai rendszerrel ötvöző eljárás, melynek lényege, hogy egyfajta mediált elektrontranszfer révén elősegíti különböző vegyületek mikrobiális átalakítását. A fermentorban elhelyezett elektródokkal számunkra kedvező módon befolyásolhatjuk a fermentációs közeg redox-potenciálját, ezen keresztül pedig a mikroorganizmusok NADH/NAD⁺ egyensúlyát, ami jelentős hatással van a keletkező termékek összetételére, növelhető az atomhatékonyság illetve a mikrobiális növekedés is serkenthető.

Az elektrokémia és a fermentáció ilyen jellegű összekapcsolásával csupán az utóbbi néhány évtizedben foglalkoztak a kutatók. Bár a kezdeti eredmények igen ígéretesnek bizonyultak, számos tisztázandó kérdés és megoldásra váró probléma merül fel a technológiával kapcsolatban.

Kutatásom egyik témája a biogáz elektrofermentációval történő előállítása. Munkám során az elektrokémiai folyamatoknak a termékösszetételre és a termelés hatékonyságára gyakorolt hatását vizsgálom a hagyományos fermentációt használva kontrollként.



Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

A kutatómunkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00016 nyilvántartási számú, „Vízbazis-védelem, moduláris, mobil vízkezelő rendszerek és szennyvízkezelő technológiák fejlesztése a Pannon Egyetem bázisán hazánk dinamikus export növekedésének elősegítése érdekében” című projekt támogatásával.

Ionos folyadékot tartalmazó támasztóréteges folyadékmembránok stabilitás vizsgálata gázszeparáció során

*Készítette: Ecker János András Biomérnök alapszak
Mérnöki Kar, Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet*

Témavezető: Dr. Nemestóthy Nándor

Manapság egyre inkább előkerül a fenntartható fejlődés, az eddigi kémiai, ipari módszerek kiváltása/kiegészítése úgynevezett „zöld technológiákkal”. A membránok a hagyományos elválasztás technikákhoz képest, mint például az ad/abszorpció, desztilláció, extrakció, számos előnnyel rendelkeznek, többek között egyszerű működéssel, kompaktsággal, nagy energiahatékonysággal és kicsi környezetterheléssel. Az ionos folyadékok hasonlóan jó tulajdonságokkal rendelkeznek és bennük az anion és kation megfelelő kiválasztásával az adott felhasználási célra optimalizálhatók.

Munkám során két különböző ionos folyadékkal készített támasztóréteges folyadékmembrán stabilitását vizsgáltam membrános gázszeparáció (He és CO₂) során. A támasztóréteges membránok elkészítéséhez hidrofób PVDF membránt használtam támasztóréteggént, ionos folyadéknak pedig [Bmim][PF₆]-ot és [Bmim][NTf₂]-t használtam. A gázszeparációs méréseket He, CO₂ tiszta gázokra, valamint He/CO₂ biner gázelegyre végeztem szakaszos és folyamatos rendszerben. Fontos megemlíteni, hogy folyamatos rendszerben az ionos folyadékkal történő gázszeparáció eddig még nem vizsgált terület. Vizsgáltam a membránok adott gázokra vonatkozó permeabilitás értékeit, valamint különböző nyomásokon a membránok stabilitását az idő függvényében. Kevert gáz esetén az elválasztás hatékonyságára végeztem a kísérleteket, valamint a permeát és a retentát áramból vett minták összetételét gázkromatográf segítségével elemeztem.

Az eredményekből látszik, hogy a membránok a használat során vesztenek a stabilitásukból és a membrán két oldalán a nyomás közel egyforma lesz. A nyomásváltozás a membrán két oldala között CO₂ esetén exponenciális, míg He esetén lineáris.

Homogenizálódás és áramlás vizsgálata recirkulációs keverőtartályokban

*Készítette: Tarcsay Bálint Levente
Vegyésszmérnök mesterszak*

*Mérnöki Kar, Vegyésszmérnöki és Folyamatmérnöki Intézet, Vegyipari Műveleti Intézeti
Tanszék*

Témavezető: Rippelné Dr. Pethő Dóra, adjunktus, intézeti tanszékvezető

Konzulens: Bobek Janka, PhD hallgató

A mérnöki gyakorlatban fontos feladat a homogenizálás. A különböző vegyipari műveletekhez homogenizálással alakítanak ki alap és segédanyagokat, melyeknek az adott folyamat során inhibitor, moderátor, katalizátor, szolvens, stb. szerepük lehet. Amennyiben az elegyek homogenitása nem megfelelő az a termék minőségének romlásához, későbbi feldolgozási vagy hasznosítási lépések során pedig üzemzavarhoz vezethet.

A munka során egy speciális alakú tartályban vizsgálok a homogenizálódást, recirkulációs kevertetés mellett. Az általam vizsgált folyamatban szakaszosan érkezik adott mennyiségű, tömény ($29,16 \text{ gl}^{-1}$), vizes bórax oldat a keverőtartályba. A feladat az új adagnak a már a tartályban lévő hígabb bórax oldattal ($6,24 \text{ gl}^{-1}$) való elegyítése, melyhez a tartályban lévő oldatot folyamatosan recirkuláltatom egy szivattyú segítségével. Probléma, hogy a rendszerben lévő anyag az oldatok fajsúly különbségéből kifolyólag rétegződésre hajlamosak, mely nehezíti a homogenizálást. A kutatás során a tartályba egységugrás függvénnyel juttattam különböző töménységű bórax oldatot, felvettem a rendszer tartózkodási idő sűrűség és eloszlásfüggvényét, hogy következtethessek a tartályban kialakuló áramlás jellegére. A tartályban lévő oldat koncentrációjának változását vezetőképesség mérésével követtem. Az áramlás jellegének megismerése után az anyagot jövőbeli vizsgálatok során recirkuláltatni fogom, a megfelelő kevertetési idő meghatározásához, mellyel biztosítható az elegy homogenitása.

A dolgozat folyamán több, különböző konstrukciójú tartályban elvégeztem a méréseket, hogy megvizsgálhassam a geometria hatásait a rétegződésre illetve homogenizálásra. A homogenizálás vizsgálatára szolgáló modellberendezésekkel végzett mérések eredményeit alapul véve, különböző matematikai modellekkel közelítem a tartályokban kialakuló áramlási illetve keveredési viszonyokat.

Diffúziós folyamatok vizsgálata sztírol-divinil-benzol kopolimerben

Készítette: Berzeviczy Gergely

Vegyésmérnök mesterszak

Mérnöki kar, Vegyésmérnöki és Folyamatmérnöki Intézet, Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszék

Témavezető: Rippelné Dr. Pethő Dóra

Napjainkban széles körben elterjedtek a sztírol-divinil-benzol alapú ioncserélő gyanták a vegyipar, a rokon iparágak és a környezetvédelem területén. Jelentőségük egyre inkább nő a kémiai szeparáció területén is (értékes komponensek kinyerése, izotópok, ritkaföldfémek, optikai izomerek elválasztása). Előnyük, hogy szelektíven képesek megkötni pozitív illetve negatív ionokat, a kopolimer anyagi minőségétől függően, és azokkal egyenértékű, de más anyagi minőségű ionokat az oldatba juttatni. Az ilyen tulajdonságú gyöngypolimereket leggyakrabban a vízkezelés/vízisztítás területén alkalmazzák.

A Pannon Egyetem Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszékén korábban már végeztek kutatásokat különböző tulajdonságú és eltérő funkciós csoportokat tartalmazó kopolimerek előállítására, azok szulfonálási reakcióira, a szulfonálás során visszamaradó kénsav oldatok hasznosítására és a gyantában keletkező szennyező komponensek vizsgálatára.

Munkám során a kopolimer diffúziós tulajdonságait vizsgáltam különböző oldószerekkel történő érintkeztetés során. Meghatároztam a kopolimer halmaz térfogatváltozását és több körön keresztüli felhasználhatóságát. Összehasonlítottam a duzzasztás sebességét nyugvó illetve kevertágyas berendezések esetén is. A kopolimer duzzasztásának jelentős szerepe van a szulfonálási reakció során és a visszamaradt szennyezett kénsav összetételében is.

Műszaki Tudományi Szekció

Műszaki Tudományi I. tagozat

Helyezés	Cím	Szerzők	Témavezető
III.	Komposztálási technológián alapuló vízhasznosítás - A fejlődő országok megsegítésére	Szalóki Laura	Dr. Domokos Endre
II.	Analysing environmental awareness of students studying at University of Pannonia	Vafa Shikhiyeva	Dr. Nagy Georgina
II.	Kisméretű vízerőmű tervezési szempontjai és gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata	Horváth Mátyás	Sebestyén Viktor
I.	A kaolin bolygó és keverőmalomban végzett mechanokémiai aktiválásának vizsgálata	Korona Gábor	Dr. Kristófné Dr. Makó Éva

Bíráló bizottság

Dr. Kovács Kristóf - zsűri elnök

Dr. Somogyi Viola

Dr. Zsirka Balázs

Boros Adrienn

Komposztálási technológián alapuló vízhasznosítás – A fejlődő országok megsegítésére

*Készítette: Szalóki Laura
Vegyésszmérnök alapszak
Mérnöki Kar, Környezetmérnöki Intézet*

Témavezető: Dr. Domokos Endre

Munkám során egy olyan komposztáló szerkezet tervezésével foglalkoztam, amelynek az elsődleges funkciója nem a komposzt készítése, hanem a folyamat során keletkező és a felhasznált hulladékokban lévő víz kinyerése. A tervezés folyamán fontos szempont volt, hogy a szerkezet megépítése és működtetése a lehető legkisebb költségből valósulhasson meg, hiszen ezt a szerkezetet fejlődő országokba terveztem.

Mivel sokat hallhatunk a kialakult vízválságról, a korlátozásokról, illetve egyes országok teljes kiszáradásának veszélyéről, ezért választottam ezt a témát. Ebből következően megvizsgáltam a veszélyeztetett országok gazdasági helyzetét és a vízgazdálkodásukat, ez alapján következtetve arra, hogy milyen szintű beavatkozásra van szükség. Ezt követően felmértem a vizsgált országokban azokat a szerves hulladékokat, melyek alkalmasak vízkinyerő komposztálásra. A komposztáló tervezése során fontos szempont volt a gazdaságosság mellett a mobilitás és a könnyű kezelhetőség, így ezek alapján készítettem el a végleges tervet. A terv alapján készítettem egy kicsinyített modellt, hogy valós adatokból számításokat végezhessenek, melyekből a készülék hatékonysága közelítőleg megadható. Emellett a kinyert folyadék összetételi vizsgálatából is jól közelítő értékeket kapunk a célországokban kinyerhető víz lehetséges tisztaságáról. A későbbiekben céljaim közé tartozik a komposztáló fejlesztése, a kinyerhető folyadékmennyiség növelése egyidejűleg a keletkező komposzt minőségének javításával.

Analysing environmental awareness of students studying at University of Pannonia

*Made by: Vafa Shikhiyeva
Environmental Engineering MSc
Faculty of Engineering, Institute of Environmental Engineering*

Supervisor: Dr. Nagy Georgina

Climate change is a worldwide phenomenon which needs a plenty amount of publicity and measures in order to alleviate its significant impacts on climate, built environment and on the society. There are many factors that will be affected by climate change including rising sea levels, drought, and loss of agricultural land. Nowadays and also in the close future, humanity has to face the biggest environmental challenge that they have ever seen. Therefore, environmental education plays a crucial role. Thus, the well-educated and informed public will be able to make more sensible and precise decisions and react to climate change concerns. Environmental education is about joining members of the community, students, policymakers, the old and young with the aim of authorizing, improving skills and give opportunities for action and it also open doors to increase the public awareness and knowledge about environmental issues.

In this research, the level of awareness about climate change was examined by the help of a questionnaire between the Hungarian and International students of the University of Pannonia in Veszprem city. Questionnaire titled “Climate Change in view of you” and contains 6 sections and 15 questions. The study allows us to examine the climate change perception of the young generation and see the difference of knowledge level between local and international students. During the examination process, climate change awareness of different age groups and gender were distinguished amongst both Hungarian and International students. Moreover, the outcomes of the research also compared with other similar studies. According to the achieved results in the close future, it is estimated to organize workshops and roundtable discussions with the aim of providing more detailed information on the topics where students do not have adequate knowledge.

Kisméretű vízerőmű tervezési szempontjai és gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata

*Készítette: Horváth Mátyas
Környezetmérnök alapszak
Mérnöki Kar, Környezetmérnöki Intézet*

Témavezető: Sebestyén Viktor

Az elmúlt 25 évben a világ energiafogyasztása folyamatosan növekedett. Míg 1992-ben 93 000 TWh volt, 2017-ben már a 157 000 TWh-t is elérte, amely alapján elmondható, hogy a 90-es évek óta több, mint másfélszeresére nőtt az energiafogyasztás. A fosszilis energiahordozó (kőolaj, földgáz, nukleáris) készletek korlátosságukból adódóan megkérdőjelezhetővé teszik a jövő generációk energiaszükségletének kielégítését. Jó alternatíva lehet ezek kiváltására a megújuló energiaforrások alkalmazása, melyek használata napjainkban egyre inkább terjed.

A megújuló energiaforrások közül az egyik legrégebben használt és legmegbízhatóbb a vízenergia hasznosítása. Fontos előnye, hogy a folyók, patakok áramlása bizonyos ingadozások mellett mindig jelen van napszaktól és évszaktól függetlenül.

Jelen munka célja egy olyan alulcsapásos kisteljesítményű úgynevezett „törpevízerőmű” megtervezése és kivitelezése, amely a vízfolyások felszínén úszó helyzetben végzi a villamos energia előállítását, ezáltal érzéketlen a vízállás – akár hirtelen történő – megváltozására. A tervezés során fontos szempont volt, hogy a vízerőmű könnyen és gyorsan telepíthető legyen bármilyen vízfolyásra és alkalmazható legyen extrém alacsony vízállások esetén is, amelyet a járókerék állítható bemerülése tesz lehetővé.

A munka során ismertetésre kerül a vízerőmű tervezési folyamata és annak szempontrendszere, valamint az elérhető teljesítmény bemutatása céljából terepi méréseket is végeztem. A terepi mérések céljára a Veszprémi-Séd patakot választottam, mely átlagos mélysége – a sokéves átlagos vízhozamra vetítve – 36 cm. A mérések során a patak áramlási sebességét, az erőmű járókerékének fordulatszámát és a megtermelt villamos energia mennyiségét vizsgáltam.

Az általam tervezett és megépített törpe vízerőmű egy olyan környezetbarát villamos energia termelési alternatívát jelent, amely nem eredményez ökológiai károkat és a kis méretű vízfolyásokon univerzálisan alkalmazható.

A kaolin bolygó és keverőmalomban végzett mechanokémiai aktiválásának vizsgálata

Készítette: Korona Gábor

Anyagmérnöki mesterszak

Mérnöki kar, Anyagmérnöki intézet

Témavezető: Dr. Kristófné Dr. Makó Éva

A kaolin felhasználhatósága a kaolinit ásvány tulajdonságaitól függ, amelyeket a mechanokémiai aktiválás nagymértékben megváltoztat: a kaolinit amorfizálódik, a hidroxil-csoportok „gélvíz”-zé alakulnak át. Napjainkban többek között a mechanokémiailag aktivált kaolin puccolános helyettesítő anyagként való alkalmazhatóságának vizsgálata ígéretes gazdasági és környezetvédelmi szempontokból pl. a cementgyártásnál. A mechanokémiai aktiválás az ún. nagy energiasűrűségű malmokban pl. rezgő-, bolygó- és keverőmalomban végezhető.

Dolgozatomban a kaolin bolygó- és keverőmalomban végzett mechanokémiai aktiválását vizsgáltam intenzív száraz őrléssel. A bolygómalommal 1:11 őrlemény:őrlőtest tömegarányval, 400 min⁻¹ fordulatszámon, 30, 60 és 90 percig végeztem az őrlést. A különböző idejű őrlések energiaszükséglete 132 Wh, 259 Wh és 385 Wh volt. A keverőmalommal őrlést ugyancsak 1:11 őrlemény:őrlőtest tömegarányval, és 132 Wh, 259 Wh és 385 Wh energiaigénnyel végeztem. A kétféle malomban aktivált kaolin tulajdonságait röntgendiffrakcióval, termikus analízissel, pásztázó elektronmikroszkóppal, infravörös spektroszkópiával, fajlagos felület és szemcseméret-eloszlás meghatározásával vizsgáltam.

Megállapítottam, hogy a kaolinit hasonlóan amorfizálódik a kétféle aktiválás során, melyet szerkezetében a kötések felszakadása és a szerkezeti OH-csoportok gélvézzé alakulása kísér. A kaolinit legnagyobb mértékben a 385 Wh energia befektetésnél amorfizálódott, itt a bolygómalomnál 88%, míg a keverőmalomnál kicsit kisebb 78% volt a kaolinit amorfizációs foka. Tehát a félüzemi, üzemi méretekben is alkalmazható keverőmalommal, megközelíthető a laboratóriumban alkalmazható bolygómalommal elért amorfizációs fok, amely a mechanokémiailag aktivált kaolin puccolános aktivitása szempontjából fontos.

Műszaki Tudományi Szekció

Műszaki Tudományi II. tagozat

Helyezés	Cím	Szerzők	Témavezető
I.	Bicikli-ABS működésének vizsgálata és fékteljesítményének mérése saját tervezésű tesztpadon	Viola Gergely	Dr. Fodor Dénes
III.	Egyedi tervezésű 3D szkennert pontosságának növelése paraméter optimalizálással	Németh Sándor	Dr. Fodor Dénes
II.	Gépjárművekben alkalmazható vibrációs adatgyűjtő rendszer tervezése, építése, programozása és tesztelése	Nagy Roland	Dr. Szalai István
I.	Forgócellás adagoló GPU-val gyorsított DEM szimulációja	Füvesi Balázs	Dr. Ulbert Zsolt
I.	Útépítési kötőanyagok minőségjavítási lehetőségeinek vizsgálata	Tálosi Gréta	Dr. Holló András

Bíráló bizottság

Dr. Tímár Imre

Dr. Egedy Attila

Dr. Varga Csilla

Simon-Stöger Lilla

Bicikli-ABS működésének vizsgálata és fékteljesítményének mérése saját tervezésű tesztpadon

Készítette: Viola Gergely

Mechatronikai mérnök mesterszak

Mérnöki Kar, Gépészmérnöki Intézet, Járműmechatronika Intézeti Tanszék

Témavezető: Dr. Fodor Dénes

A dolgozat célja egy olyan mérőberendezés tervezése és megépítése, amely alkalmas a kerékpárokon használt hagyományos – hidraulikus és bowdenes – tárcsafékek, valamint egy nemrég kifejlesztett, elektronikus ékfék mechanizmus működésének vizsgálatára. A berendezés alkalmas a fékek által kifejtett fékező nyomaték mérésére, valamint képes az ABS-el szerelt ékfék számára a fék szempontjából valóságosnak tűnő környezetet emulálni.

A dolgozat kitér a fékezés folyamatának matematikai leírására, a fellépő erők és nyomatékok kiszámításának módjára és várható értékére, melyek a szerkezet mechanikai méretezésének alapjait adják. Bemutatásra kerül az újszerű "brake-by-wire" ékfék mechanizmus és az ABS rendszerek működése, abból a megfontolásból, hogy kidomborodjon egy speciális mérőpad megépítésének szükségessége vizsgálatukhoz.

A dolgozat elején látható a tervezési fázisban készült CAD modell, mely alapján az alkatrészek legyártásra kerültek. A szerkezet legbonyolultabb része a lánckerekes hajtómű, mely a hajtáshoz használt villanymotor fordulatszámát a megfelelő mértékre csökkenti, illetve a leadott nyomatékot kellőképp megsokszorozza. Az itt felhasznált számítások részletesen bemutatásra kerülnek.

A berendezés működtetését két különböző platformon futó szinkronizált program végzi. Az egyik program egy mikrovezérlőn fut, szerepe a felhasznált érzékelők jeleinek begyűjtése, feldolgozása és továbbítása a számítógép felé, valamint a hajtómotor vezérlő jeleinek előállítás is. A másik program a számítógépen fut és LabVIEW-ban íródott. Kezelőfelületén a felhasználó látja az aktuális fékező nyomaték, fordulatszám és fékteljesítmény értékeket, valamint beállíthatja a blokkolási féknyomatékot az ABS működésének vizsgálata esetén. Továbbá a háttérben végzi a mikrovezérlőtől érkező adatok feldolgozását és a szükséges számításokat.

A berendezés működőképességét mérések hitelesítik, és megegyeznek az elvárásokkal. Az ékfék nyereg még gyártás alatt van, így ABS fékezés emulálását csak közvetetten tudtam vizsgálni, de az eredmények alapján állítható, hogy a berendezés alkalmas a kitűzött feladatra.

Egyedi tervezésű 3D szkennert pontosságának növelése paraméter optimalizálással

*Készítette: Németh Sándor Zsolt
Mechatronikai mérnök mesterszak
Mérnöki Kar, Gépészmérnöki Intézet, Járműmechatronika Intézeti
Tanszék*

Témavezető: Dr. Fodor Dénes

A gyakorlatban vagy az iparban sokszor előfordul olyan szituáció, hogy bizonyos alkatrészekről nem állnak gyártási modellek rendelkezésünkre. Ha pótolni vagy utángyártani kell ilyen alkatrészeket, akkor az időkorlátok miatt 3D szkennereket hívnak segítségül, melyekkel a 3D modellek tervezését nagymértékben felgyorsíthatjuk.

A dolgozat célja egy olyan számításokkal alátámasztott 3D szkennert tervezése, amely csak lézert és kamerát alkalmaz a leképezéshez. Célkitűzés továbbá a tervezett rendszer szimulációkkal történő tesztelése, melynek során az eszköz optimális paraméterei kerülnek meghatározásra.

A dolgozat kitér a 3D szkennert részletes bemutatására, illetve a teljes rendszer matematikai modelljének felírására és a modell LabVIEW programozási környezetben történő megvalósítására. A modell egyszerű trigonometrikus összefüggésekre, illetve éldetektáláson alapuló képfeldolgozási technikákra épít. A képfeldolgozási algoritmusok implementációját a fejlesztési folyamatok gyorsítása érdekében a LabVIEW „Vision” moduljában végeztem.

A dolgozatban felsorolásra kerülnek azok a szempontok, amelyek a beállítási paraméterek megválasztásánál nagy jelentőséggel bírnak, és befolyásolják a leképezés pontosságát. Ezen pontatlanságból adódó hibák kiküszöbölésére javaslatokat tettem a dolgozatban.

A 3D szkennert mechanikájának tervét is elkészítettem az Autodesk Inventor tervezőszoftver segítségével. A tervezés során figyelembe vettem a szkennert működtetését befolyásoló tényezőket (pl. méretek, fényviszonyok...). A kamera és lézer fej lineáris mozgásához léptetőmotort és lineáris megvezetést alkalmaztam, melynek meghajtó áramkörét EAGLE szoftver környezetben terveztem meg.

Gépjárművekben alkalmazható vibrációs adatgyűjtő rendszer tervezése, építése, programozása és tesztelése

Készítette: Nagy Roland

Mechatronikai mérnök alapszak

Mérnöki Kar, Mechatronikai Képzési és Kutatási Intézet, Zalaegerszeg

Témavezető: Dr. Szalai István egyetemi tanár

A tisztán elektromos meghajtású autók terjedésével több új probléma is megjelent, egyik azok kis hatótávolsága. Ezen járművek hatótávolsága a mai technikai fejlettségi fokon is csak átlagosan 150-300 km. Minden olyan eljárás, amivel elektromos energiát takarítunk meg vagy nyerünk vissza növeli ezt a hatótávolságot. Egyik ilyen energia-visszanyerő eszköz az úthibákból adódó rezgésekből, a gépjármű lengéseiből állít elő elektromos energiát. Az ilyen eszközök tervezéséhez tudnunk kell, hogy a futóműben mekkora vibrációk keletkeznek egy-egy út során. Dolgozatomban egy ilyen vibrációs adatgyűjtő rendszer megvalósítását és a segítségével elvégzett, gépjárműves mérési eredményeket mutatjuk be. Célunk, hogy a megépített egység megbízhatóan működjön, stabil legyen és a valóságnak megfelelő adatokat mérje. A rezgések érzékelésére egy gyorsulásérzékelő szenzort használtunk, továbbá az idő- és helyadatok gyűjtésére egy GPS modult alkalmaztunk.

Az elméleti áttekintés után kiválasztottuk az áramkörökhöz szükséges elemeket és szenzorokat. Ezek után következett a rendszer összeállítása, majd optimalizálása, hogy a lehető legjobb működést érjük el. Eközben laboratóriumi körülmények között egy vibrációs berendezés segítségével több próbamérést is végeztünk. A kísérletek folytatásaként az adatgyűjtő rendszert egy gépjármű futóművéhez rögzítettük, így valós körülmények között több vizsgálatot is el tudtunk végezni. Az így megvalósított méréseket az eredmények kiértékelése és elemzése követte.

Bízunk benne, hogy sikerült egy, a jövőben is jól használható adatgyűjtő rendszert megvalósítani, amely segítséget nyújthat az energia-visszanyerő eszközök tervezésében. Az ilyen alkalmazások mellett az adatgyűjtő alkalmasnak tűnik az útviszonyok minőségének felmérésére is.

Forgócellás adagoló GPU-val gyorsított DEM szimulációja

*Készítette: Füvesi Balázs
Vegyésszmérnök alapszak
Mérnöki Kar Folyamatmérnöki Intézeti Tanszék*

Témavezető: Dr. Ulbert Zsolt

Szilárd szemcsés anyagok silóból történő kontrollált kiürítésére a legelterjedtebb megoldás a cellás adagolók alkalmazása, melyet nem csak a vegyiparban, de szinte minden olyan területén használnak, ahol szilárd, szemcsés anyagok adagolására van szükség, mint például gyógyszer-, élelmiszer-iparban, mezőgazdaságban, bányászatban, vagy akár szilárd tüzelésű erőműveknél stb. Mivel a cellás adagolókat szilárd anyagok kontrollált mozgatására használják fontos, hogy azok működési jellemzői ismertek legyenek és, hogy jól lehessen használni a felmerülő irányítási feladatok végrehajtására.

A berendezések kísérleti vizsgálata sokszor nehézségekbe ütközhet, mivel a méréshez használt eszközök megváltoztathatják a berendezés működését. A Diszkrét Elem Módszer segítségével a szilárd szemcsés anyagok viselkedése jól szimulálható, vizsgálható, ugyanakkor a szemcsék számának növekedésével a számítási igénye jelentősen növekszik. A napjainkban egyre inkább fejlődő, viszonylag olcsón és egyszerűen elérhető sokszor HPC-s teljesítményre is képes videokártyák segítségével ezek a szimulációk a berendezés komplexitásától és részecskeszámtól függően gyorsan elvégezhetők, a korábbi soros végrehajtású programok több hetes futási ideje néhány órára rövidíthető párhuzamos végrehajtású programok alkalmazásával.

A munkám során forgócellás adagoló geometriai és műveleti paramétereinek hatását vizsgáltam az adagoló tömegáramára. A cellás adagoló átmérőjének és fordulatszámának változtatásán kívül vizsgáltam a siló kúpszögének hatását a tömegáramra. A fordulatszám változtatásával sikerült megállapítani egy olyan tartományt, ahol a tömegáram lineárisan változik a fordulatszámmal, majd a fordulatszám további növelésével a tömegáram egy maximumot ér el, ennek fontos szerepe lehet a cella ürítéséhez kapcsolódó irányítási feladatokhoz. A szimulációkat általam fejlesztett GPU-ra optimalizált DEM programmal végeztem.

Útépítési kötőanyagok minőségjavítási lehetőségeinek vizsgálata

Készítette: Tálosi Gréta

Vegyésszmérnök alapszak

Mérnöki Kar, MOL Ásványolaj- és Széntechnológiai Intézeti Tanszék

Témavezető: Dr. Holló András

Konzulens: Gergő Péter

Napjainkban nagymértékben fokozódnak a közúti közlekedésben alkalmazott útépítési kötőanyagok teljesítményével szemben támasztott követelmények. Intenzíven kutatott területté vált a nagyobb forgalmi terhelhetőségű, hosszabb élettartamú aszfaltok kifejlesztése, melyeket nagyobb teljesítményű kötőanyagok kifejlesztésével lehet elérni.

Emellett a környezetvédelmi törekvésekre válaszolva az utóbbi időben több kutató vizsgálta különböző bio eredetű alapanyagok – ezek közt biomassza pirolízis folyadékok, bioolajok módosító hatását bitumen elegyekre. Úgy találták, hogy megfelelő minőségjavítási lépések után kedvező lehet a felhasználásuk, mivel javíthatják a bitumenes kötőanyagok deformációval szembeni ellenállóképességét. Egy másik szempontból megközelítve, a fenntartható fejlődés jegyében a nem fosszilis eredetű alternatív alapanyagok használata lehet az egyik hosszú távú megoldás a kőolaj eredetű bitumenek részleges helyettesítésére.

Jelen tudományos diákköri dolgozatomban célul tűztam ki olyan kötőanyag kompozíciók előállítását és vizsgálatát, melyek tartalmaznak biokomponenst is, valamint már önmagukban vagy együttesen más módosítószerekkel az alapbitumenhez képest jobb alkalmazástechnikai tulajdonságokat biztosíthatnak.

Szakmai munkám során kereskedelmi forgalomban kapható 50/70 fokozatú útépítési alapbitumen minőségjavítási lehetőségeit vizsgáltam. A kísérletek során biomassza eredetű, pirolízisből származó és utólagosan minőségjavított biokomponens módosító hatását vizsgáltam az alapbitumen esetén. Továbbá gumiőrleménnyel, illetve sztirol-butadién-sztirol blokk kopolimerrel (SBS) együttesen alkalmazva is végeztem vizsgálatokat. Biokomponensként egy kereskedelmi forgalomban is beszerezhető bioolaj nagyhőmérsékletű minőségjavítása során nyert nehéz terméket (maradékot) alkalmaztam.

Névjegyzék

Berzeviczy Gergely	25	Fütyű Júlia.....	15
Bobek Janka.....	24	Füvesi Balázs	35
Czédli Diána	20	Gergó Péter	36
Csendes Viktória Flóra	13	Harta Péter	17
Dr. Domokos Endre	27	Horváth Mátyás.....	29
Dr. Erős Tibor.....	7	Husztiné Dr. Nagy Georgina.....	10
Dr. Fodor Dénes	32, 33	Kern Bernadett.....	7
Dr. Holló András	36	<i>Korona Gábor</i>	30
Dr. Horváth Krisztián	9	Kovács Noémi.....	11
Dr. Jankovics Hajnalka	11, 16	Mesfin Alameraw.....	8
Dr. Kaizer József	13, 14	Nagy Roland	34
Dr. Kovács Zsófia.....	8	Németh Sándor Zsolt	33
dr. Kripli Balázs.....	13	Orbán Lehel	21
Dr. Kristóf Jánosné Dr. Horváth Erzsébet	17	Papp Lejla	10
Dr. Kristóf Tamás	21	Papp Máté	15
Dr. Kristófné Dr. Makó Éva	30	Rippelné Dr. Pethő Dóra.....	24, 25
Dr. Lukács Zoltán	21	Sebestyén Viktor.....	29
Dr. Nagy Georgina.....	28	Skodáné dr. Földes Rita	15
Dr. Nemestóthy Nándor.....	22, 23	Szabóné dr. Bárdos Erzsébet.....	18
Dr. Rezeli Melinda.....	9	Szalóki Laura	27
Dr. Seress Gábor.....	7	Szeitz Beáta.....	9
Dr. Szalai István	34	Szekér Patrik	16
Dr. Tatjana Juzsakova.....	8	Takács Piroska	22
Dr. Ulbert Zsolt.....	35	Tálosi Gréta.....	36
Dr. Vonderviszt Ferenc.....	10	Tarcsay Bálint Levente	24
Dr. Zsírka Balázs	17	Török Patrik	14
Ecker János András.....	23	Vafa Shikhiyeva.....	28
Eniszné dr. Bódogh Margit	20	Velásquez Erika	9
Fonyó Máté.....	18	Viola Gergely.....	32

2. Konferencián első helyezett pályaművek



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018.**



**Mesterséges és természetes hidroxipatit adalékokból előállított
bioüvegkerámiák vizsgálata**

Készítette: Czédli Diána

Témavezető: Eniszné dr. Bódogh Margit

Mérnöki Kar, Anyagmérnöki Intézet

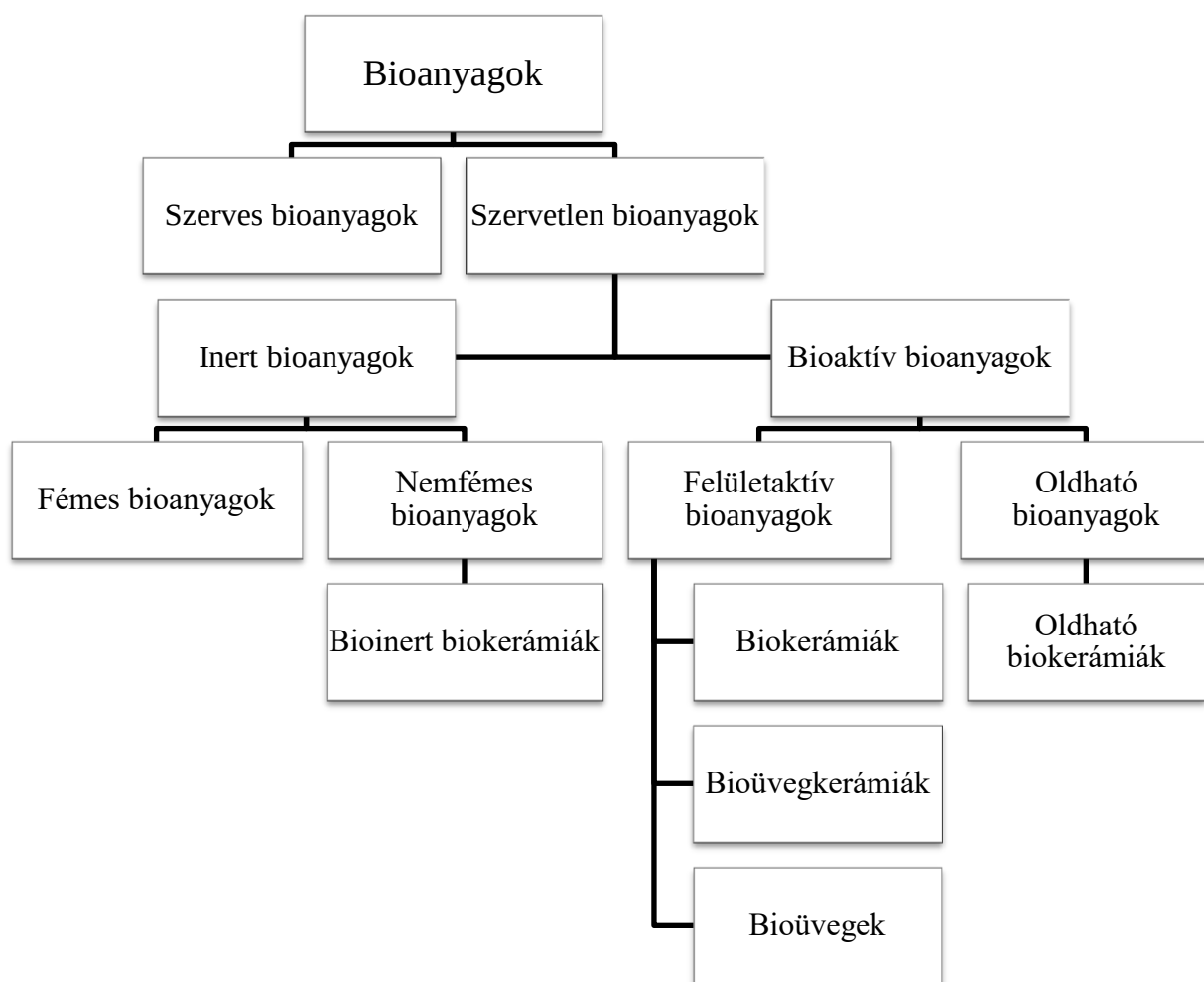
A pályamunka lezárásának dátuma: 2018. 11. 04.

Tartalomjegyzék

1.	Irodalmi áttekintés	41
1.1.	Inert bioanyagok	41
1.2.	Bioaktív anyagok	42
1.2.1.	Felületaktív anyagok	42
1.2.1.2.	Bioaktív üvegkerámiák	43
1.2.2.	Oldható bioanyagok	44
1.2.2.1.	Állati csontból előállított kalcium-foszfát bioanyagok	45
1.3	Kalcium-fluorid adalékok hatása a bioüvegkerámia tulajdonságaira.....	47
2.	Kísérleti rész.....	48
2.1.	Mintakészítés	48
2.1.1.	Bázisüveg fritt jellemzése	48
2.1.2.	Csapadékos módszerrel előállított hidroxiapatit jellemzése	49
2.1.3.	Biológiai apatit jellemzése	51
2.1.4.	Bázisüveg-hidroxiapatit és bázisüveg–biológiai apatit keverékek előállítása ...	53
2.1.5.	Üvegkerámia minták formázása	53
2.1.6.	Minták hőkezelése	53
2.2.	Fázisösszetételek vizsgálata	54
2.3.	Porozitás vizsgálat	60
2.4.	Különböző csúcshőmérsékleten hőkezelt minták morfológia vizsgálata	63
2.4.1.	Fénymikroszkópos vizsgálat	63
2.4.2.	Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat	66
3.	Összefoglalás.....	70
	Irodalomjegyzék.....	72

1. Irodalmi áttekintés

A bioanyagok speciális fiziológiai viselkedésük alapján használhatók az emberi és állati szervezet egyes részeinek helyettesítésére és kezelésére, mivel képesek kötéseket létrehozni az implantátum és a környező szövetek között. Ezen anyagok biokompatibilisek, azaz a szervezetben nem váltanak ki semmiféle káros szöveti reakciót, nem vezetnek akut gyulladásához, nem gátolják a szövetek regenerációját. (1, 2)



1. ábra: A bioanyagok csoportosítása.

1.1. Inert bioanyagok

Bioinertnek nevezzük azokat az anyagokat, melyek a szervezetbe való beültetéskor a környező szövetekkel csak minimálisan lépnek kölcsönhatásba, azokkal mechanikai

kapcsolatot létesítenek porozitásuk, illetve felületi egyenetlenségeik révén. Ebbe a csoportba tartoznak a fémek és az inert biokerámiák (pl. Al_2O_3 , ZrO_2). A szervezetben hosszú ideig nem változnak, viszont a fémek vékony felületi oxidrétege sérülékeny. Mechanikai vagy kémiai hatásra bekövetkező sérülésüknél azonban nem keletkezik káros termék. Inert bioanyagok használhatók többek között terhelésnek kitett helyeken, például a csont implantátumoknál, a csont hézagpótlásoknál és az ízületi pótlásoknál. Így például az alumínium-oxid (Al_2O_3) kerámiákat leginkább combnyak-protézisek készítésére használják nagy mechanikai szilárdságuk, kopásállóságuk és kémiai stabilitásuk miatt. (2)

Az inert bioanyagok környezetében idővel rostos, legfeljebb néhány μm vastag szövetek képződnek, melyek az implantátumot mechanikailag rögzítik. Az implantátumok beépülését elősegítik a felületükön kialakított bioaktív (hidroxiapatit, bioüveg, bioüvegkerámia) bevonatok. (1)

1.2. Bioaktív anyagok

A bioanyag akkor aktív, ha a biológiai folyamatok következtében a csontszövetekbe részben vagy teljes mértékben beépül. A bioaktív anyagok tehát részben oldhatóak és felületükön keresztül bizonyos fokú ionáramlás is lehetséges. Az emberi csont főként kalciumfoszfátokból áll. Kémiai összetételüket tekintve, a teljesen felszívódó implantátumok a természetes csonthoz hasonlóak, mivel olyan elemek (Ca, P) építik fel, amelyek a csontokban és a környező szövetekben is megtalálhatók. (2, 3)

1.2.1. Felületaktív anyagok

A felületaktív bioanyagok (bioüvegek, bioüvegkerámiák) átmenetet jelentenek az inert és az oldható bioanyagok között. A speciális összetételű üvegek mind a csontokkal, mind pedig a lágy szövetekkel képesek biokémiai kötés létrehozására. A felületen kialakult kötés védi az implantátum anyagát a további károsodásoktól. Főként csontok pótlására használják protézisként, valamint inert implantátumok felületi bevonataként. (1)

1.2.1.1. Bioaktív üvegek

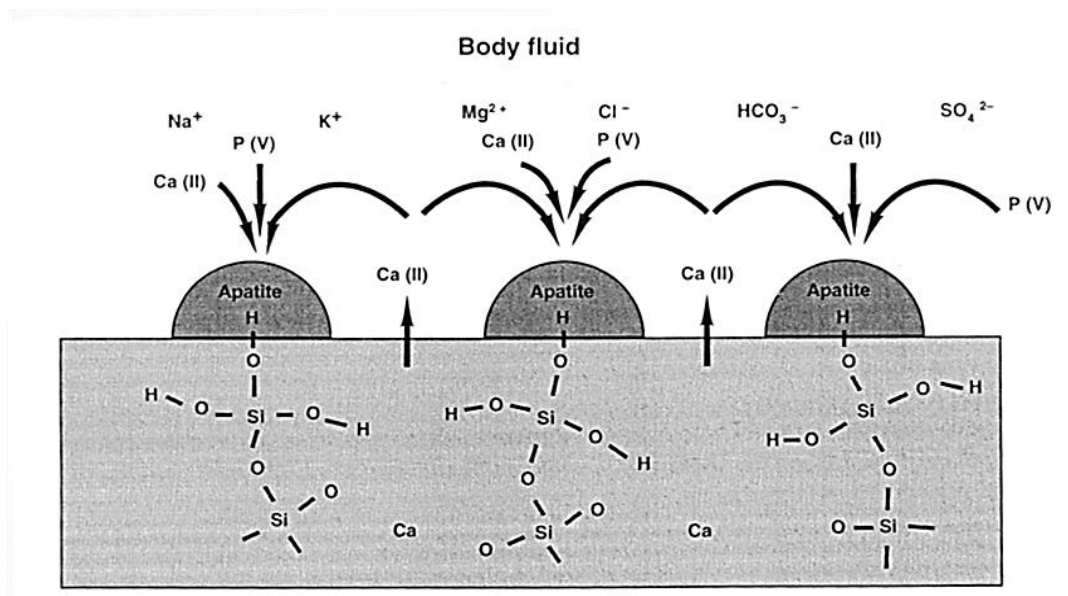
Hosszú éveken keresztül úgy vélték, hogy az élő szervezetbe kerülő üveget a védelmi reakció eredményeként rostos szövetek védőburka veszi körül. Az 1970-es években fedezték fel, hogy bizonyos összetételű kalcium-foszfát-szilikát bázisú üvegek nem képeznek ilyen védőszövetburkot, hanem egy erős határfelületi kötést hoznak létre a csonttal. Ennek a határfelületi kötésnek az erőssége azonos, vagy nagyobb a csontban lévő kötés erősségénél.

Ezek az üvegek speciális arányban tartalmaznak SiO_2 , Na_2O , CaO és P_2O_5 komponenseket.. Ezen üvegek összetétele három alapvető eltérést mutat a nem biokompatibilis, hagyományos mész-alkáli-szilikát üvegek összetételéhez képest. A bioüvegek 60 n/n%-nál kevesebb SiO_2 -ot tartalmaznak, és nagy (akár 30 n/n%) a Na_2O és CaO tartalmuk, valamint nagy bennük a Ca/P arány. Ezek a tulajdonságok következtében nagy felületi reaktivitással rendelkeznek vizes környezetben, és ekkor a felületükön hidroxikarbonát-apatit képződik. Mindez lehetővé teszi az élő csonttal való kötés létrehozását, vagyis bioaktív viselkedést mutatnak. (4)

1.2.1.2. Bioaktív üvegkerámiák

A bioüvegkerámiák a bioüvegeknél kisebb Na_2O tartalmukból adódóan kevésbé oldódó üvegfázist tartalmaznak az apatit és a különböző kristályos fázisok mellett. (5)

A SiO_2 - CaO - P_2O_5 - Na_2O alapú bázisüvegből kiinduló üvegkerámiák voltak az első bioaktív üvegkerámiák, ahol hőkezelés során az apatit térfogati kristályosodással képződött. Ezek sikeresen alkalmazhatók az emberi gyógyászatban a csontok helyettesítésére és pótlására, mivel közvetlen kötést hoznak létre az implantátum és az élő csont között. Az bioüvegkerámiák oldódási mechanizmusát bemutató **2. ábra** szerint az érintkező testfolyadékkal lejátszódó $\text{Ca}^{2+} \parallel \text{H}^+$ ioncsere hatására megnő a testfolyadék kalciumion tartalma, ami a testnedvben levő foszforral reagálva amorf, majd kristályos apatit fázist képez az implantátum felületén, így lehetővé teszi az élő csonttal való közvetlen kapcsolódást.



2. ábra: A CaO-SiO_2 bázisú üvegkerámia felületén az emberi testben lejátszódó apatit képződés sematikus ábrázolása. (5)

Az utóbbi időkben a bioüvegkerámiákat egyre szélesebb körben alkalmazzák implantátumokként, mivel könnyen formázhatók (pl. öntéssel, préseléssel), kémiai összetételük tág határok között változtatható, továbbá izotróp tulajdonságaik is előnyösek lehetnek. Különösen elterjedtek az apatit/wollasztonit (A/W) kristályos fázist tartalmazó üvegkerámiák, melyek elősegítik az élőcsontokkal való közvetlen csontképződést, erős kötéseket létrehozva az implantátum és csont között. Ezen bioüvegkerámiák sokkal nagyobb bioaktivitással, gyorsabb csontképződési képességgel rendelkeznek, mint a szinterelt hidroxiapatit implantátumok. A kalcium-foszfát kristályok mellett a megfelelő méretű szálas szerkezetű wollasztonit (CaSiO_3) kristályok kedvezőbb mechanikai tulajdonságokat eredményezhetnek. (6)

1.2.2. Oldható bioanyagok

Az oldható bioanyagok egy meghatározott idő eltelte után beleoldódnak az őket körülvevő szövetbe. Szerkezetüket tekintve kizárólag olyan elemeket (pl. kalcium és foszfor) tartalmaznak, amelyeket könnyen fel tud dolgozni a szervezet anyagcsere útján. (1, 2)

Egy kritikus méret felett a csonthibákat bioanyaggal kell feltölteni, mivel egyébként ezekbe a hézagokba kötőszövetek épülnek be, ahelyett, hogy csontképződés révén lehetséges lenne a begyógyulásuk. Az öntöltő szövetek alkalmazása korlátozott és a donor oldalon komplikációkhoz vezethetnek, mert az allogén (kívülről bevitt) szövetek fertőzés veszélyét és az immunrendszer károsodását jelenthetik. Az utóbbi időben számos bioanyagot fejlesztettek ki ilyen célra, közülük a hidroxiapatit kerámiákat használják széles körben csontpótló anyagként. A hidroxiapatit biokompatibilis, csontképző és könnyen előállítható összekapcsolódó pórusokat tartalmazó szerkezettel rendelkezik, ami lehetővé teszi a csont benövését. A szinterelt tömör hidroxiapatit szinte vízzoldhatatlan és emellett biodegradálódik, azonban csak nagyon lassú sebességgel. A kapott hidroxiapatit kerámiák legfontosabb tulajdonságait a szinterelés hőmérséklete, a szinterelés időtartama és az anyagösszetétel határozza meg. A Ca/P aránytól függően tiszta hidroxiapatit, vagy hidroxiapatit és $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (whitlockit) keveréke képződik. A tiszta hidroxiapatitnál a Ca/P atomarány 1,67. Leginkább az arc-állí sérülések gyógyítására és az íny-fogak közti hézagok kitöltésére használják. (1, 7)

Jelentős különbség van a kerámia és a természetes csont között, ugyanakkor a legfontosabb tulajdonságok, melyek a csonthiányok feltöltésére használatos biokerámiával szemben támasztandók, vagyis a nagy ($\geq 57 \pm 2$ V/V%) porozitás, valamint az összekapcsolódó pórusrendszer, fennállnak. A porozitás fontos szerepet játszik a sejtcellák viselkedése

szempontjából, megfelelő pórusméret és összekapcsolódó pórusszerkezet szükséges a csontszövetek benövéséhez. A pórusszerkezet mellett a kémiai összetétel is befolyásolja a porózus hidroxiapatit kerámiák átalakulását. A nagy kristályhidak és a nagy CaO tartalom csökkenti a biokompatibilitást. A hidroxiapatit mellett lévő bizonyos melléktermékek megváltoztathatják a pH értéket, ami befolyásolhatja a stabilitást, az oldhatóságot és a fehérje adszorpciót. (7)

A kalcium-foszfát bázisú bioanyagok nagy jelentőséget kaptak, mióta tudjuk, hogy az emberi csont szervesen komponensének fő összetevője a hidroxiapatit. A kalcium-foszfát bázisú kerámia bioanyagok, mint a hidroxiapatit (HA), a β -trikalcium-foszfát (β -TCP, β -whitlockit), valamint ezen két fázist különböző arányban tartalmazó bifázisú kalcium-foszfát (BCP) kiváló biokompatibilitást mutatnak a keményszövetekkel, és bioaktív tulajdonságokkal rendelkeznek. A trikalcium-foszfátnak (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) három polimorf módosulata ismert: β -TCP, α -TCP, α' -TCP. (8)

Az implantátum beültetésekor az új csont a hidroxiapatittal ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) közvetlenül érintkezve alakul ki. Ahhoz, hogy a frissen kialakult csont teljesen beépüljön, a hidroxiapatitnak a lehető legnagyobb porozitással és összefüggő pórusszerkezettel kell rendelkeznie. A nagy porozitás hátránya, hogy törékeny lesz a szerkezet. Mérések alapján elmondható, hogy a kerámiák mechanikai szilárdságának növelésére a porozitás és a pórusok átmérőinek csökkentése megoldást jelent, de ez megakadályozza számos csontképző anyag működését. Egy lehetséges megoldás, hogy egy relatív kis porozitású anyagot készítünk, amely egy relatív nagyobb porozitású anyaggá alakul beültetés után. A kerámia felületének felszívódásával alakul ki ez a nagyobb porozitással rendelkező szerkezet, amely mint egy összekötő elem funkcionál a csont és az implantátum között, és fokozatosan növekszik. A kisebb Ca/P = 1,5 atomaránynak megfelelően a β -trikalcium-foszfát jobban oldódik, mint a hidroxiapatit, azonban az oldódási sebességet a porozitás is befolyásolja. Nagyobb szilárdságú csontpótló anyag állítható elő a hidroxiapatit és a β -TCP különböző arányban való (pl.: 33 m/m% β -TCP és 67 m/m% HA) együttes felhasználásával. (9)

1.2.2.1. Állati csontból előállított kalcium-foszfát bioanyagok

A szintetikus hidroxiapatit a legtöbbet vizsgált, leggyakrabban használt klinikailag tesztelt bioaktív anyag. Különböző csontok helyettesítésre, pótlására, továbbá fogászati rekonstrukcióra való felhasználását az emberi csont és a fogzománc szervesen ásványi komponenseihez való fizikai és kémiai hasonlósága indokolja. Ugyanakkor a szintetikus HA

többnyire nem tartalmazza a természetes hidroxiapatitban található egyéb, csontképzés szempontjából fontos elemeket (pl.: Na, Mg, Al). Egy alternatív megoldás lehet az állati eredetű anyagokból (pl. szarvasmarha csontból, tojáshéjból) nyert kalcium-foszfátok felhasználása, melyek kémiai összetétele és szerkezete sokkal inkább megközelíti az emberi csontét, ami kedvezően befolyásolja a csontképzést. A hidroxiapatit természetes anyagokból való előállításánál előnyt jelent, hogy a kapott anyag megőrzi az eredeti anyag bizonyos tulajdonságait, így például a pórusszerkezetét, továbbá vízzel, valamint szerves oldószerekkel jól nedvesíthető. (7, 10)

A csont hierarchikusan strukturált szerkezetű kompozit anyag, ami biopolimert (kollagént), ásványi fázist (elsődlegesen karbonát-hidroxiapatitot) és vizet tartalmaz. Ezen kívül található benne bizonyos mennyiségű nem-kollagén protein is, ami összetartja a kollagén szálakat és hozzáerősíti az ásványi anyagokat a kollagénhez. Néhány milliméter nagyságrendű makroszerkezetes és néhány mikrométeres nagyságrendű mikroszerkezetes tartományok találhatók benne, ezek tartalmazzák a nanoméretű hidroxiapatit kristályokat és a kollagén rostokat. A kortikális (kérges) csontok mechanikai tulajdonságai a csont különböző növekedési irányában anizotrópiát mutatnak, így a rugalmassági modulus hosszirányban a legnagyobb. (11)

A fehérjementesített állati csont 600 °C és 1000 °C közötti hőmérséklet tartományban történő szinterelésével porózus hidroxiapatit állítható elő. A hőmérséklet növelése a relatív sűrűség és az azzal összefüggésben lévő Vickers-féle keménység növekedését eredményezi. (12)

Az szarvasmarha csontból előállított minta égetésével eltávoznak a szerves összetevők, és lényegében csak a karbonát-hidroxiapatit marad vissza. A mikrofelületek vizsgálata szerint az égetett csont porozitása a szerves anyagok bomlása miatt többszöröse a nyers csonténak. Az égetési hőmérséklet befolyásolja a szemcsenövekedés sebességét. Magasabb hőmérsékleten a szemcseméret növekedése figyelhető meg. Az égetési hőmérséklet és a csont szemcsemérete meghatározza a természetes hidroxiapatit szerkezetét, kristályosodását, és a kristályok méretét. 700 °C-ig a szerves anyagok kiégnek, de karbonát csoportokat még tartalmaz a HA. Növelve a hőmérsékletet, 1100 °C-on már nagyobb kristályméretetek figyelhetők meg. Nincs jelentős különbség a kristályok méretében, ha a különböző szemcseméretű csontokat égetünk ki azonos hőmérsékleten. Elmondható, hogy 700 °C hőmérséklet feletti égetés esetén szervesanyagmentes kristályos természetes hidroxiapatit állítható elő. (10)

1.3 Kalcium-fluorid adalékok hatása a bioüvegkerámia tulajdonságaira

A bioüvegkerámiákban egy szabályozott kristályosítás valósítható meg CaF_2 adalék hozzáadásával. Az így készített üvegkerámiákhoz 0,5-3 m/m% CaF_2 hozzáadása szükséges, ennél nagyobb mennyiség már a tulajdonságok romlását eredményezi.

A fluorapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) képződése a CaO-ban, P_2O_5 -ban és a F-ban dús cseppfázison belül homogén nukleáció szerint zajlik, 750-1000 °C hőmérsékleti tartományban. A fluorapatit növekedése a cseppfázisban megáll az üveges csepp határánál, tehát egy cseppfázisban egy különálló apatit kristály jön létre. A nukleáció és a kristályosodás végső eredményeképp jellegzetes hexagonális szerkezetű fluorapatitot kapunk.

A fluorapatit kristályosítását egy kétszeresen kontrollált mechanizmus jellemzi annak érdekében, hogy az üvegkerámiák esetében kedvező tulajdonságokat tudjunk elérni, mint például a megfelelő bioaktivitást és megmunkálhatóságot. (5)

2. Kísérleti rész

Kísérleteim során vizsgáltam a csapadékos módszerrel előállított hidroxiapatitból (HA), valamint természetes forrásból származó biológiai hidroxiapatitból (BA) és bázisüveg frittből előállított bioüvegkerámiákat. Céloom a különböző Ca-foszfát kristályos fázist tartalmazó bioaktív üvegkerámiák tulajdonságainak vizsgálata a kristályos fázis szemcseméretének függvényében, s ezek alapján a legkedvezőbb oldhatóságot, beépülési sebességet és mechanikai szilárdságot eredményező összetétel kiválasztása. A keverékekből henger alakú mintákat (pasztillákat) formáztam hidraulikus préssel. Az így kapott próbadarabokon, az 1050 °C és 1100 °C-os csúcshőmérsékleten történő hőkezelés után röntgendiffrakciós (XRD), porozitás és morfológiai vizsgálatokat végeztem.

2.1. Mintakészítés

2.1.1. Bázisüveg fritt jellemzése

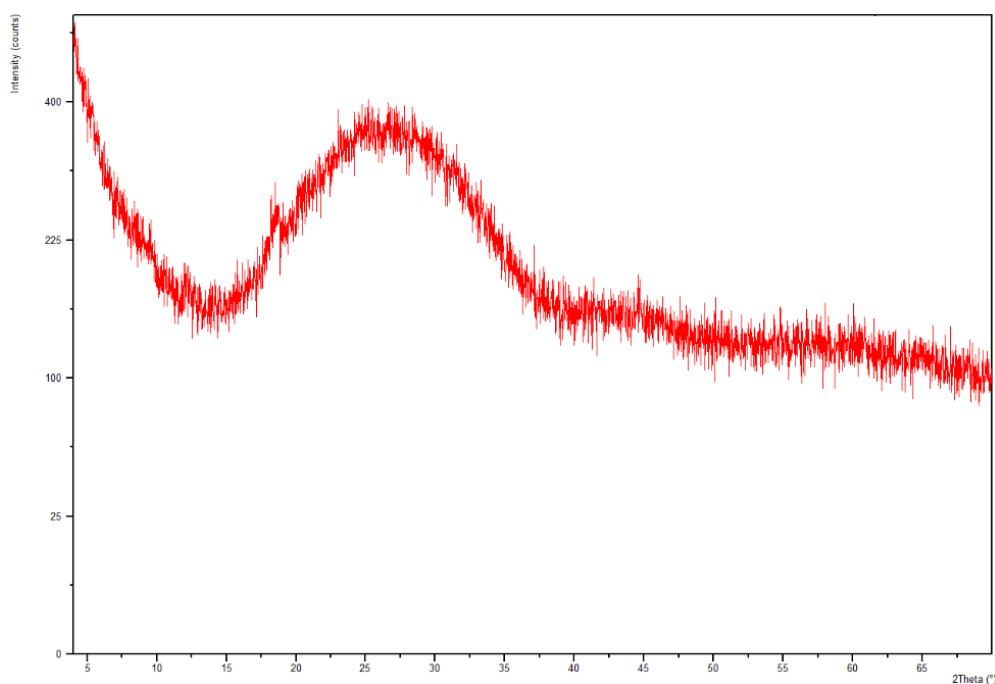
Az Anyagmérnöki Intézetben a korábbi vizsgálatoknál is alkalmazott összetételű bázisüveg fritt felhasználásával készítettem el a próbadarabokat, melynek összetétele az **1. táblázatban** található.

1. táblázat: Az üvegfritt összetétele.

Alapanyag	Összetétel (m/m%)
SiO ₂	58,9
CaCO ₃	24,2
MgO	3,4
Na ₂ CO ₃	11,8
K ₂ CO ₃	1,7

Az adott összetételű keverék olvasztása meghatározott fűtési program szerint történt korund tégelyben 1350 °C-on, majd az olvadék vízbe történő öntésével állítottuk elő a frittet. A frittet porcelán golyósmalomban való száraz őrléssel (minta:örlőtest 1:1 tömegarány alkalmazásával) 100 µm alatti szemcseméretűre porítottuk.

Az üvegfrittről készült röntgendiffrakciós felvételen (**3. ábra**) látható, hogy a kapott anyag üveges, amorf szerkezetű, csupán egyetlen kristályos fázisra utaló csúcs található rajta. Ez a csúcs valószínűleg a korund tégelyből a mintába került szennyeződésből ered.



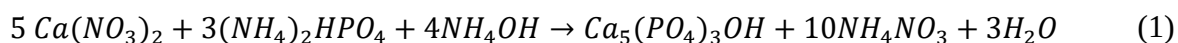
3. ábra: Az üvegfrített XRD felvétele.

A bázisüveg frített MHO-2 Zeiss típusú hevítőmikroszkóppal történő vizsgálata alapján a minta olvadása 860 °C-on kezdődik. Az olvadáspontra jellemző félgömb pont a frittnél 1220 °C-on figyelhető meg. (13)

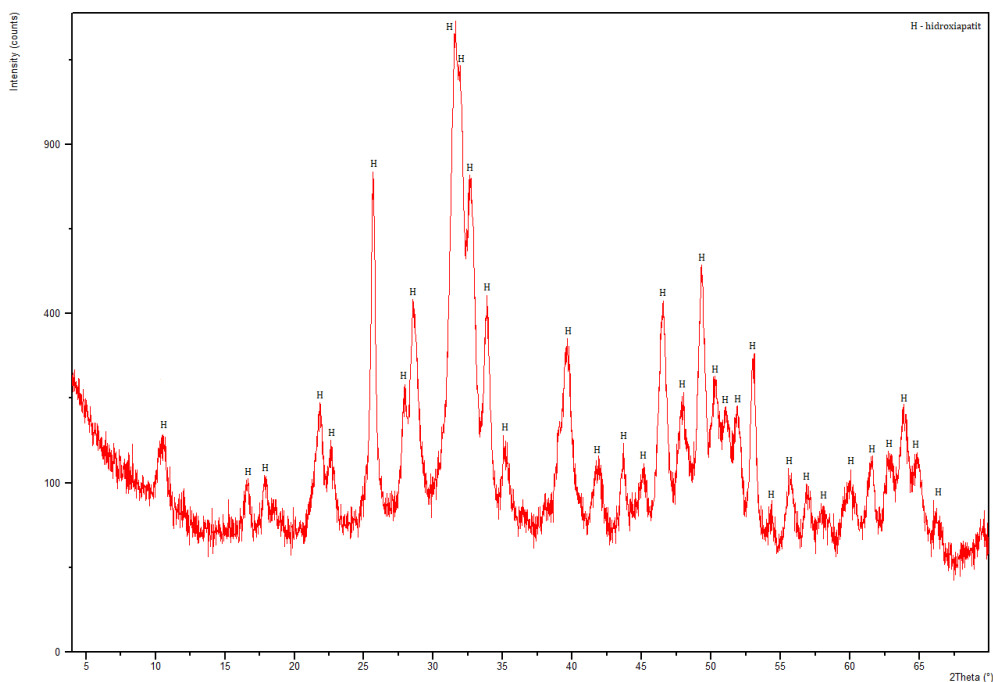
Mindez arra utal, hogy az adott fritt felhasználásával készített hidroxiapatit, illetve állati csont őrleményt tartalmazó üvegkerámiák hőkezelését 900 °C feletti hőmérsékleten célszerű végezni a megfelelő kötőerők kialakításához.

2.1.2. Csapadékos módszerrel előállított hidroxiapatit jellemzése

A hidroxiapatit előállítása az Anyagmérnöki Intézetben csapadékos módszerrel történt a következő reakcióegyenlet szerint.



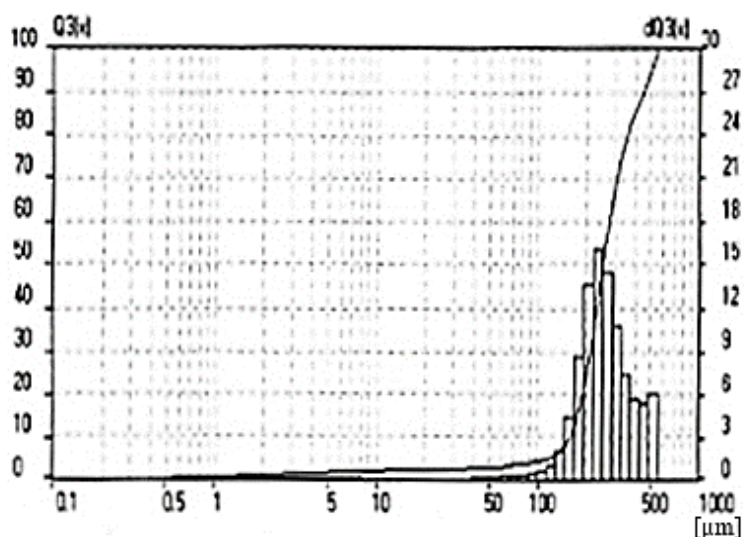
A (1) reakcióegyenlet értelmében kapott csapadékot szűrve egy gél állagú anyagot kapunk. A kiindulási anyagként használt hidroxiapatit gél szárítás után achát mozsárban 63 µm-nél kisebb szemcseméretűre porítottam és fázisösszetételét Philips PW3710 típusú röntgendiffrakciós berendezéssel vizsgáltam. A kiindulási HA gélben kristályos fázisként kizárólag hidroxiapatit van jelen. (4. ábra)



4. ábra: A csapadékos módszerrel előállított hidroxiapatit gél XRD felvétele.

Szilárd hidroxiapatit előállításához az (1) reakció értelmében kapott hidroxiapatit csapadékot szűrik, 80 °C-on szárítják, granulálják, majd 950 °C-on 1 óras hőntartással égetik. (14)

A 950 °C-on hőkezelt hidroxiapatit szemcseméret eloszlását Fritsch Analysette 20 típusú lézeres szemcseanalizátorral vizsgáltam a desztillált vízben való keveréssel és ultrahangos diszpergálással homogenizált minták esetén.



5. ábra: Szemcseméret eloszlás csapadékos módszerrel előállított, 950 °C-on hőkezelt hidroxiapatit esetén.

A mérési eredmény alapján (5. ábra) a minta 100-500 μm -es mérettartományba eső szemcséket, illetve szemcse-aggregátumokat tartalmaz. Ezen szemcseméretű mintán kívül, további golyósmalomban történő őrléssel (1, 4, 6 órás őrlési idővel) előállítottam finomabb szemcséket tartalmazó hidroxiapatitot is.

A szintén kiindulási anyagként használt 950 °C-on hőkezelt hidroxiapatitot achát mozsárban 63 μm -nél kisebb szemcseméretűre porítottam a fázisösszetétel Philips PW3710 típusú röntgendiffrakciós berendezéssel történő vizsgálatához. A mérési eredményekből (2. táblázat) látható, hogy az adott minta a hidroxiapatit mellett kis mennyiségű β -whitlockitot tartalmaz.

2. táblázat: A csapadékos módszerrel előállított, 950 °C-on hőkezelt hidroxiapatit fázisösszetétele, és a kristályos fázisok jellemző reflexióinak intenzitása.

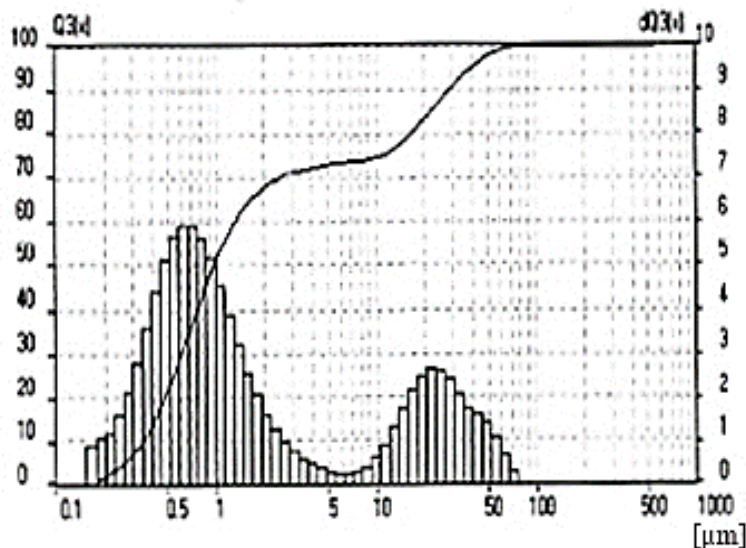
Kristályos fázis	d (Å)	Intenzitás (cts)
Hidroxiapatit	2,83	3506,09
β -whitlockit	2,88	330,63

2.1.3. Biológiai apatit jellemzése

A biológiai apatit tartamú üvegkerámiák előállításához az Alfalox Bt. által rendelkezésemre bocsátott alapanyagot használtam. A kiindulási anyag marhalábszárcsont, melyet 10-15 cm hosszúságú darabokra vágtak. A csontokat ezután többször tripszin, ill. pepszin tartalmú vízben kifőzték. A többszöri vizes mosással tisztított alapanyag hőkezelése korund tokokba téve 950 °C-on, 1 órás hőntartással, erősen oxidáló atmoszférában, kellő elszívás mellett történt. A kapott anyag fő tömegében hidroxiapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), amely azonban ebben a formában még nem használható csontpótlásként, mert kevés kalcium-oxidot is tartalmaz. A fehérjementesített csontot ezután foszforsavas kezeléssel és többszöri mosással tovább tisztították. A kívánt hidroxiapatit és β -whitlockit tartalmat adott hőmérsékleten történő hőkezeléssel állították be.

A rendelkezésemre bocsátott kezelt szarvasmarha combcsontot a bázisüveg frittnél már korábban ismertetett módon porítottam golyósmalomban történő száraz őrléssel. Ezzel rendelkezésemre állt a természetes eredetű, kis mennyiségű β -whitlockitot tartalmazó hidroxiapatit.

A biológiai apatit szemcseméret eloszlását szintén Fritsch Analysette 20 típusú lézeres szemcseanalizátorral vizsgáltam desztillált vízben való keveréssel és ultrahangos diszpergálással homogenizált minták esetén.



6. ábra: Szemcseméret eloszlás állati csontörlemény esetén.

A mérési eredményből (**6. ábra**) látható, hogy a természetes csont lényegesen nagyobb mennyiségű finom szemcsét tartalmaz, ami nagyobb fajlagos felületet, ezáltal várhatóan nagyobb reaktivitást, tömörebb szerkezetet eredményezhet.

A csontörleményt szintén a Philips PW3710 típusú röntgendiffrakciós berendezéssel vizsgáltam a fent említett módon. A **3. táblázatban** közölt adatokból látható, hogy az adott kezelt csontörleményben a hidroxiapatit mellett csak minimális mennyiségű β -whitlockit kristályos fázis található.

3. táblázat: A biológiai apatit fázisösszetétele, és a kristályos fázisok jellemző reflexióinak intenzitása.

Kristályos fázis	d (Å)	Intenzitás (cts)
Hidroxiapatit	2,81	3365,82
β -whitlockit	2,87	95,04

2.1.4. Bázisüveg-hidroxiapatit és bázisüveg–biológiai apatit keverékek előállítása

Az előzőekben ismertetett őrölt bázisüveg fritt, a csapadékos módszerrel gyártott hidroxiapatit, a hidroxiapatit gél, illetve az állati csontból nyert biológiai apatit felhasználásával azonos mennyiségű (65 m/m%) frittet tartalmazó keverékeket állítottam elő. (4. táblázat)

A továbbiakban a mintáknál az összetételre vonatkozó (HA, BA) betűk után az őrlés idejét (h), majd az égetési hőmérsékletet (°C) tüntetem fel. A GA és GFA jelű minták esetében csak az égetési hőmérsékletet jelölöm. Ezen összetételű minták esetén folyékony HA-gélbe szilárd bázisüveg frittet keverve, 100 °C-on szárítva majd achát mozsárban porítva készítettem el a porkeverékeket. A GA összetételű minták esetében S jelölés mutatja, amikor is a HA-gélt szárítottam ki és por formájában homogenizáltam a keveréket.

4. táblázat: A keverékek összetétele.

HA	65 m/m% őrölt fritt + 35 m/m% őrölt, csapadékos módszerrel előállított, 950 °C-on hőkezelt HA
BA	65 m/m% őrölt fritt + 35 m/m% őrölt, kezelt szivacsos marhacsont
GA	65 m/m% őrölt fritt + 35 m/m% csapadékos módszerrel előállított, HA gél
GFA	65 m/m% őrölt fritt + 34,5 m/m% csapadékos módszerrel előállított, HA gél + 0,5 m/m% CaF ₂

2.1.5. Üvegkerámia minták formázása

Az előzőekben ismertetett módon készített keverékekből a próbatestek formázását hidraulikus préseléssel végeztem. Hidraulikus présrel 50MPa nyomást alkalmazva készítettem a 25 mm átmérőjű, 3-5 mm magas henger alakú próbatesteket (pasztillákat).

2.1.6. Minták hőkezeltése

A préseléssel előállított mintákat elektromos fűtésű laboratóriumi kemencében az alábbi kétlépcsős hőkezeltési program szerint égettem ki.

Az első lépcső az üvegfázisban a nukleáció elősegítése érdekében 300 °C/h fűtési sebességgel 760 °C-ig tartó hevítést, majd ezen a hőmérsékleten 1 óra hőntartást jelentett. Ezt követően a kristálynövekedéshez az egyik esetben 300 °C/h sebességgel 1050 °C-os, a másik esetben 1100 °C-os csúcshőmérsékletre történt a tovább hevítés. Az adott csúcshőmérsékleteken mindkét esetben 1 óra hőntartást alkalmaztam. Az így elkészült mintákkal végeztem a további vizsgálatokat.

2.2. Fázisösszetételek vizsgálata

A két különböző csúcshőmérsékleten kiégetett mintákat kézi achát mozsárban 63 μm -nél kisebb szemcseméretűre porítottam, s fázisösszetételüket Philips PW3710 típusú röntgendiffrakciós berendezéssel vizsgáltam. Az egyes kristályos fázisok mennyiségére azok jellemző reflexiói alapján, a főbb csúcsok intenzitásának összehasonlításával következtettem. Az amorf/üveg fázis mennyiségéről a háttérintenzitás ad információt.

A röntgendiffrakciós felvételek alapján elmondható, hogy minden keverék esetén a jelenlévő kristályos fázisok a wollasztont, a β -whitlockit, a hidroxiapatit, a β -kvarc, a krisztobalit és a pszeudowollasztont.

Az alábbi táblázatok (5. táblázat,

6. táblázat) adatai alapján megfigyelhető, hogy az égetési csúcshőmérséklet növelésével a HA jelű mintáknál az oldódásból adódóan csökken a kvarc kristályos fázis mennyisége, s ezzel egy időben az olvadékból wollasztontit kristályosodik, ami a wollasztontit csúcsok intenzitás növekedését eredményezi. **(13. ábra)** Az égetési hőmérséklet növelésével csökken a háttérintenzitás, tehát az üveges/amorf fázis részben kikristályosodik, ez alól csak a HA/0 jelű minta képez kivételt.

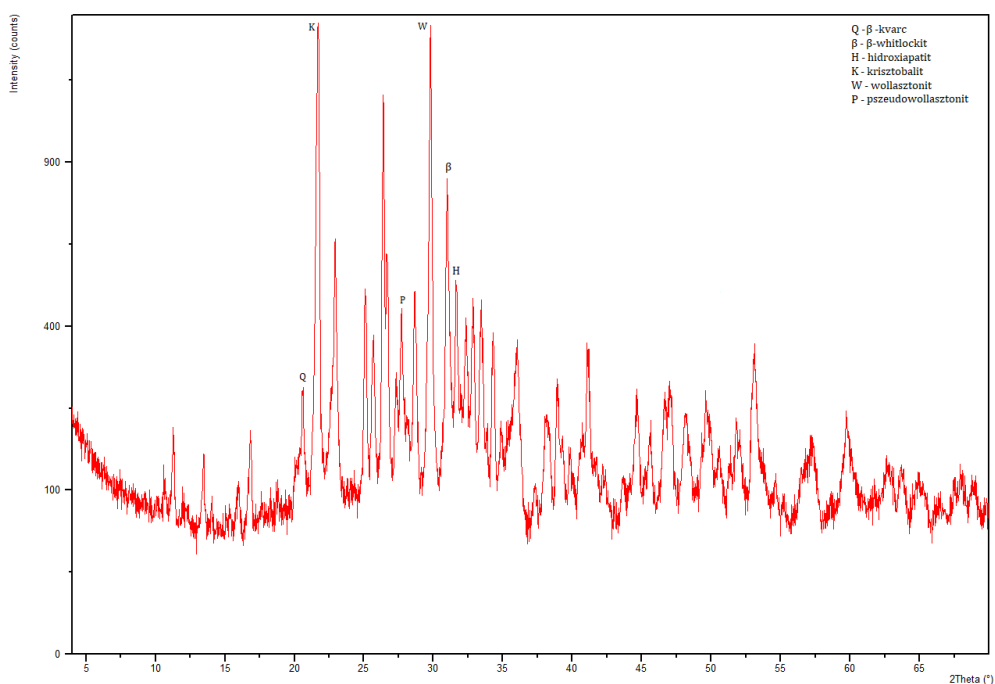
5. táblázat: A minták fázisösszetétele és a kristályos fázisok jellemző reflexióinak intenzitása az 1050 °C-os csúcshőmérsékleten történő hőkezelés esetén.

Kristályos fázis	d (Å)	Intenzitás (cts)							
		HA/0	HA/1	HA/4	HA/6	BA/0	GA	GA/S	GFA
Hidroxiapatit	2,81	910,13	802,9	621,55	636,97	448,12	189,03	350,41	237,32
β-whitlockit	2,88	418,13	422,5	420,45	320,63	753,24	554,81	315,17	437,49
Wollasztontit	2,97	779,8	871,17	983,09	991,83	1399,91	1366,99	1301,25	1411,01
β -kvarc	4,25	131,53	163,51	294,96	286,71	198,35	291,9	284,16	440,6
Krisztobalit	4,05	1022,98	958,65	1387,6	1692,9	1346,25	1388,73	1859,44	1343,37
Pszedo-wollasztontit	3,20	281,18	240,33	254,85	272,28	374,78	278,93	160,78	222,17
Háttér	-	63,74	61,69	61,15	64,46	70,32	56,89	56,94	52,04

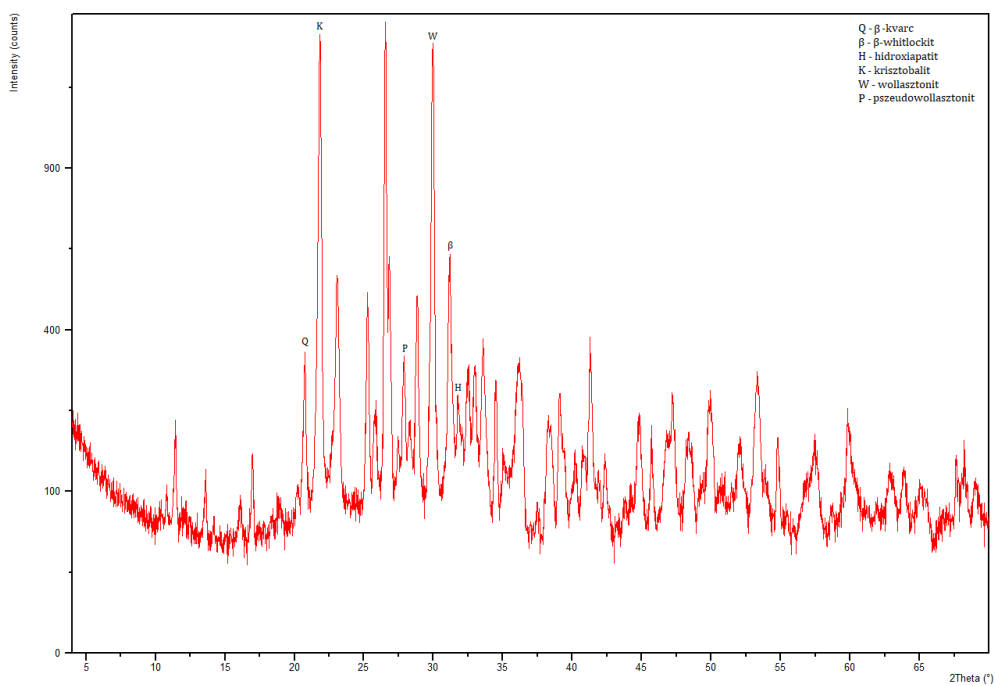
6. táblázat: A minták fázisösszetétele és a kristályos fázisok jellemző reflexióinak intenzitása az 1100 °C-os csúcshőmérsékleten történő hőkezelés esetén.

Kristályos fázis	d (Å)	Intenzitás (cts)							
		HA/0	HA/1	HA/4	HA/6	BA/0	GA	GA/S	GFA
Hidroxiapatit	2,81	771,77	780,26	470,5	303,06	223,24	130,75	141,96	229,12
β-whitlockit	2,88	575,38	712,15	676,06	545,32	907,27	818,37	641,74	519,67
Wollasztonit	2,97	1025,18	578,89	1438,56	1472,94	1577,07	1843,21	1637,49	1518,02
β -kvarc	3,34	164,15	109,31	191,06	156,02	189,35	229,65	214,86	212,05
Krisztobalit	4,05	852,84	660,14	1345,91	1322,05	1267,3	1593,89	1708,54	1593,92
Pszeudo-wollasztonit	3,20	346,1	416,66	287,14	324,16	384,39	444,37	298,38	303,69
Háttér	-	74,82	44,37	57,83	50,46	62,81	53,30	51,69	50,35

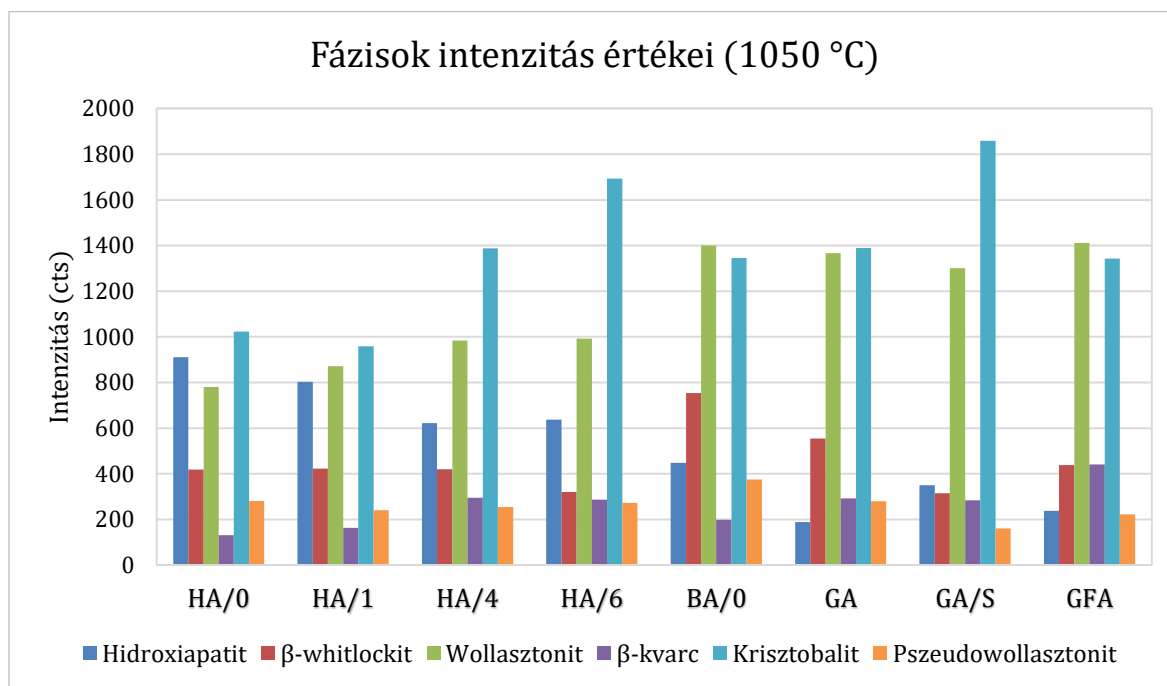
A rosszul kristályosodott, jelentős mennyiségű amorf fázist tartalmazó hidroxiapatit gélből készített, hőkezelt minták röntgendiffrakciós felvételén a HA csúcsok lényegesen kisebb intenzitással jelentkeznek, mint az előzetesen 950 °C-on hőkezelt HA gél, ill. állati csontörleményt tartalmazó mintáknál. (7. ábra, 8. ábra) Megfigyelhető továbbá, hogy a gél tartalmazó minták esetén a wollasztonit fázis reflexiói lényegesen nagyobb intenzitásúak, mint a többi hőkezelt mintánál. A természetes hidroxiapatit jelentős hányadban a nagyobb oldhatóságú β-whitlockittá alakul át, ami csökkentheti az implantátum kötéserősségét, ugyanakkor az erősítő fázisként szolgáló wollasztonit fázis kristályosodása növelheti az implantátum szilárdságát. (11. ábra, 12. ábra, 13. ábra) Ezen kristályosodási folyamatok lejátszódásának pontosabb tisztázásához szükséges vizsgálatokat a későbbiekben szeretném elvégezni, többek között mennyiségi fázisösszetétel meghatározás segítségével.



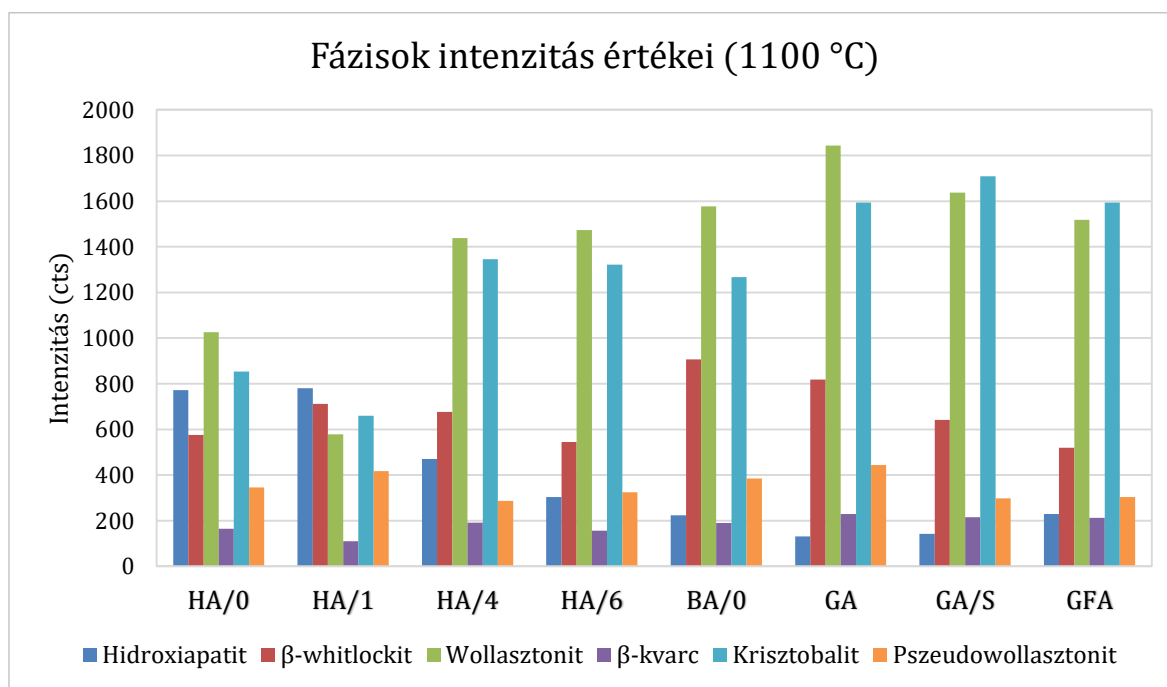
7. ábra: XRD felvétel a BA/0/1050 jelű mintáról.



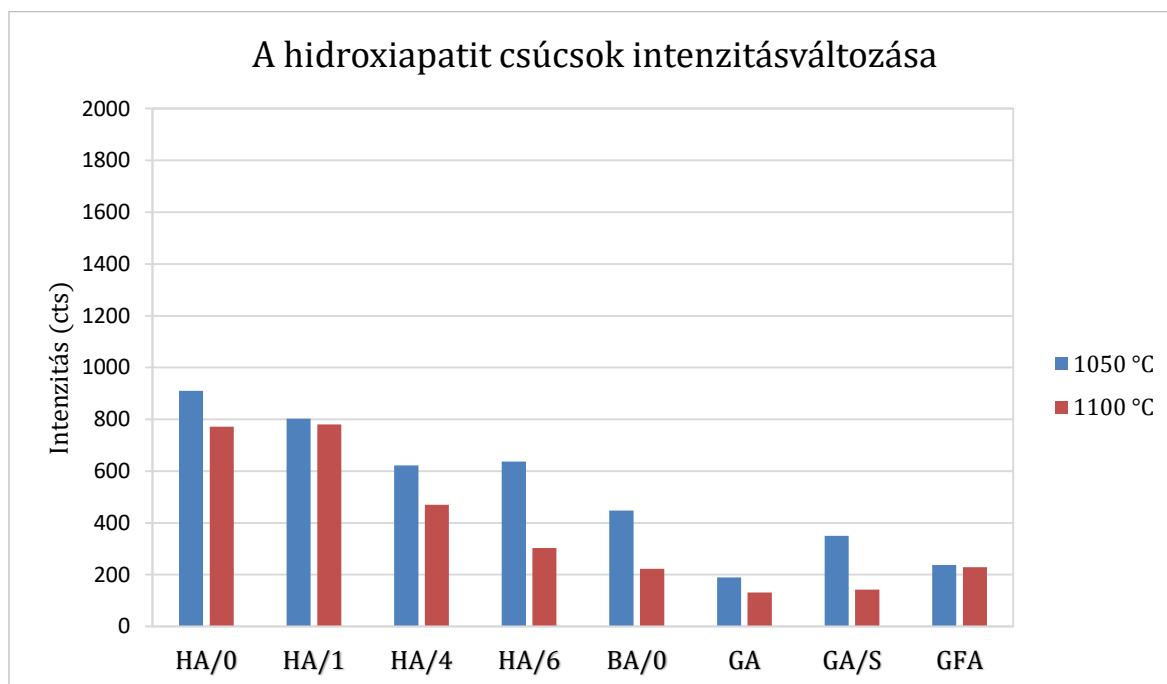
8. ábra: XRD felvétel a GA/1050 jelű mintáról.



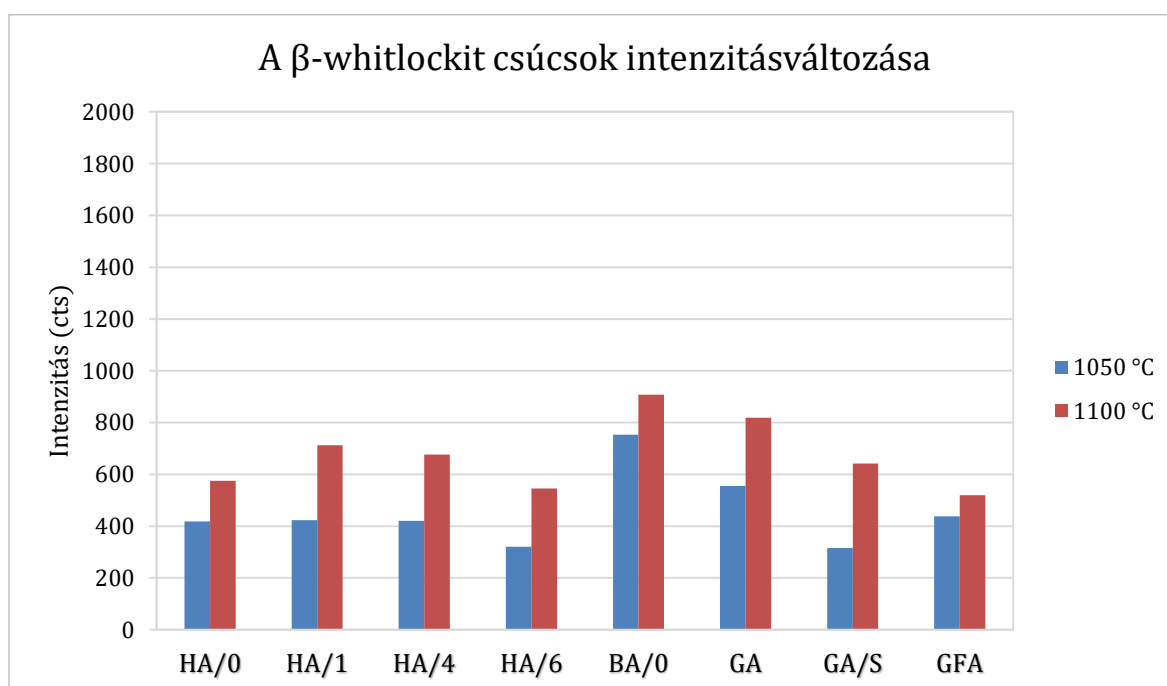
9. ábra: Az 1050 °C csúcshőmérsékleten hőkezelt üvegkerámiák fázisösszetétele.



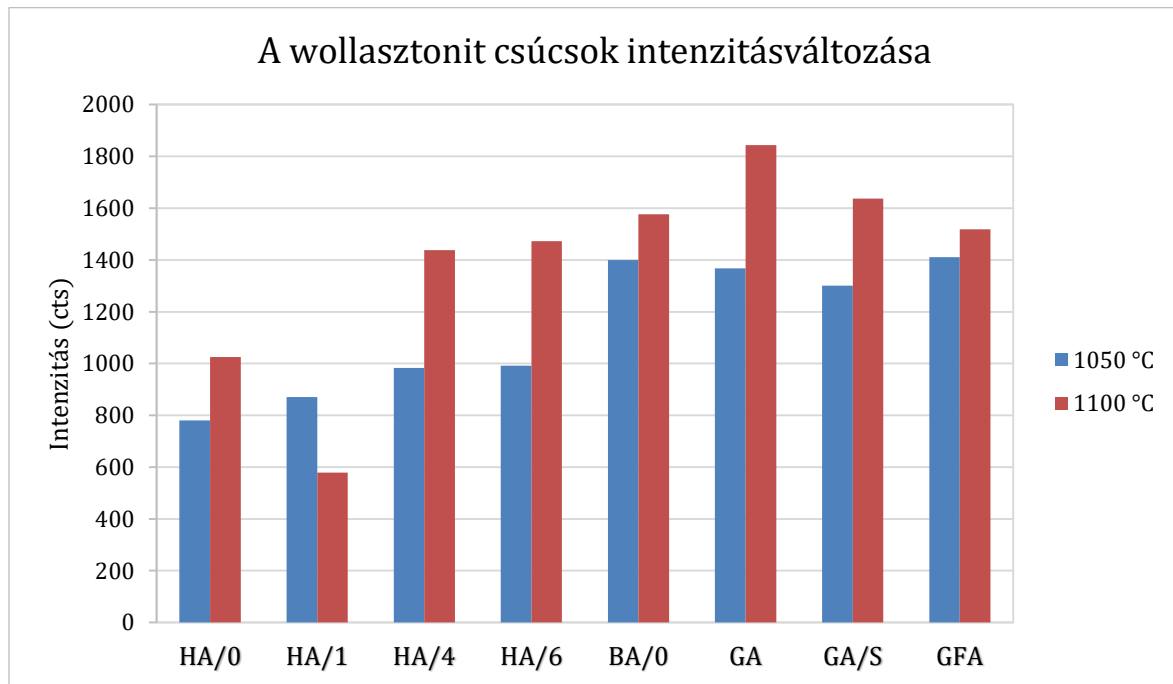
10. ábra: Az 1100 °C csúcshőmérsékleten hőkezelt üvegkerámiák fázisösszetétele.



11. ábra: Az égetési csúcshőmérséklet hatása a hidroxiapatit csúcsok intenzitására.



12. ábra: Az égetési csúcshőmérséklet hatása a β -whitlockit csúcsok intenzitására.



13. ábra: Az égetési csúcshőmérséklet hatása a wollasztonit csúcsok intenzitására.

2.3. Porozitás vizsgálat

A két különböző csúcshőmérsékleten (1050 °C, 1100 °C) hőkezelt próbatestek testsűrűségét, vízfelvételét és látszólagos porozitását az ismert tömegű (m_{sz}) minták desztillált vízben negyed órán át történő forralása után határoztam meg. Ezt követően lemértem a vízzel telített minták tömegét (m_n), míg a minták térfogatának meghatározása hidrosztatikai módszerrel történt. Ennek során mértem a vízzel telített és a vízbe merített minták tömegét (m_v).

Ezekből az adatokból meghatározható a testsűrűség (ρ_t), a vízfelvétel (W) és a látszólagos porozitás (P_L) a következő képletek alapján. (ρ_v a víz sűrűsége.) (15)

$$\rho_t [g/cm^3] = \frac{m_{sz}}{m_n - m_v} \cdot \rho_v \quad (2)$$

$$W [m/m \ %] = \frac{m_n - m_{sz}}{m_{sz}} \cdot 100 \quad (3)$$

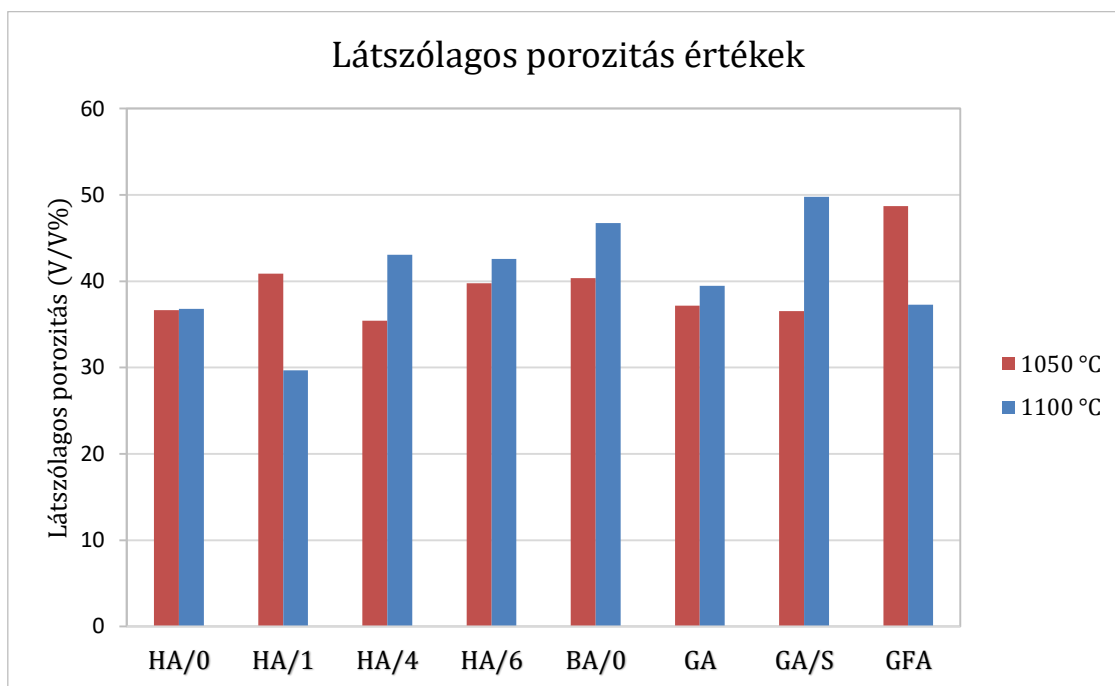
$$P_L [V/V \ %] = \frac{\rho_t \cdot W}{\rho_v} \quad (4)$$

A mérési eredményeket a **7. táblázatban** foglaltam össze.

7. táblázat: A hőkezelt minták testsűrűsége, vízfelvétele és látszólagos porozitása.

Minta	ρ_t (g/cm ³)	W (m/m%)	P _L (V/V%)
HA/0/1050	1,67	21,91	36,64
HA/0/1100	1,72	21,35	36,81
HA/1/1050	1,65	22,10	36,55
HA/1/1100	1,98	15,00	29,69
HA/4/1050	1,61	25,05	40,35
HA/4/1100	1,53	28,17	43,06
HA/6/1050	1,56	23,79	37,18
HA/6/1100	1,56	27,30	42,58
BA/0/1050	1,57	25,33	39,76
BA/0/1100	1,46	32,07	46,74
GA/1050	1,49	27,38	40,88
GA/1100	1,62	24,41	39,48
GA/S/1050	1,49	23,84	35,42
GA/S/1100	1,37	36,28	49,77
GFA/1050	1,41	34,55	48,72
GFA/1100	1,68	22,15	37,28

A különböző szemcseméretű HA jelű hőkezelt henger alakú próbatestek látszólagos porozitását összehasonlítva az adódik, hogy az 1050 °C-on hőkezelt minták átlag értékétől $39,44 \pm 2,89$ V/V%-kal térnek el a különböző szemcseméretű keverékekből készített próbatestekre kapott értékek. Az 1100 °C-on égetett mintáknál ennél valamivel nagyobb, $40,68 \pm 10,98$ V/V% értékek adódtak.



14. ábra: A két csúcshőmérsékleten kiégetett, eltérő összetételű próbatestek látszólagos porozitás értékeinek összehasonlítása.

Az 1050 °C és 1100 °C hőmérsékleten égetett üvegkerámiák testsűrűségének és porozitásának változása azt mutatja, hogy az azonos alapanyagból készült minták esetén is vannak jelentős változások a különböző csúcshőmérsékleteken történő hőkezelés hatására. Szinte minden minta (kivéve HA/1, GFA) esetén a magasabb égetési csúcshőmérséklettel sikerült nagyobb porozitást elérnünk. Kiemelkednek az értékek közül a hidroxiapatit gél tartalmú próbatestek látszólagos porozitás értékei. Összehasonlítva az azonos alapanyagból készült, csupán a CaF_2 adalék hozzáadásában eltérő GA és GFA jelű mintákat, megjelenik a fluor adalék hatása. Az 1100 °C-on égetett GFA jelű minta kisebb porozitását feltehetőleg a CaF_2 olvadékképző, ömlesztő hatása okozza. A biológiai apatit alapanyagból készített biokerámiák porozitása a csapadékos módszerrel előállított hidroxiapatitból és a hidroxiapatit gélből készített minták értékei között mozog, ami feltehetően az eltérő morfológiával függ össze. Az egyes minták morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgálva, a porozitás vizsgálattal összhangban lévő eredményeket kaptam, melyeket a dolgozat további fejezeteiben (2.4.2) ismertetek.

Mindez a későbbiekben vizsgálandó oldhatóságot, ezáltal az implantátum beépülési sebességét is befolyásolhatja. A nagyobb porozitás kedvezőbb oldhatósági tulajdonságokat eredményezhet.

2.4. Különböző csúcshőmérsékleten hőkezelt minták morfológia vizsgálata

2.4.1. Fénymikroszkópos vizsgálat

A különböző csúcshőmérsékleten hőkezelt próbadarabokat Keyence VHX 2000 típusú digitális fénymikroszkóppal vizsgáltam. A felvételeket a darabok töretfelületéről készítettem el száz-, ill. háromszázszoros nagyításban.

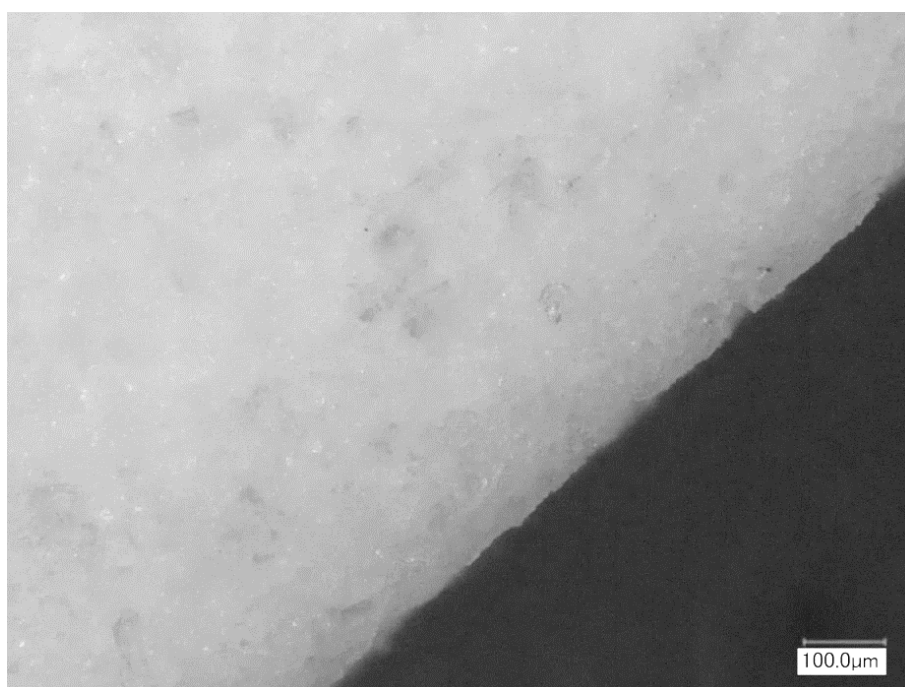
A felvételek alapján elmondható, hogy a legfinomabb szemcsemérettel rendelkező hidroxiapatit gél alapú minták a legtömörebbek, bennük nincsenek elkülönülő nagyméretű szemcsék. A GA jelű minták mellett a BA összetételű kerámiák is egy tömörebb szerkezetet mutatnak, de közel sem annyira tömörek, mint gélből készültek. (19. ábra, 20. ábra) A durvább szemcsékkel rendelkező HA jelű minták esetén nem ilyen egyöntetű a szerkezet, ekkor láthatók nagyobb pórusok és szemcsék is. (15. ábra, 16. ábra) A HA/6/1100 jelű mintáról készített felvételen feltehetőleg egy körülbelül 100 μm -es hidroxiapatit szemcse látható. (21. ábra)



15. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a HA/0/1050 jelű mintáról.



16. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a HA/0/1100 jelű mintáról.



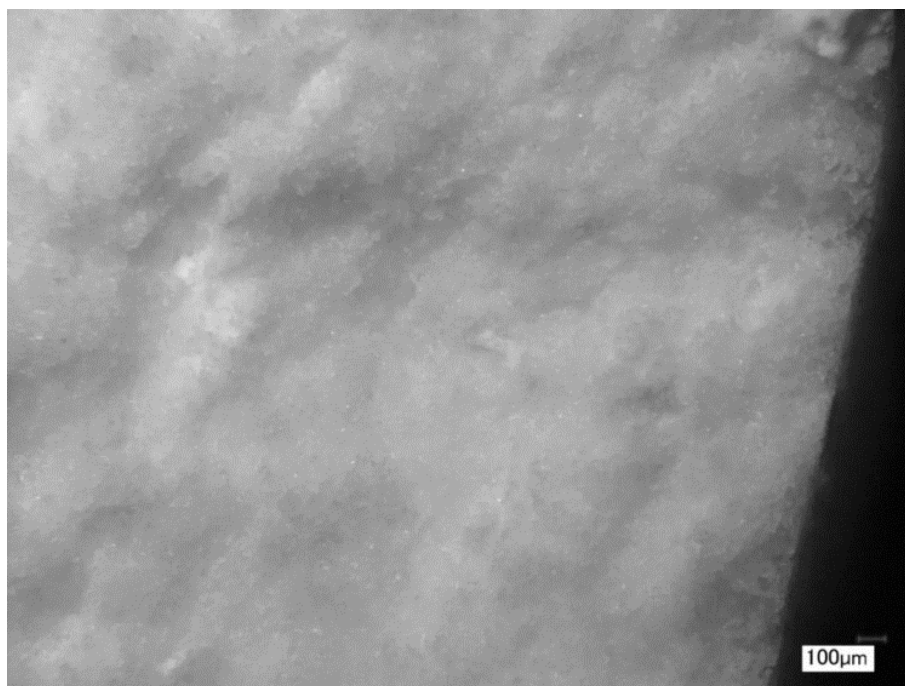
17. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a GFA/0/1050 jelű mintáról.



18. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a GFA/0/1100 jelű mintáról.



19. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a BA/0/1050 jelű mintáról.



20. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a BA/0/1100 jelű mintáról.



21. ábra: Fénymikroszkópos felvétel a HA/6/1100 jelű mintáról.

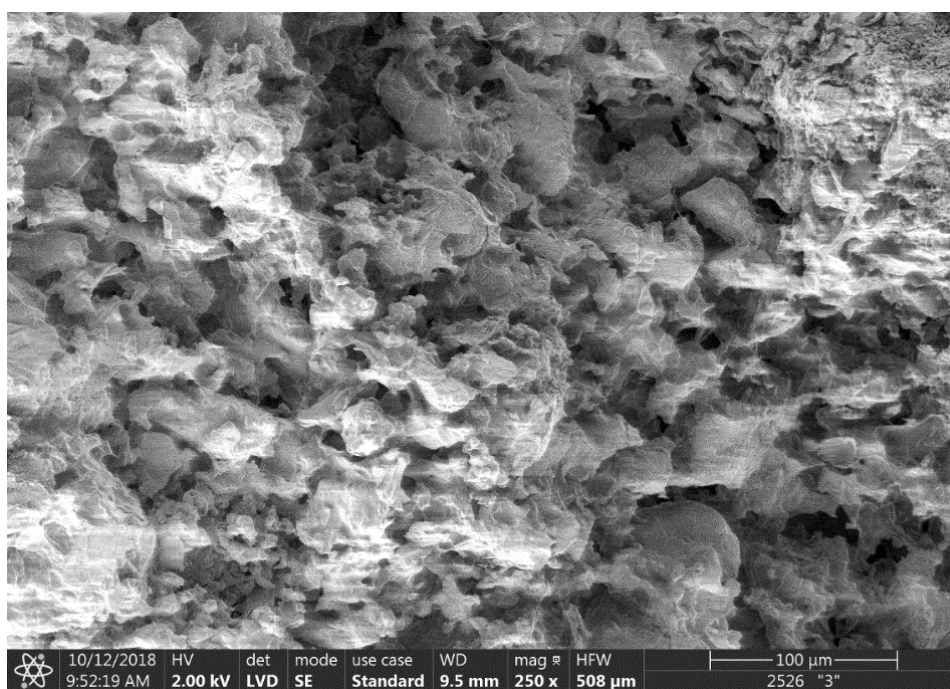
2.4.2. Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat

A különböző csúcshőmérsékleten hőkezelt mintákat Thermo-Fischer Apreo S típusú típusú pásztázó elektronmikroszkóppal is megvizsgáltam a morfológia pontosabb tisztázása érdekében, mivel a fénymikroszkópos felvételek nem adtak elég pontos képet a próbadarabok

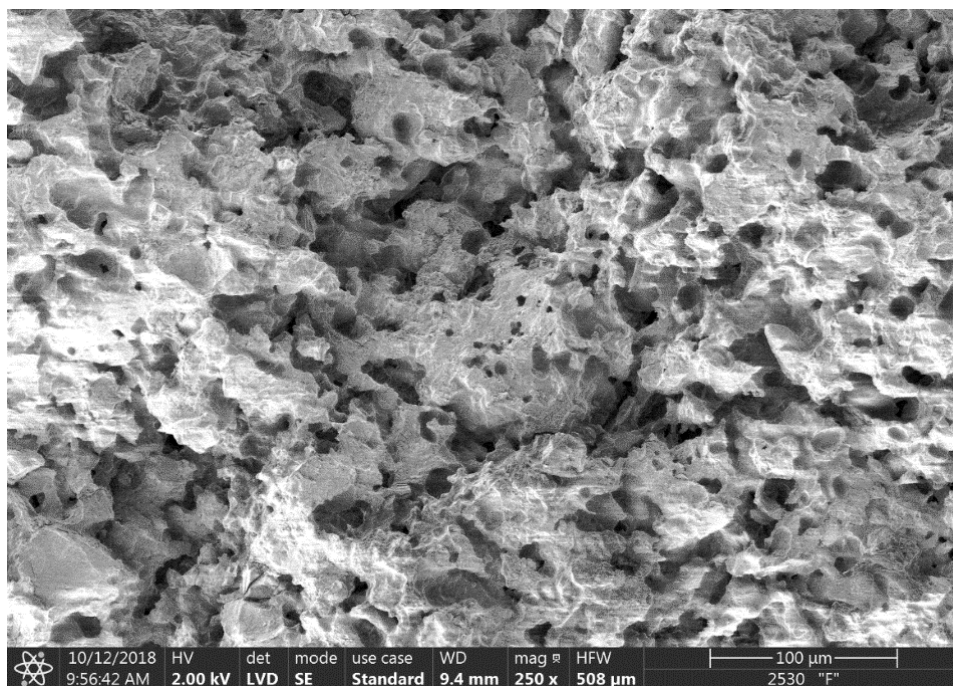
morfológiai szerkezetéről. A mérés során nagyvákuum üzemmódban szekunder elektron (SE) detektoros felvételek készültek, az alkalmazott gyorsító feszültség 2 kV értékű volt.

A SEM felvételek elkészítésénél szerettem volna összehasonlítani a mesterséges, ill. természetes kiindulási anyagból készült darabok szerkezetét. Ezentúl a fent említett fluorid-adalék hatása is érdekes lehet, így a CaF_2 tartalmú mintát is alávetettem a vizsgálatnak.

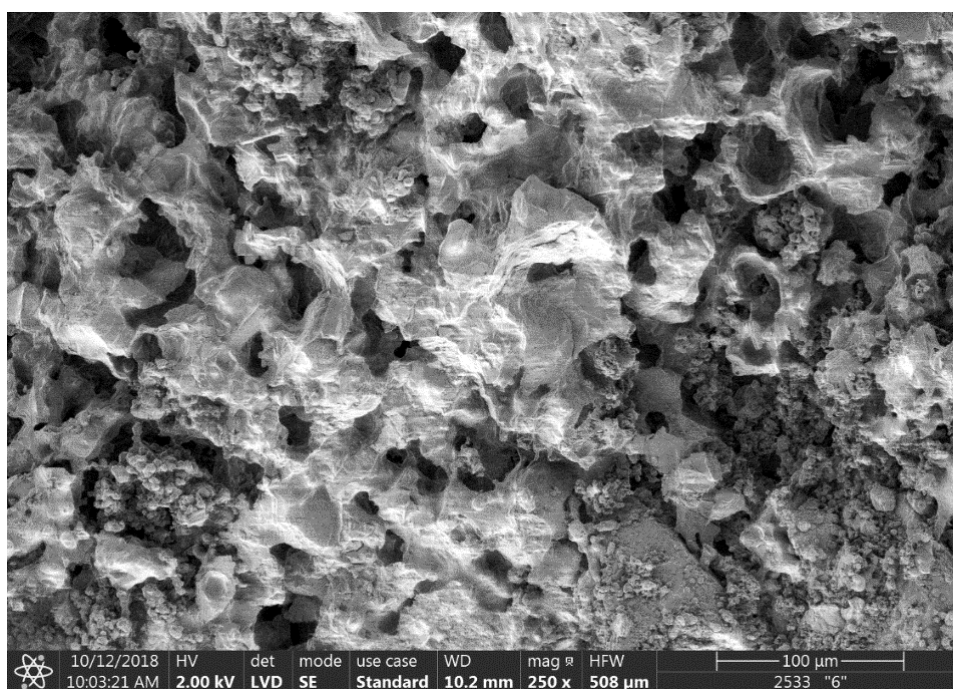
Az eredmények összhangban voltak a porozitás vizsgálatnál tapasztaltakkal, miszerint a legnagyobb porozitással a mesterséges hidroxiapatit őrleményt tartalmazó minták rendelkeznek, míg a HA gél tartalmú darabok adják a legtömörebb szerkezetet. (23. ábra, 24. ábra) Jól látható, hogy a fluor-adalék is szerepet játszik a kevésbé porózus, tömör szerkezet kialakításában. (23. ábra) A HA/6/1100 jelű mintáról 2000-szeres nagyításban készült felvételen 3-20 μm -es mérettartományba eső kalcium-foszfát kristályokat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) láthatunk. (25. ábra)



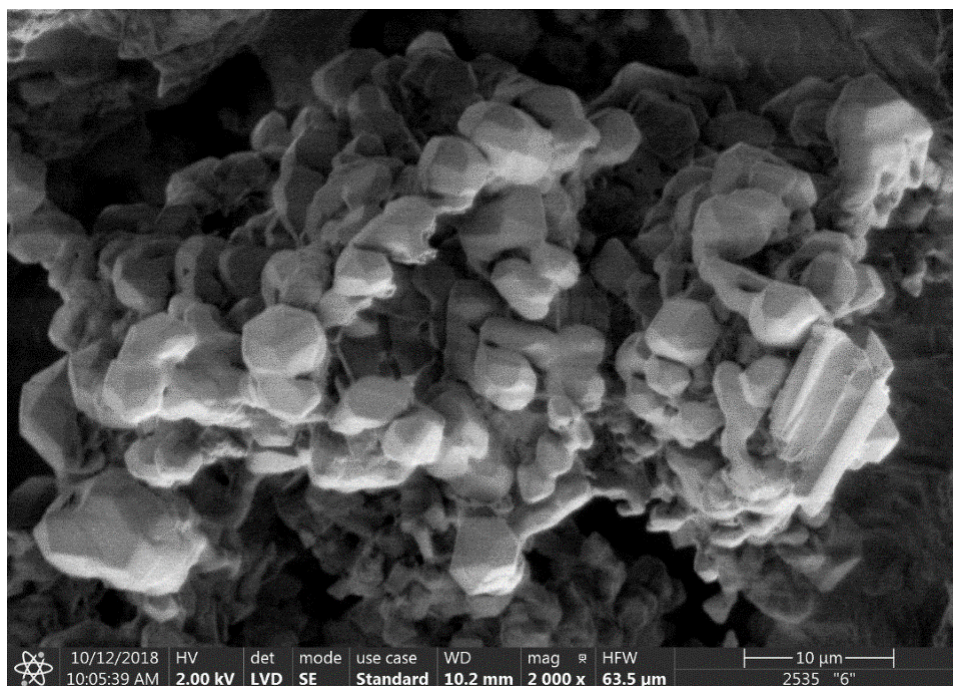
22. ábra: A BA/0/1100 jelű minta SEM képe.



23. ábra A GFA/1100 jelű minta SEM képe.



24. ábra: A HA/6/1100 jelű minta SEM képe.



25. ábra: A HA/6/1100 jelű minta SEM képén látható kalcium-foszfát kristályok.

3. Összefoglalás

Kísérleti munkám célja olyan bioaktív üvegkerámia előállítása volt, melynél a kalcium és foszfát csoportok bevitelére egyrészt hidroxiapatit mellett kis mennyiségű β -whitlockitot tartalmazó állati csontörleményt, másrészt csapadékos módszerrel előállított - β -whitlockitot ugyancsak tartalmazó – hidroxiapatitot, ill. hidroxiapatit gélét használtam. Az előállítás során 35 m/m% adott Ca-foszfát tartalmú alapanyagból és a fritteléssel előállított, 100 μ m-nél kisebb szemcseméretűre porított 65 m/m% bázisüvegből álló keverékeket készítettem. A kalcium-foszfát tartalom rovására bizonyos mintákhoz 0,5 m/m% CaF_2 adalékot is hozzáadtam. Vizsgáltam a homogenizált keverékekből 50 MPa nyomással hidraulikusan préselt 25 mm átmérőjű és 2-3 mm magas pasztillák, 1050 °C és 1100 °C csúcshőmérsékleten hőkezelt próbatestek fázisösszetételét, porozitását és morfológiáját.

A 860 °C-os olvadási hőmérséklettel rendelkező bázisüveg fritt (13) felhasználásával készített hidroxiapatitot, illetve állati csont örleményt tartalmazó üvegkerámiák hőkezelését minimum 900 °C hőmérsékleten célszerű végezni a megfelelő kötőerő kialakításához. Korábbi kísérleteim után, melyekben 900 °C és 1000 °C csúcshőmérsékleten hőkezelt próbatesteket vizsgáltam, most az 1050 °C és 1100 °C csúcshőmérsékleten hőkezelt, állati csontot (BA), és csapadékos módszerrel előállított hidroxiapatitot (HA) tartalmazó üvegkerámiákat tanulmányoztam.

A fázisösszetételt vizsgálva elmondható, hogy a hőmérséklet növelésével a hidroxiapatit bomlásából adódóan nőtt a β -whitlockit mennyisége, a hidroxiapatit tartalom pedig ezzel párhuzamosan csökkent. Magasabb hőmérsékleten a kvarc oldódása miatt csökkent a β -kvarc kristályos fázis mennyisége. A HA gélből készült minták esetében a HA csúcsok lényegesen kisebb intenzitását az okozhatja, hogy a kiindulási hidroxiapatit gél egy kevésbé kristályosodott hidroxiapatitot tartalmaz az előzetesen 950 °C-on hőkezelt alapanyagokhoz képest. Ezen kristályosodási folyamatok lejátszódásának pontosabb tisztázásának érdekében további vizsgálatokat kívánok elvégezni a későbbiekben.

A porozitás vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a különböző csúcshőmérsékleteken történő hőkezelés hatása jelentős az azonos alapanyagból készített próbadarabok esetében is. Elmondható, hogy magasabb égetési csúcshőmérséklettel sikerült nagyobb porozitást elérnünk. Kiemelkednek az értékek közül a hidroxiapatit gél tartalmú próbatestek látszólagos porozitás értékei. A biológiai apatit alapanyagból készített biokerámiák porozitása a csapadékos módszerrel előállított, 950 °C-on hőkezelt hidroxiapatitból és a hidroxiapatit

gélből készített minták értékei között mozog, ami feltehetően az eltérő morfológiával magyarázható. A vizsgálati eredményeket összefoglalva, mindez befolyásolhatja a későbbiekben vizsgálandó oldhatóságot, ezáltal az implantátum beépülési sebességét is. A nagyobb porozitás kedvezőbb oldhatósági tulajdonságokat eredményezhet, s így elősegítheti az élőszervezetbe való hatékonyabb beépülést.

A morfológia vizsgálatánál a fénymikroszkópos felvételek nem adtak megfelelő eredményt, így a pásztázó elektronmikroszkópi képeket emelném ki. Ezek a SEM képek összhangban voltak a porozitás vizsgálatnál tapasztaltakkal, miszerint a legnagyobb porozitással a mesterséges hidroxipatit őrlményt tartalmazó minták rendelkeznek, míg a HA gél tartalmú darabok adják a legtömörebb szerkezetet. A kevésbé porózus, tömör szerkezet kialakításában a fluor-adalék is szerepet játszik.

A továbbiakban szeretném részletesebben megvizsgálni a CaF_2 adalék hatását a bioüvegkerámiák tulajdonságaira. Ehhez több különböző összetételű minta elkészítését tervezem 0,5-3 m/m%-os kalcium-fluorid tartalommal. Emellett a szemcseméret hatására fókuszálva szeretnék több BA és HA tartalmú próbadarabot elkészteni. A vizsgálati módszerek sorát bővítve Vickers-féle mikrokeménység és szimulált testfolyadékban történő kioldódás vizsgálat (SBF) elvégzését tervezem.

Irodalomjegyzék

1. *History of Bioceramics*. **Hulbert, S. F., és mtsai.** 1982., Ceramic International, Vol. 8, old.: 131-140.
2. **BME Anyagtudomány és Technológia Tanszék.** *Kerámia, üveg és fém-kerámia implantátumok.*
3. *A biokerámia, mint az orális enosseális implantátum anyaga.* **Dr. Vajdovich, István és Dr. Kacsalova, Lídia.** 78., 1985., Fogorvosi Szemle, old.: 226.
4. **Schneider, S. J., és mtsai.** *Ceramics and Glasses.* USA : ASM International, Engineered Materials Handbook, Vol 4., 1991. old.: 1096.
5. *Glass-Ceramic Technology.* **Höland, W. és Beall, G.** Westerville : ismeretlen szerző, 2002., The American Ceramic Society, old.: 146.
6. *An introduction to bioceramics.* **Hanch, Larry L.** 2013., Imperial College Press, old.: 229-.
7. *Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone.* **Joschek, S., és mtsai.** 2000., Biomaterials, 21, old.: 1645-1658.
8. *α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications.* **Carrodegua, R. G. és De Aza, S.** 2011., Acta Biomaterialia, 7, old.: 3536-3546.
9. *In Vivo Reactions of the Porous Hydroxyapatite, B-TCP and B-TCP Coated Hydroxiapatite.* **Ioku, K., és mtsai.** Finnland : ismeretlen szerző, 1994., Bioceramics.
10. *Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones.* **Khoo, W., et al.** 2015, Procedia Manufacturing, 2, pp. 196-201.
11. *Influence of osteon area fraction and degree of orientation of HAp crystals on mechanical properties in bovine femur.* **Yamada, Satoshi, és mtsai.** 2013., Journal of Biomechanics, 46, old.: 31-35.
12. *Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone.* **Niakan, A., és mtsai.** 2015., Ceramics International, 41, old.: 3024-3029.
13. **Feil, J.** *Állati csontok hőkezelésével és csapadékos módszerrel előállított kalcium-foszfátokat tartalmazó bioaktív üvegkerámiák vizsgálata, Szakdolgozat.* Veszprém : Pannon Egyetem, 2014. old.: 14-15.

14. **Kotsis, M., és mtsai.** *M. Kotsis, M. Eniszné, T. Korim, M. Lenkei, L. Lajos és P. Zimány* *Characterization of plasma sprayed coatings.* Veszprém : Hungarian Journal of Industrial Chemistry, 1998. old.: 1-6.

15. *Nemfémes szerkezeti anyagok technológiája laboratóriumi gyakorlat.* **Veszprém : Pannon Egyetem, 2013.**



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018**



**Módosított TiO_2 fotokatalizátorok előállítása és
aktivitásuk vizsgálata a látható fény tartományában**

Készítette: Fonyó Máté

Témavezető: Szabóné dr. Bárdos Erzsébet

Mérnöki Kar, Általános és Szervetlen Kémia Intézeti Tanszék

A pályamunka lezárásának dátuma: 2018. november 4.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	77
2. Irodalmi áttekintés	78
2.1 Nagyhatékonyságú oxidációs eljárások	78
2.1.1 Hidrogén-peroxid fotolízis	78
2.1.2 Fenton reakció	78
2.1.3 Foto-Fenton reakció	78
2.1.4 Ózon alkalmazása	79
2.2 Heterogén fotokatalízis	79
2.2.1 Titán-dioxid	81
2.3 A heterogén fotokatalízis alkalmazási lehetőségei	82
2.3.1 Szennyvíz- és levegőtisztítás	82
2.3.2 Szuperhidrofil tulajdonság	83
2.3.3 Öntisztuló felületek	83
2.4 A TiO_2 hatékonyságának növelése	84
2.4.1 Fényérzékenyítés	84
2.4.2 Felületi módosítás	86
2.4.3 Adalékolt katalizátor előállítása	86
2.5 A fotokatalitikus aktivitás jellemzése	89
3. Célkitűzés	92
4. Kísérleti rész	93
4.1 Felhasznált anyagok	93
4.2 A katalizátor előállítása	93
4.3 Fizikai jellemzés	94
4.3.1 Termikus analízis	94
4.3.2 Pásztázó elektronmikroszkópia	94
4.3.3 Raman spektroszkópia	95
4.3.4 Röntgendiffrakciós vizsgálat	96

4.3.5	Fajlagos felület	96
4.3.6	Gerjesztési küszöbenergia meghatározása	97
4.4	Fotoaktivitás vizsgálata	99
4.4.1	Kísérleti körülmények	99
4.4.2	A kísérletek végrehajtása	102
5.	A kísérleti eredmények értékelése	104
5.1	Fizikai jellemzés	104
5.1.1	Termikus analízis	104
5.1.2	Morfológiai vizsgálatok	108
5.1.3	Fázisok azonosítása	110
5.1.4	Fajlagos felület	112
5.1.5	Gerjesztési küszöbenergia meghatározása	114
5.2	Fotokatalitikus aktivitás.....	116
5.2.1	Aktivitás UV fényben.....	116
5.2.2	Aktivitás látható fényben	123
6.	Terveim a folytatásra.....	127
7.	Összefoglalás	129
	Irodalomjegyzék	131
	Köszönetnyilvánítás	135
	Mellékletek	136

1. Bevezetés

A mai világban egyre égetőbbek a környezettel kapcsolatos problémák. A mezőgazdaság, az intenzív ipar, a fogyasztói társadalom mind károsítja valamilyen módon a természetet. A környezetvédelem egyik leghangsúlyosabb része a vizek védelme. A Földön csak korlátozott mennyiségben áll rendelkezésünkre édesvíz, ám a mindennapokban számos módon kerülnek bele szerves vagy szervetlen anyagok, melyek a hagyományos víztisztítási módszerekkel gyakran nem távolíthatók el teljes mértékben. A vízben maradó szennyezők a természetbe kijutva átalakulhatnak toxikusabb vegyületekké, akumulálódhatnak az állatokban és a növényekben, és így akár az emberhez is eljuthatnak.

Ezért szükséges a kémiai úton végrehajtott víztisztítási módszerek fejlesztése. Fontos, hogy az eljárások gazdasági, technológiai és egészségügyi okok miatt csak korlátozott számú és mennyiségű kémiai adalékot használjanak fel, s főként olyanokat, amelyeknek bomlástermékei természetes anyagok. További elvárás, hogy kis energiafelhasználás mellett a szennyezők széles skálájával szemben eredményesen bevetethetők legyenek.

Ezeknek a kihívásoknak felelnek meg az ún. *nagyhatékonyságú oxidációs eljárások*. Közös jellemzőjük, hogy a napenergia vagy más energia felhasználásával oxidatív szabadgyököket, főként hidroxilgyököket generálnak, amelyek a szerves anyagok széles körét oxidálják.

A nagyhatékonyságú oxidációs eljárások közé tartozó heterogén fotokatalízis a 20. század végén vált intenzív kutatási területté. Nemcsak a környezetvédelem, a víz- és a levegőtisztítás terén rejlik benne hatalmas potenciál, de az élet sok más területén is alkalmazható. Napjainkban számos kutatócsoport vizsgálja mind laboratóriumi, mind félüzemi kísérletekben a félvezető anyagok fotoaktivitásán alapuló módszert.

Szakmai munkámat a Pannon Egyetem Általános és Szervetlen Kémia Intézeti Tanszékén végzem. A kutatócsoport célja a fotokatalízis elvén működő öntisztuló padlóburkolat létrehozása. Feladatom beltéren is alkalmazható, látható fénnel gerjeszthető fotokatalizátor előállítása, amely hatékonyan képes lebontani a szennyezőanyagokat, kórokozókat.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Nagyhatékonyságú oxidációs eljárások

Nagyhatékonyságú oxidációs eljárásoknak („*Advanced Oxidation Processes*”) nevezzük azokat a kémiai folyamatokat, amelyek reaktív oxidáló részecskéket, főleg hidroxilgyököket generálnak. A hidroxilgyök rövid élettartamú, elektrofil karakterű, különösen erős, nem szelektív oxidáló ágens (oxidációs potenciálja 2,8 eV, amelynél csak a fluoré nagyobb) [1]. Hidroxilgyökök előállítására többféle módszer ismert, például:

- Hidrogén-peroxid fotolízis
- Fenton reakció
- Foto-Fenton reakció
- Ózon alkalmazása
- Heterogén fotokatalízis

2.1.1 Hidrogén-peroxid fotolízis

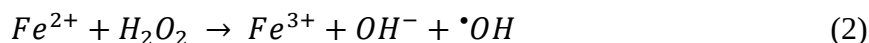
A szennyeződést tartalmazó oldatot H₂O₂ jelenlétében sugározzák be UV fénnel. A 280 nm-nél rövidebb hullámhosszú sugárzás a hidrogén-peroxidot két hidroxilgyökre bontja.



A folyamat erősen pH-függő. E módszer előnye, hogy a hidrogén-peroxid alkalmazása egyszerű. Hátránya, hogy a reakció végbemeneteléhez nagy energia szükséges [2].

2.1.2 Fenton reakció

A XIX. században felfedezett reakció ígéretesnek tűnik a szennyvíztisztításban, ugyanis a Fenton-reagenssel sikerült például – az egyébként viszonylag nehezen bontható – fenolokat is degradálni [3]. A hidroxilgyökök képződésének útja:



2.1.3 Foto-Fenton reakció

A foto-Fenton reakció annyiban különbözik a fent említett Fenton reakciótól, hogy a keletkező Fe³⁺ ionok (2) már 300 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú fény hatására is redukálódnak, így az UV és a látható fény tartományába eső sugárzás jelentősen gyorsítja a

reakciót. A folyamat során hidroxilgyök képződik (3), valamint a regenerálódott Fe²⁺ ismét képes reakcióba lépni a hidrogén-peroxiddal (2) [2].



A foto-Fenton reakcióban a Fe(II) oxidálódik, majd fény hatására redukálódik, azaz nem fogy el a rendszerből, így állandó Fe(II) koncentráció érhető el. Az eljárás technológiai alkalmazása mellett szól olcsósága és az egyszerű üzemvitel. Hátránya, hogy az alkalmazott vas-sók az oldatban maradnak.

2.1.4 Ózon alkalmazása

Az ózon önmagában is erélyes oxidálószer, hatása azonban fokozható, ha ultraibolya fénnel sugározzuk be, elősegítve a gyökképződést. Ilyenkor az ózon reakcióba lép a vízzel, és hidrogén-peroxid keletkezik (4). Az UV sugárzás gyökkoncentráció növelő hatása a hidrogén-peroxid bomlásának köszönhető (1).



Az ózon és az UV fény együttes alkalmazása széles körben elterjedt: szennyezett vizek kezelésére és az ivóvíz fertőtlenítésére is használják [4, 5].

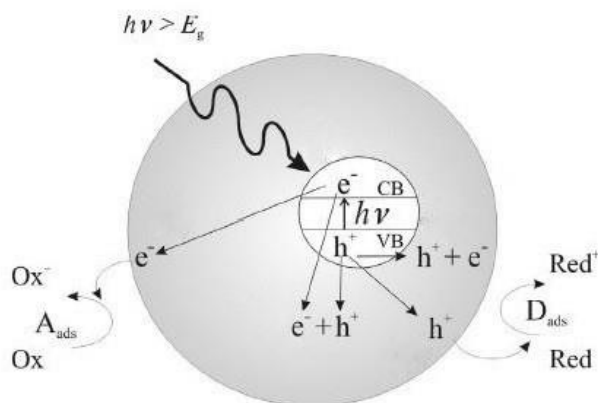
2.2 Heterogén fotokatalízis

A heterogén fotokémiai rendszerek kulcsfontosságú alkotórészei a kisméretű félvezető (semiconductor, S) részecskék, melyeket speciális elektronszerkezetük tesz alkalmassá a fotokémiai folyamatok katalizálására. A betöltött – általában molekulapálya karakterű – vegyértéksávot (valence band, vb) meghatározott, az anyagi minőségre jellemző energiaszélességű tiltott sáv választja el a betöltetlen – többnyire nemkötő molekulapálya karakterű – vezetési sávától (conduction band, cb).

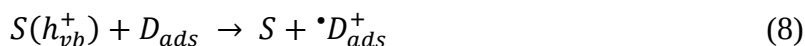
Ha a gerjesztés fénnel történik, a foton energiájának el kell érnie a vegyértéksáv és a vezetési sáv energiaszintjének különbségét (gerjesztési küszöbenergia, E_g). Amennyiben ez teljesül, akkor a sugárzás hatására elektronok kerülnek át a vegyértéksávból a magasabb energiaszintű vezetési sávba, pozitív lyukakat (h^+) hagyva maguk után (5) (1. ábra).

Az elektron-lyuk pár gyors rekombinációja a félvezető belsejében és a felületén is bekövetkezhet, ekkor hő termelődik (6). Ha csak ezek a folyamatok játszódnak le, a félvezető nem mutat fotoaktivitást. A rekombinációval verseng a felületen lejátszódó töltésátvitel. A

vezetési sáv alsó energia szintje az elektron aktuális redukciós potenciálját, míg a vegyértéksáv felső energiaszintje a lyuk oxidáló képességét határozza meg. A felületen adszorbeálódott molekulát (A_{ads}) a vezetési sáv elektronja redukálhatja, ha a redoxipotenciálja pozitívabb, mint a vezetési sáv potenciálja (7). A lyuk akkor oxidálhat (vehet fel elektront), ha negatívabb az adszorbeálódott anyag (D_{ads}) redoxipotenciálja, mint a vegyértéksáv potenciálja (8) [6].



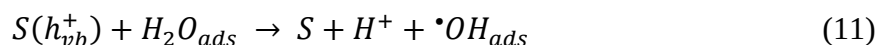
1. ábra: A gerjesztett félvezetőn végbemenő folyamatok.



Elektronakceptor molekula általában az oldott oxigén, jelenlétében a hatékony elektronbefogás következtében kicsi az elektron-lyuk rekombináció valószínűsége. A reakcióban szuperoxid-gyökanion keletkezik (9).



Elektron donor molekula lehet a katalizátor felületén adszorbeálódott OH⁻/víz (10, 11).



A heterogén fotokatalízis nagy hatékonysága abban rejlik, hogy mind az anódos, mind a katódos reakcióban erélyes oxidáló részecskék (hidroxilgyökök és szuperoxid-gyökanion) keletkeznek, melyek képesek a szennyezők széles skáláját lebontani.

2.2.1 Titán-dioxid

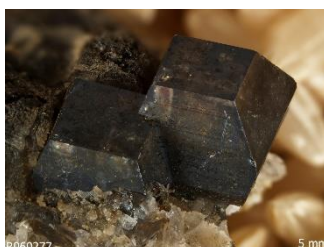
A félvezető anyagok átmenetet képeznek a vezető és a szigetelő anyagok között. Nagyon alacsony hőmérsékleten (a vegyértéksáv és a vezetési sáv helyzetéből adódóan) szigetelőként viselkednek, a hőmérséklet emelésével azonban vezetőképességük exponenciálisan növekszik.

A fotokémiai reakciókban alkalmazott félvezető katalizátoroknak számos követelményt kell kielégíteniük. Megfelelő fotoaktivitással kell rendelkezniük, képesnek kell lenniük a látható és/vagy az UV fény hasznosítására. Lényeges tulajdonság a biológiai és a kémiai inertség is. A bevilágítás során kialakuló speciális körülményeket is bírniuk kell, azaz fontos, hogy fotostabilak legyenek, fotoanódikus korrózióra ne legyenek hajlamosak. Említésre méltó szempont az alacsony előállítási ár, a visszanyerhetőség és a többszöri felhasználhatóság is. Az eddigi kutatások azt mutatják, hogy az itt felsorolt kritériumok alapján a titán-dioxid az egyik legmegfelelőbb katalizátor, de azt is meg kell említeni, hogy egyéb félvezető oxidok (például Cu_2O , ZnO , MoO_3) és szulfidok (például PbS , CdS) fotokatalizátorként történő alkalmazhatóságát is széles körben vizsgálják [7].

A titán-dioxid fehér színű félvezető anyag, melynek három polimorf módosulata ismert: a rutil, az anatáz és a brookit.



2. ábra: Rutil.



3. ábra: Anatáz.



4. ábra: Brookit.

- A rutil (2. ábra) tetragonális kristályrendszerű, vörösbarna, vörös vagy sárga színű kristály. Főleg magmás kőzetek járulékos ásványa, ám gyakran képez zárványokat is kvarcban vagy korundban. A természetben előforduló kristályok színét a szennyező nióbbium(V) és vas(III)ionok okozhatják.
- Az anatáz (3. ábra) barna, sötétkék vagy fekete színű, tetragonális kristályrendszert alkot. Metamorf és magmás kőzetekben is megtalálható. Magasabb hőmérsékleten a termodinamikailag stabil rutil módosulattá alakul.

- A brookit (4. ábra) barna, sárgásbarna színű ortorombos kristály. Az anatózhoz hasonlóan hevítés hatására átalakul rutillá. Magas előállítási költségei miatt nem használják fotokatalizátorként.

A három módosulat közül fotokatalitikus reakciókban az anatóz aktivitása a legnagyobb, ám kis mennyiségű rutil is szükséges a még jobb hatékonyság eléréséhez. A kereskedelmi forgalomban kapható titán-dioxid termékek közül a Degussa P25 rendelkezik a legjobb fotokatalitikus tulajdonságokkal. Ez a katalizátor 80% anatóz és 20% rutil fázist tartalmaz, fajlagos felülete $50 \text{ m}^2/\text{g}$.

A titán-dioxid egyik legnagyobb hátránya, hogy meglehetősen széles a tiltott sávja (az anatózé $3,2 \text{ eV}$), így csak nagy energiájú (UV) sugárzással lehet gerjeszteni. Mivel a Föld felszínére érkező fénynek csupán mintegy 5%-a ibolyántúli sugárzás, ezért a titán-dioxid a napenergiának csak kis hányadát tudja hasznosítani.

Ha sikerülne a látható tartományban is jól működő, hatékony katalizátort előállítani, akkor ez az eredmény nemcsak környezetvédelmi, de gazdasági szempontból is előnyös lenne, hiszen egy megújuló energiaforrás közvetlen felhasználásával lehetne olyan problémákat megoldani, amelyek eddig költséges berendezéseket igényeltek. Látható fénnel is gerjeszthető katalizátor birtokában például lehetőség nyílna a fotokatalízis széleskörű beltéri felhasználására is, ahol gyakorlatilag nincs ibolyántúli sugárzás [6].

2.3 A heterogén fotokatalízis alkalmazási lehetőségei

Fujishima és Honda felfedezése óta [8] a heterogén fotokatalízis széleskörűen kutatott területté vált. Napjainkban már egyre több helyen használják: kiválóan alkalmazható a szennyvíz- és a levegőtisztításban, vagy akár a fotokatalízis elvén működő öntisztuló és önfertőtlenítő felületek létrehozásában is. A leggyakrabban alkalmazott katalizátor – a titán-dioxid – felhasználható cseppmentes, hidrofíli felületek előállítására, melyeket az építészetben és a közlekedésben egyaránt lehet hasznosítani, valamint kutatják a daganatos elváltozások heterogén fotokatalitikus kezelésének lehetőségét is [9].

2.3.1 Szennyvíz- és levegőtisztítás

A technológia fejlődésével párhuzamosan egyre nagyobb hangsúly helyeződik a természet megóvására, így a vizek védelmére is. Habár a mai víztisztítási módszerek megfelelően fejlettek ahhoz, hogy a csatornába befolyó vizet újra fogyaszthatóvá tegyék, mégis gyakran előfordul, hogy a vízben olyan szennyezők maradnak, melyek a környezetre vagy az

emberekre ártalmasak. Ezek eltávolítására a heterogén fotokatalízis egy egyszerű, környezetkímélő megoldást jelenthet [9].

A katalizátor bevilágításakor keletkező reaktív hidroxilgyökök és szuperoxid-gyökanionok számos vegyületet képesek degradálni. A hatékonyság természetesen függ a katalizátor aktivitásától és mennyiségétől, a bevilágítási időtől, az oxigén koncentrációjától, valamint a szennyezőanyag minőségétől és mennyiségétől. A heterogén fotokatalízis előnye, hogy megújuló erőforrás (napenergia) felhasználásával lehet megtisztítani a szennyvizet, illetve a katalizátor egyszerű szűréssel eltávolítható és újrahasznosítható.

A nagyvárosok egyik legfontosabb problémája a levegő tisztán tartása. Ma már több olyan légtisztító berendezést is használnak – akár kórtermekben vagy műtőkben –, melyek a fotokatalízis elvén működnek. A levegőt TiO_2 szemcsék között átáramoltatva a káros anyagok (pl. NO_x , SO_x , CO , CH_2O , kórokozók) adszorbeálódnak a katalizátor felületén, majd UV fény hatására a reaktív részecskék oxidálják a szennyezőket, melyek így kevésbé ártalmas vegyületekké alakulnak (pl. CO_2 és H_2O) [10].

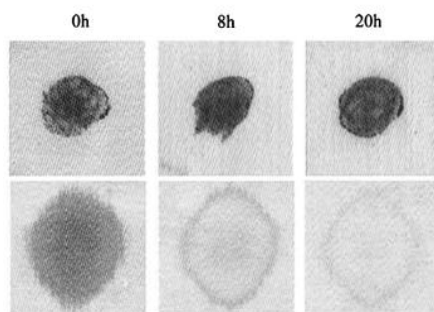
2.3.2 Szuperhidrofil tulajdonság

Ha titán-dioxiddal módosított felületet ibolyántúli sugarakkal világítunk be, megnő a felületi hidroxilcsoportok száma, így jelentősen nő a hidrofil jelleg. Ez abban mutatkozik meg, hogy a felületen lévő vízcsepp nedvesítési szöge egészen 0° -ra lecsökken. Abban az esetben, ha a TiO_2 -ot szilícium tartalmú anyagra viszik fel, akkor a hidrofil felület sötétben akár napokig is megtarthatja ezt a tulajdonságát [10].

A szuperhidrofil karakterű TiO_2 jelentős szerepet játszhat a jövőben a közlekedésben: a jelzőtáblákat, tükröket, szélvédőket bevonva olyan felületek hozhatók létre, amelyeken a víz egybefüggő réteget alkot, így javulnak a látási viszonyok. Az ablakokat titán-dioxiddal bevonva megelőzhető a bepárasodás és a cseppképződés, ezért például üvegházakon alkalmazva nőhet a bejutó fény mennyisége.

2.3.3 Öntisztuló felületek

Ha egy felületet – legyen az textil, csempe, beton vagy üveg – TiO_2 -dal módosítunk, akkor olyan tulajdonságú anyaghoz jutunk, amely akár önmagától is megtisztulhat. A fénnel történő gerjesztés hatására keletkező reaktív részecskék képesek lebontani a felületen található szennyeződések, kémiai anyagokat. Textilen alkalmazva például megfelelő bevilágítás esetén szemmel láthatóan halványul a borfolt (5. ábra) [10].



5. ábra: Borfolt degradációja TiO_2 -dal kezelt textilen [10].

(A felső sorban a kezeletlen textil, alatta a TiO_2 -dal kezelt minta látható.)

A fotokatalitikus üveget fel lehet használni például felhőkarcolókon, ugyanis az üvegre lerakódott szennyeződés bontható a napfényben található UV sugarak segítségével. Ezzel a technikával spórolni lehet az ablaktisztítás költségein, mely ekkora épületek esetén már igen jelentős. Csempéken vagy betonon alkalmazva egyszerűbb lesz a felületek tisztán és sterilen tartása, amely egészségügyi szempontból nagyon fontos.

Az öntisztuló felületeknek számos kritériumnak kell megfelelniük. Lényeges, hogy a félvezető gerjesztési küszöbenergiája alacsony legyen, mivel beltéri alkalmazás esetén kizárólag látható fénnel történhet a gerjesztés. A fotokatalizátort megfelelően kell rögzíteni a felülethez: a mátrix, amelybe beágyazásra kerül nem akadályozhatja a katalitikus reakciókat, valamint a rögzítő anyagnak ellenállónak kell lennie a reaktív részecskék oxidáló hatásával szemben. Szem előtt kell tartani azt is, hogy a bevonattal ellátott felületnek simának kell lennie, hogy a degradálódott szennyezőket és kórokozókat egyszerű öblítéssel el lehessen távolítani. Lényeges a kopásállóság is, hiszen ellenkező esetben csökkenne a hatékonyság, illetve a fotokatalizátort időről időre pótolni kellene, amely gazdaságilag szintén nem előnyös.

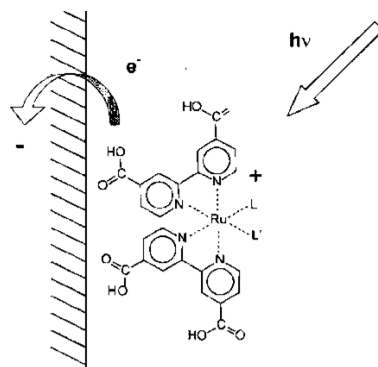
2.4 A TiO_2 hatékonyságának növelése

A félvezető fotokatalizátor hatékonyságának javítására számos módszer ismert. Ide tartozik a fényérzékenyítés, a katalizátor felületének módosítása, valamint különböző vegyületekkel adalékolt katalizátor előállítása.

2.4.1 Fényérzékenyítés

Fényérzékenyítésről akkor beszélünk, ha a fény nem közvetlenül a szilárd félvezetőt gerjeszti, hanem valamilyen, a felületen adszorbeálódott, kiterjedt π elektronrendszerrel rendelkező fém

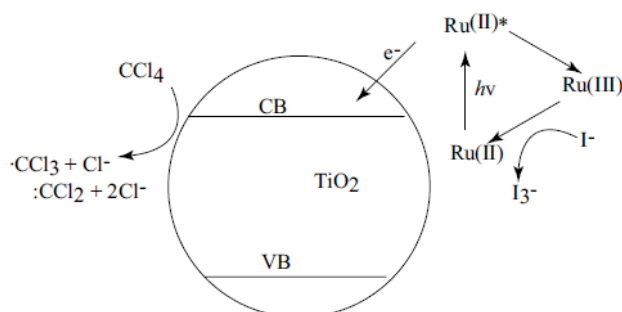
komplexet (6. ábra). Így a gerjesztéshez lényegesen kisebb energia szükséges, lehetővé téve a látható fény hasznosítását is.



6. ábra: A fényérzékenyítés folyamata [11].

Vinu és munkatársai EosinY-nal és fluoreszceinnel érzékenyítették a titán-dioxidot, s vizsgálták a fenol, valamint a különböző klórral szubsztituált fenolok lebomlását a látható fény tartományában [12]. A kísérletek során a festékmolekulák jelentős adszorpcióját tapasztalták (85%), míg a fenol felületi megkötődése csak 5%-os. Számottevő a különbség az aktivitásokban a Degussa P25-höz képest: 5 óra alatt az érzékenyített katalizátor a fenol 66%-át lebontotta, ez az érték a referencia katalizátor esetén mindösszesen 15% volt. A klórszármazékok lebomlása az EosinY-nal érzékenyített katalizátorokon elérte a 75%-ot.

Fung és munkatársai [tris(3-(2'-piridil)-pirazol)-ruténium(II)]-komplexet rögzítettek szilikátokkal a TiO₂ felületéhez [13]. A fényérzékenyített katalizátort szén-tetraklorid degradációjához alkalmazták 450 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú fény mellett, KI áldozati elektrondonor jelenlétében (7. ábra). 3 órás bevilágítás alatt a CCl₄-dal telített oldatban a modellvegyület koncentrációja 3,2 ppm-ről 0,4 ppm-re csökkent, míg TiO₂ vagy bevilágítás nélkül a koncentráció nem változott.



7. ábra: Ru-tartalmú fényérzékenyítő működése és a CCl₄ degradációja [12].

2.4.2 Felületi módosítás

A katalizátor felületének módosítása hasonló elven működik, mint a fényérzékenyítés: a módszerrel növelhető a katalizátor által elnyelt fényhányad. Ebben az esetben a szilárd TiO_2 felületére felvitt fényelnyelő anyag nem kerül az oldatfázisba, így az érzékenyített katalizátort különböző bevonatokban is lehet alkalmazni. Ehhez viszont olyan érzékenyítőt kell találni, amely megfelelően kötődik a félvezető felületéhez, nem kopik le, biztosított a megfelelő töltésvitel, illetve amelyet a fotokatalitikus folyamatokban keletkező reaktív részecskék nem degradálnak.

Znad és Kawase tiokarbamid felhasználásával kénnel módosították a Degussa P25 TiO_2 -ot [14]. Kalcinálás után a kén megjelent a titán-dioxid felületén, amely növelte a katalizátor fotoaktivitását. A módosítás során a gerjesztési küszöbenergia 3,2 eV-ról 2,8 eV-ra csökkent, a modellvegyületként használt Orange II napsugárzás hatására 23%-kal gyorsabban alakult át a módosítatlan Degussa P25 TiO_2 -hoz képest, az oldat TOC értéke 75%-kal csökkent.

Sharma és munkatársai rézklaszterekkel módosították a titán-dioxid felületét [15]. Különböző módszerekkel vizsgálták a katalizátorok optikai tulajdonságait: DFT modellezéssel, UV-Vis spektroszkópiával, XPS analízissel és fotoelektrokémiai technikával. Az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy a réz klaszterek csökkentik a félvezető gerjesztési küszöbenergiáját, azaz az abszorpciós spektrum vöröseltolódását okozzák. Emellett a szerzők hangsúlyozzák a számítógépes tervezésben rejlő nagy potenciált, mely alkalmas lehet új, hatékonyabb fotokatalizátorok tervezésére.

2.4.3 Adalékolt katalizátor előállítása

Katalizátorok előállítására gyakori módszer az úgynevezett szol-gél eljárás. Az általában szerves oldószerben (pl. abszolút etanolban) végzett folyamat során valamilyen titán perkurzor (pl. titán(IV)-etoxid, titán(IV)-izopropoxid, titán(IV)-butoxid) savas hidrolízisével a kolloid mérettartományú részecskék először szolt képeznek, majd az oldatot fokozatosan bepárolva alakul ki a nagyobb viszkozitású $\text{Ti}(\text{OH})_4$ gél. A TiO_2 atomrácsos szerkezete hőkezelés hatására képződik: a Ti-OH csoportokból vízkilépéssel Ti-O-Ti kapcsolatok jönnek létre, valamint magasabb hőmérsékleten (600-650 °C körül) bekövetkezhet az anatáz-rutil fázisátalakulás is.

Ha a hidrolízis előtt különböző módosító elemek vegyületeit adagolják az elegyhez, akkor kalcinálás során az beépülhet a katalizátor szerkezetébe (mind szubsztitúciós, mind intersticiális helyzetben), vagy felhalmozódhat a felületen. Ez az eljárás megváltoztatja a

katalizátor elektronrendszerének tulajdonságait, így a fotokatalitikus folyamatok szempontjából pozitív hatások érhetők el.

Módosítás fémekkel

Wu és munkatársai fémekkel módosított katalizátorok aktivitását hasonlították össze az UV tartományban [16]. Az eredményeik alapján a rézzel és az ezüsttel módosított TiO₂ mutatta a legnagyobb aktivitást a metilnarancs degradációjában.

Asiltürk és munkatársai Fe³⁺ ionokkal módosított TiO₂-ot állítottak elő, és vizsgálták a malachitzöld lebomlását az UV és a látható fény ($\lambda > 400$ nm) tartományában is [17]. 120 perces látható fénnel történő bevilágítás során a festékanyag mintegy 75%-a lebomlott, UV sugárzás hatására is hasonló mértékű volt a degradáció.

Fémes elemmel adalékolt katalizátorok esetén az elnyelt fény hullámhossza kiterjed a látható fény tartományába is, valamint nő a töltésátviteli reakciók sebessége. A töltésszeparáció mértéke általában csak egy bizonyos határig növekszik a fém koncentrációjával, afelett a módosító anyag már rekombinációs központként kezd viselkedni, és csökkenti a hatékonyságot [18, 19].

Sok esetben tapasztalható, hogy a fémionok (pl. Ag⁺ ionok) fény hatására leválnak a katalizátor felületére, ahol elektronsapdaként viselkedő fémklaszterek képződnek. Ekkor megnövekedik a töltésszeparáció mértéke, így a fotokatalizátor hatékonysága is nő [19].

Félfémek

Simsek különböző gyógyszerhatóanyagok és hormonzavaró hatású vegyületek lebomlását vizsgálta bórral módosított katalizátoron 400 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú fény hatására [20]. A modellvegyületek savas oldatában a Biszfenol A lebomlása 240 perc alatt már gyakorlatilag teljes volt, míg az oldat TOC értéke 79%-kal csökkent.

Leggyakrabban bór- és szilíciumot alkalmaznak félfémekkel módosított TiO₂ előállításához. A bór nagy szerepet játszik a katalizátor struktúrájának (például a fajlagos felület vagy a kristálméret) kialakításában. A bór mind az oxigént, mind a titánt helyettesítheti a rácsban, amely vöröseltolódást okoz az abszorpciós színekben. A szilícium – sok más elemhez hasonlóan – növeli az anatáz fázis stabilitását, gátolja a fázisátalakulást [18].

Nemfémes elemek

Nassoko és munkatársai nitrogénnel módosított katalizátort állítottak elő [21]. Nitrogénforrásként EDTA-t alkalmaztak, a fotoaktivitást látható fényben ($\lambda > 420$ nm) Rhodamin B degradációját követve határozták meg. A modellvegyület lebomlása 210 perc alatt 80%-os volt.

Li és munkatársai szénnel módosított mikrogömbök fotokatalitikus tulajdonságait vizsgálták, melyeket titán(IV)-butoxid, glükóz és HF felhasználásával állítottak elő hidrotermális módszerrel [22]. A módosítás hatására a katalizátor fényelnyelése szignifikánsan megnőtt a látható tartományban. A modellvegyületként alkalmazott metilénkék jelentős mértékben adszorbeálódott, majd 6 órás látható fénnel való bevilágítás alatt a koncentrációja 85%-kal csökkent.

Nemfémes elemekkel történő módosítás általában elősegíti a töltésszeeparációt, növeli a katalizátor fajlagos felületét, csökkenti a kristálméretet. A módosítás növeli az anatáz fázis arányát, valamint befolyásolja az abszorpciós spektrum vöröseltolódását. Ez annak köszönhető, hogy a nemfémes elemek vegyértéksávja a TiO₂ vegyértéksávja felett helyezkedik el, így csökken a tiltott sáv szélessége [18].

Módosítás félvezetőkkel

Számos kutatás foglalkozik a titán-dioxid és más félvezető tulajdonságú vegyületek összekapcsolásával. A módszer során adalékként különböző félvezető oxidokat vagy szulfidokat használnak (pl.: SiO₂, MoO₃, CdS, MgO, WO₃, SnO₂, In₂O₃, ZnO), melyek növelik a töltésszétválás mértékét, azaz az elektron-lyuk pár élettartamát. Leggyakrabban a ZnO-t alkalmazzák a TiO₂ mellett, mivel a két félvezető jól kiegészíti egymást. A titán-dioxidon kisebb a rekombináció mértéke, kémiai stabilitása nagy, míg a cink-oxid könnyebben nanostrukturálható és a vezetőképessége is nagyobb [18]. A TiO₂ hatékonyan nyeli el a rövidebb hullámhosszú UV-B sugárzást, a ZnO pedig az UV-A tartományba eső fotonokat abszorbeálja nagymértékben. Ennek, és a két anyag kémiai és biológiai inertségének köszönhetően széleskörűen alkalmazzák keveréküket például naptejekben [23].

„Co-doping”

Az úgynevezett „co-doping” lényege, hogy a TiO₂-ot egyszerre több anyaggal módosítják. Általában a fémek mellett félfémeket és nemfémes elemeket is adalékolnak a katalizátorhoz.

A különböző anyagokat egyszerre alkalmazva azok kiegészítik egymás tulajdonságait, s így szinergikus hatás érhető el [18].

Devi és munkatársai nitrogénnel és ezüsttel módosított titán-dioxid katalizátorokat állítottak elő [24]. A fotokatalitikus aktivitást napfény hatására vizsgálták, modellvegyületként fenolt alkalmaztak. A nitrogénnel és az ezüsttel történő adalékoláskor szinergikus hatás lépett fel: A modellvegyület degradációja 3 órás kísérlet során a N- TiO_2 katalizátorra leválasztott ezüst hatására 75%-ról 90%-ra nőtt.

Bagwasi és munkatársai bórral és bizmutterrel módosították a TiO_2 -ot [25]. A morfológiai és fizikai jellemzés mellett részletesen vizsgálták az Acid Orange 7 (AO7) nevezetű festékanyag és a 2,4-diklórfenol (DCP) degradációjának sebességi viszonyait látható fényvel történő bevilágítás során ($\lambda > 420$ nm). 4 óra alatt az AO7 mintegy 98%-a degradálódott, míg a 2,4-diklórfenolnak csupán 30%-a. Meg kell viszont jegyezni, hogy 5 órás bevilágítás mellett az AO7 oldat TOC értéke csupán 64%-kal csökkent. Ez azt jelenti, hogy az AO7 átalakult, de nem mineralizálódott teljes mértékben.

Borzyszkowska és munkatársai szintén bórral és bizmutterrel adalékolva titán-dioxidot állítottak elő, a katalizátor aktivitását rákellenes gyógyszerek lebontásában vizsgálták [26]. 420 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú látható fény hatására az ifoszfamid nevű hatóanyag koncentrációja a katalizátor jelenlétében 3 óra alatt gyakorlatilag 0 mg/l-re csökkent, míg katalizátor nélkül nem változott az oldat összetétele. Szimulált napfényt alkalmazva a lebomlás gyorsabb volt. A modellvegyületek koncentrációját HPLC-vel, UV-Vis detektor alkalmazása mellett vizsgálták, munkájukban javaslatot tettek a köztitermékek szerkezetére is.

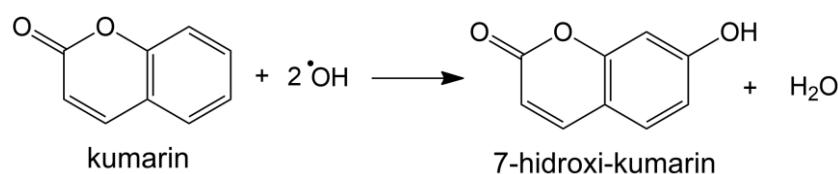
2.5 A fotokatalitikus aktivitás jellemzése

A katalizátorok fotoaktivitásának jellemzése különböző modellvegyületek segítségével történhet, melyek csupán kiragadott példák a közül a sok szerves szennyező közül, amelyek a vizekbe kerülhetnek. Mivel minden modellvegyület másképp viselkedik adott körülmények között, fontos, hogy az aktivitás meghatározásához legyen egy olyan mérési módszer, amely széles körben elfogadott, és egyértelmű információt ad a katalizátorról.

A heterogén fotokatalízis kulcsfontosságú szereplője a hidroxilgyök, mely az elsődleges elektronátadási folyamatokban, illetve az azokat kísérő termikus reakciókban a katalizátor felületén vagy a folyadékfázisban is képződhet. Fontos információt jelenthet a katalizátor

fotoaktivitásának megítélése szempontjából, ha ismerjük a hidroxilgyökök képződésének a mértékét.

A kumarin kiválóan alkalmas a hidroxilgyökök befogására, a keletkező egyszeresen hidroxileződött kumarin származékok képződési aránya gyakorlatilag állandó (3-hidroxi-kumarin: 2%, 4-hidroxi-kumarin: 11%, 5-hidroxi-kumarin: 41%, 6-hidroxi-kumarin: 12%, 7-hidroxi-kumarin: 29%, 8-hidroxi-kumarin: 5%) [27, 28]. Közülük a 7-hidroxi-kumarin (8. ábra) intenzív fluoreszcenciás emissziót mutat 453 nm-en, ha 332 nm-es fénnel gerjesztjük, ezért detektálása könnyen elvégezhető.



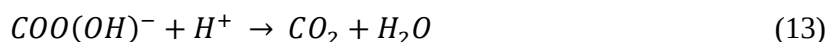
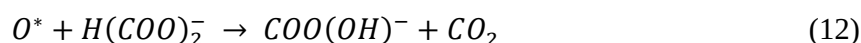
8. ábra: A 7-hidroxi-kumarin képződése.

Kalibráló oldatsorozat segítségével az emisszió intenzitásából számolható a hidroxileződött vegyület koncentrációja, így megadható egy, a keletkező hidroxilgyökök mennyiségével arányos érték.

Igen kedvelt és gyakran használt modellvegyület az oxálsav. Népszerűségének oka, hogy TiO₂ jelenlétében végzett fotokémiai lebontásakor stabil intermedier képződése nélkül, teljesen mineralizálódik: szén-dioxiddá és vízzé alakul. Aktuális koncentrációjának meghatározása történhet kromatográfiásan vagy a reakcióelegy teljes szerves széntartalmának (TOC) mérésével, de akár egyszerű permanganometriás titrálással is. Emellett információt szolgáltat a degradációról a folyadékfázis pH-ja is, hiszen a folyamat során csökken a sav mennyisége, így a pH növekszik.

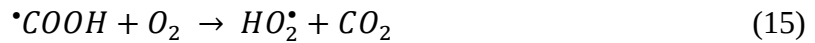
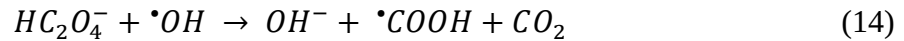
A vegyület fotokatalitikus bomlására több mechanizmust is javasoltak.

Hermann és munkatársai szerint a lebontást a katalizátor felületén adszorbeálódott oxigénmolekulából keletkező gerjesztett oxigénatomok végzik [29]:

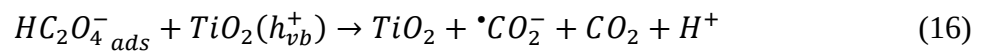


Kosanić a lebomlást a CO₂ képződésének követésével vizsgálta [30]. Eredményei alapján a TiO₂ gerjesztésekor keletkező lyuk és a felületen adszorbeálódott H₂O/OH⁻ reakciójában

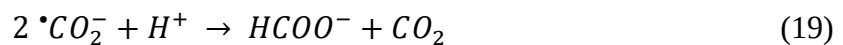
képződő hidroxilgyök támadja meg a C-C kötést, a keletkező karboxilgyök oxigénnel reagálva tűnik el.



Az oxálsav hatékony lyukbefogó, a hidrogén-oxalát ionról a fotogenerált lyukra irányuló elektronátadás szén-dioxid gyökanion képződéséhez vezet, a reakció előfeltétele a $HC_2O_4^-$ adszorpciója a katalizátor felületén [31]:



A keletkezett $\cdot CO_2^-$ is reagálhat a lyukkal (17), bimolekuláris reakcióban átalakulhat hidrogén-oxaláttá (18), vagy diszproporcióval szén-dioxiddá és formiátionná (19).



3. Célkitűzés

A titán-dioxid kiválóan alkalmazható fotokatalizátorként, kémiai és biológiai inerte, gazdaságos, könnyen hozzáférhető, nem igényel különleges bánásmódot. Fotokatalitikus reakciókban számos szennyezőanyagot képes lebontani, ám ehhez nagy energiájú UV sugárzás szükséges ($E_g=3,2 \text{ eV}$, $\lambda<388 \text{ nm}$). Ha különböző módszerekkel csökkentjük a félvezető tiltott sávjának szélességét, valamint növeljük a töltésszeeparációs és a töltésviteli folyamatok hatékonyságát, elérhetjük, hogy a katalizátor akár látható fény hatására is jelentős aktivitást mutasson.

Az ilyen tulajdonságokkal felruházott katalizátort az élet számos területén kiválóan lehet alkalmazni: a szennyvíztisztítástól kezdve az öntisztuló bevonatokon át az antibakteriális felületekig.

A projekt célja, amelybe az Általános és Szervetlen Kémia Intézeti Tanszéken bekapcsolódtam, egy olyan, a fotokatalízis elvén működő öntisztuló műpadló előállítása, amely beltéren is, látható fény segítségével hatékonyan elpusztítja a kórokozókat, lebontja a szennyeződések. Nagy igény mutatkozik a hasonló elven működő padlóburkolatok iránt, hiszen számos helyen lehetne azokat előnyösen felhasználni, például kórházakban, iskolákban, óvodákban, tömegközlekedési eszközökön, edzőtermekben, valamint mellékhelyiségekben.

Szakmai munkám során feladatom volt, hogy látható fényben is aktív, bórral és bizmutteral módosított titán-dioxidot állítsak elő, vizsgáljam annak morfológiáját, szerkezetét, valamint aktivitását fotokatalitikus reakciókban mind UV, mind a látható fény tartományában.

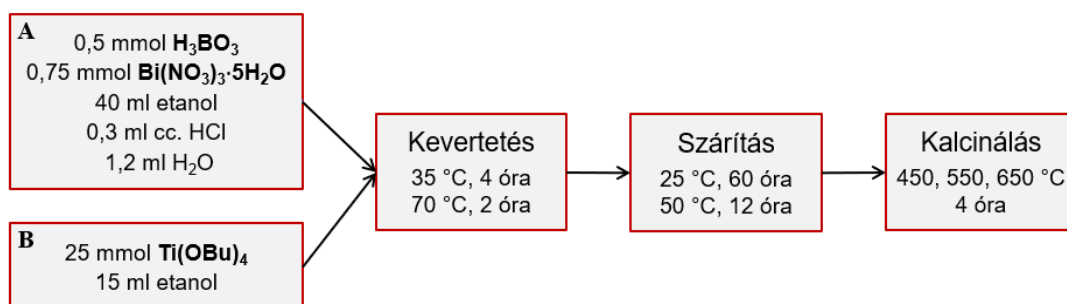
4. Kísérleti rész

4.1 Felhasznált anyagok

A katalizátorok előállításához és a fotokatalitikus kísérletekhez a következő vegyszereket használtam: titán(IV)-butoxid ($\text{Ti}(\text{C}_4\text{H}_9\text{O})_4$, Aldrich), 96% etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, VWR), 37% sósav (HCl , Reanal), bizmut(III)-nitrát pentahidrát ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Reanal), bórsav (H_3BO_3 , Reanal), kumarin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$, Carlo Erba), 7-hidroxi-kumarin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$, Aldrich), oxálsav dihidrát ($(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba), titánsárga ($\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_4$, Reanal), titán-dioxid (TiO_2 , Degussa), Milli-Q víz.

4.2 A katalizátor előállítása

A bórral és bizmutterrel módosított katalizátorokat *Bagwasi és munkatársai* receptje alapján, egyszerű szol-gél eljárással készítettem (9. ábra) [25]. Feloldottam 31 mg bórsavat 40 cm^3 abszolút etanol, 1,2 cm^3 Milli-Q víz, valamint 0,3 cm^3 tömény (37%) HCl elegyében (**A** oldat). Ezután a keverékhez 364 mg kristályvizes bizmut(III)-nitrátot adagoltam, s az oldatot 35 °C-on kevertettem, míg a kristályok fel nem oldódtak. Eközben elkészítettem a **B** oldatot, amely 15 cm^3 abszolút etanolt és 8,5 cm^3 97%-os titán(IV)-butoxidot tartalmazott.



9. ábra: A katalizátorok előállítása.

Folyamatos kevertetés mellett a **B** oldatot lassan hozzáadtam az **A**-hoz. A kapott elegyet 4 órán át 35 °C-on, majd 2 órán át 70 °C-on kevertettem. A keletkezett gél egy kristályosító tálban 60 óráig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd a terméket aprítás után 12 órán át 50 °C-on szárítottam. A finom porrá őrlést követően 4 órán keresztül 450, 550 és 650 °C-on kalcináltam a katalizátorokat Nabertherm kemencében, a felfűtési sebesség 2 °C/perc volt. A kalcinált mintákat mértem és porítottam.

A felhasznált bizmut mennyisége a titánhoz viszonyítva 3 mol% volt, a bór mennyisége pedig 2 mol%-nak felelt meg. Módosítatlan katalizátorokat bórsav és bizmut(III)-nitrát hozzáadása nélkül állítottam elő, míg a csak bórral, illetve a csak bizmutteral módosított változatok esetében az **A** oldat a megfelelő elem vegyületét tartalmazta.

A katalizátorokat a módosító elemek és a kalcinálási hőmérséklet megadásával azonosítom, például a 450 °C-on kalcinált, bórral és bizmutteral adalékolt katalizátor jelölése: B-Bi-TiO₂ (450 °C).

4.3 Fizikai jellemzés

4.3.1 Termikus analízis

A termikus analitikai vizsgálatok lehetőséget adnak arra, hogy felderítsük a hőkezelés alatt végbemenő folyamatokat. A mérések során rögzítettük a nyers, kalcinátlan minták tömegváltozását a hőmérséklet függvényében, így megkaptuk a minták termogravimetriás (TG) görbét. A DTG görbe segítségével (amely a TG görbe deriváltja) pontosítható, hogy az egyes tömegváltozással járó folyamatok milyen hőmérsékleten mennek végbe. Derivatív termikus analízissel (DTA) rögzítettük a hevítés hatására lejátszódó hőeffektusokat. Ehhez a minta és egy referencia anyag hőmérsékletkülönbségét mértük. A kapott DTA görbéről leolvasható, hogy milyen hőmérsékleten játszódnak le endoterm, illetve exoterm folyamatok, így akár a fázisátalakulás is azonosítható.

A vizsgálatok MOM Derivatograph Q 1500D típusú készülékkel történtek, platina tégelyben, levegő atmoszférában 10 °C/perces felfűtési sebességgel. A DTA mérésekhez a referencia anyag korund volt. A mérési adatokat a DERILL adatgyűjtő tárolta. A vizsgálatokhoz átlagosan 190 mg minta került bemérésre.

4.3.2 Pásztázó elektronmikroszkópia

A pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) egy olyan képalkotó eljárás, amelyben a vizsgálandó mintát nagy energiájú, monokromatikus elektronnyaláb segítségével elemezzük. Az elektronsugár és az anyag kölcsönhatásából származó jeleket detektálva a minta számos tulajdonsága meghatározható. A visszaszórt és a szekunder elektronok (lazán kötött elektronok, melyeket az elektronnyaláb lökött ki) detektálása alkalmassá teszi a berendezést különböző nagyítású felvételek készítésére, melyek információt nyújtanak a felület morfológiájáról.

Ha egy atomot nagy energiájú elektronnal meglövünk, akkor az képes az atom belső héjairól elektronokat kilökni, majd, amikor a magasabb főkvantumszámú héjról egy elektron az alacsonyabb energiájú héjra kerül, karakterisztikus röntgensugárzást bocsát ki. A sugárzás energiája arányos a két héj közötti energiakülönbséggel, amely az adott atomra jellemző érték. Ha a detektált jeleket szétválasztjuk a keltett sugárzás energiája szerint, a spektrumból minőségileg és mennyiségileg meghatározható a minta felső rétegének elemösszetétele.

A felvételeket FEI Apreo S mikroszkóppal készítettük, kis vákuum üzemmódban 10 kV gyorsítófeszültség mellett detektáltuk a szekunder elektronokat. Az elemösszetétel meghatározása 20 kV gyorsítófeszültség alkalmazásával, 126 eV felbontással készültek. Ilyen körülmények között a minták 0,1-5 μm vastag rétegről nyerhetünk információt.

4.3.3 Raman spektroszkópia

A Raman aktivitás feltétele, hogy a vizsgálni kívánt anyag kötéseinek polarizálhatósága energiaközlésre megváltozzon. Monokromatikus sugárzás hatására a minta alapállapotú elektronjainak egy része egy virtuális energiaszintre gerjesztődik, majd a gerjesztő sugárzás energiájával megegyező energiájú sugárzás kibocsátása mellett relaxál. Ezt nevezzük Rayleigh-szórásnak. Kismértékben megfigyelhető az a folyamat is, amikor az alapállapotú elektronok a gerjesztést követően a virtuális energiaszintről egy, az alapállapotnál magasabb energiájú vibrációs energiaszintre relaxálnak. Ekkor a gerjesztő sugárzásnál kisebb energiájú sugárzást lehet detektálni (Stokes-vonalak). Még kisebb valószínűséggel játszódik le az a folyamat, amikor az alapállapotnál magasabb vibrációs szintről gerjesztődnek az elektronok, s relaxáció során az alapállapotba térnek vissza, miközben a gerjesztő energiánál nagyobb energiájú sugárzást bocsátanak ki (anti-Stokes vonalak). A spektrumon megjelenő csúcsok helyéből és intenzitásából minőségi és mennyiségi következtetéseket lehet levonni az anyag összetételére, szerkezetére vonatkozóan.

A Raman spektrumok felvétele Bruker RFS 100/S FT-Raman készülékkel történt szilárd fázisban, 2 cm^{-1} -es felbontással, 128 spektrum átlagolásával. A fényforrás 1064 nm-es Nd-YAG lézer, teljesítménye 50 mW.

4.3.4 Röntgendiffrakciós vizsgálat

A röntgendiffrakció (XRD) egy hatékony, roncsolásmentes analitikai módszer, amellyel többek között az anyagok fázisösszetétele, szerkezete és textúrája is jellemezhető.

A röntgen pordiffraktométerben az izzókatódos röntgensőből kilépő sugárzás elhajlik (diffraktálódik) a mintában levő fázisokon, majd belép a detektorba. A röntgenső vagy a minta, illetve a detektor mozgásával változó diffrakciós szögeknél mérjük az intenzitást.

A vizsgálat során rögzítjük a diffraktált sugárzás intenzitás eloszlását a 2θ diffraktált szög függvényében. Minden egyes csúcs egy-egy (hkl) Miller-indexű rácssíkseregnek felel meg, azaz a röntgendiffraktogram a különböző kristályos fázisokra más és más.

A mért adatokból a fázisösszetétel mellett következtethetünk a krisztallitméretre: általánosságban elmondható, hogy nagyobb intenzitású, keskenyebb csúcsok a nagyobb krisztallitméretre, a kristályosabb jellegre utalnak, míg a szélesebb, kisebb intenzitású csúcsok a kisebb krisztallitméretű halmazokra jellemzők.

A röntgendiffrakciós mérések PHILIPS PW3710 típusú diffraktométerrel, Cu-K α sugárzással (50 kV, 40 mA), és 0,02 °2 θ /s sebességgel készültek. A fázisösszetétel meghatározása a Rietveld-féle teljes profilillesztési módszerrel történt.

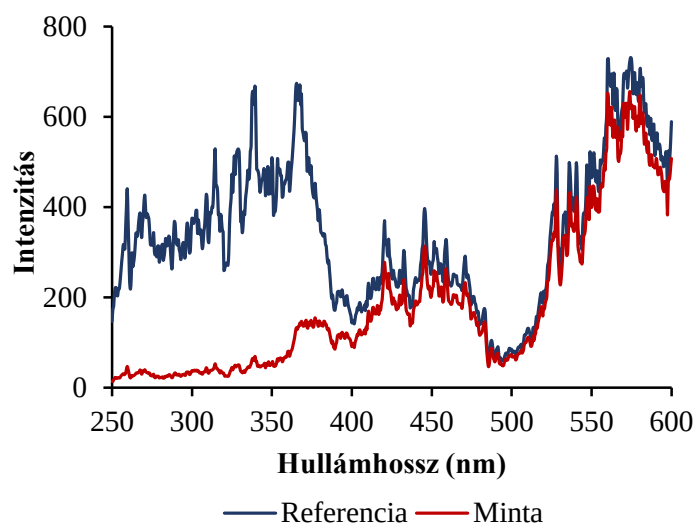
4.3.5 Fajlagos felület

A fajlagos felület a fotokatalizátorok jellemzése szempontjából igen fontos adat, hiszen a töltésátviteli folyamatok a fotoindukált részecskepár és a katalizátor felületén adszorbeálódott molekulák között játszódnak le. Minél nagyobb egy anyag fajlagos felülete, annál több lehetősége van egy molekulának az aktív centrumokon való megkötődésre, és így a reakcióra. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a fajlagos felület nem határozza meg egyértelműen a katalizátor aktivitását.

A fajlagos felület kísérleti meghatározása ASAP 2000-es készülékkel, alacsony hőmérsékletű (77 K) N₂ gáz adszorpciójának és deszorpciójának mérésével történt. A mintákat 160 °C-on vákuum alatt kezeltük elő, közben a nyomás 0,011 Hgmm alá csökkent a mintatartó edényben. A mért adszorbeált térfogat és relatív nyomás értékpárokból Brunauer-Emmett-Teller (BET) egyenlete alapján számítottuk a minták fajlagos felületét. Az eredmények alapján meghatározható a katalizátorok átlagos pórusátmérője és a pórustérfogat is, amelyeket Barrett, Joyner és Halenda (BJH) elmélete alapján számoltunk.

4.3.6 Gerjesztési küszöbenergia meghatározása

Az előállított katalizátorok fontos paramétere a gerjesztési küszöbenergia, melyet diffúz reflexiós színeképek alapján határoztam meg. A színeképeket Perkin Elmer LS50 B spektrofotométerrel vettem fel szilárd fázisban 250-600 nm hullámhossz tartományban. A minta felületére érkező monokromatikus sugárzás az energiájától függően vagy abszorbeálódik, vagy visszaverődik a felületről. A detektálás a gerjesztő fénysugárhoz képest 90°-os szögben történik. Referenciaként BaSO₄-ot alkalmaztam, amely gyakorlatilag a beeső fény egészét visszaveri, így a színekép a xenon-lámpa karakterisztikáját adja vissza (10. ábra). A katalizátorok diffúz reflexiós színeképei alapján megadható, hogy a minta milyen hullámhosszúságú fényt nyel el.



10. ábra: A referencia BaSO₄ és a szol-gél eljárással előállított, 450 °C-on kalcinált TiO₂ minta (TiO₂ (450 °C)) diffúz reflexiós spektruma.

Kubelka-Munk transzformáció

Elosztva az adott minta esetén mért intenzitásokat a referencia intenzitás értékeivel megkapható az úgynevezett reflektancia (11.a ábra). Ahhoz, hogy a visszaszórt fotonok relatív mennyiségéből a fényelnyeléssel arányos mennyiséget kapjunk, alkalmazni kell a Kubelka-Munk transzformációt (20), ahol α a Kubelka-Munk függvény, R pedig a reflektancia [32].

$$\alpha = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad (20)$$

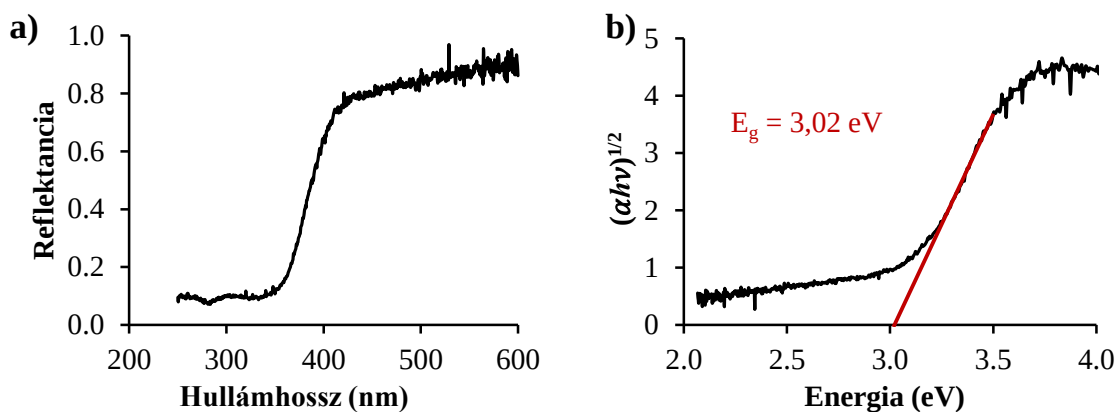
Félvezetők esetén a Kubelka-Munk függvény és a gerjesztési küszöbenergia között a következő összefüggés áll fenn (21):

$$(\alpha h\nu)^m = A(h\nu - E_g) \quad (21)$$

$$h\nu = \frac{1240}{\lambda} \quad (22)$$

Az egyenletben α a Kubelka-Munk függvény, E_g a gerjesztési küszöbenergia, A konstans, $h\nu$ a foton energiája, amely a (22)-es egyenlet alapján számítható a hullámhosszból, m pedig a vegyértéksáv és a vezetési sáv közti elektronátmenet jellegére utal. Indirekt félvezetők esetén, azaz, ha a vezetési sáv minimuma és a vegyértéksáv maximuma közt momentum különbség van, akkor $m = 1/2$, míg direkt félvezetők esetén ($m = 2$) nincs momentum különbség [10].

Ábrázoltam az $(\alpha h\nu)^m$ összefüggést $h\nu$ függvényében (TiO₂: $m = 1/2$), így a gerjesztési küszöbenergia közelében lineáris összefüggést kaptam. A tiltott sáv szélességét az egyenes és az x tengely metszéspontja adja meg (11.b ábra) [7].



11. ábra: a) A TiO₂ (450 °C) minta reflektanciája a hullámhossz függvényében.

b) A számított Kubelka-Munk függvény alapján a gerjesztési küszöbenergia meghatározása.

4.4 Fotoaktivitás vizsgálata

4.4.1 Kísérleti körülmények

Reaktor

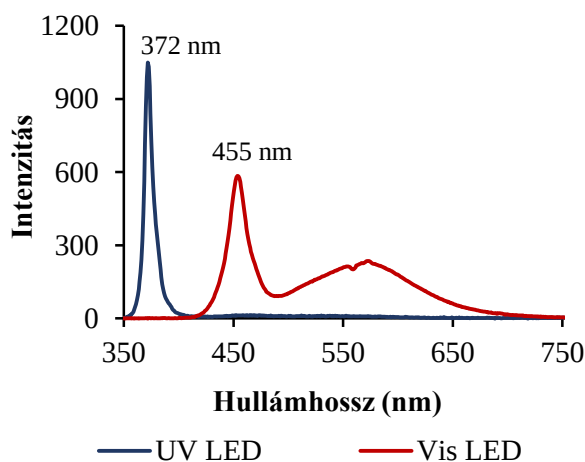
A kísérleteket 100 cm^3 térfogatú, 2 cm vastag, henger alakú reaktorban hajtottam végre (12. ábra), amely a fényforrástól UV LED esetén 10 cm-re, míg Vis LED esetén 15 cm-re volt. A szeptummal ellátott csomók egyikén vezettem be a levegőt $10\text{ dm}^3/\text{h}$ áramlási sebességgel. A betáplált levegő tartotta áramlásban a szuszpenziót, és biztosította a folyamathoz szükséges oxigént. A másik csomkon keresztül történt a mintavétel, illetve itt távozott a levegő. A koloid oldat homogenizálását mágneses kevertetéssel is elősegítettem.



12. ábra: A fotokémiai reaktor.

Fényforrás

A fotokatalitikus kísérletekben fényforrásként 60 W-os UV LED-et, illetve 3 darab 7 W-os Vis LED-et alkalmaztunk, kisugárzási színeküket a 13. ábra mutatja.



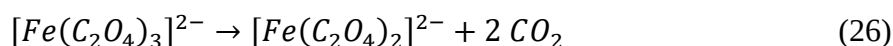
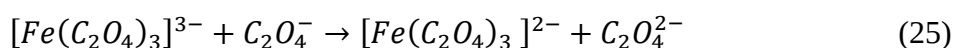
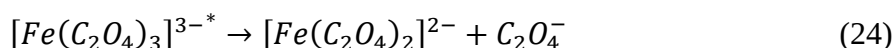
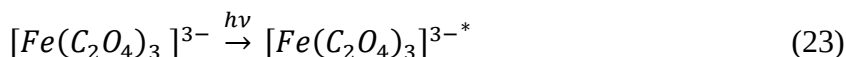
13. ábra: A fényforrások kisugárzási színeképei.

A reakcióelegy hőmérséklete nem változott szignifikánsan, 120 perces bevilágítás alatt mindösszesen 3 °C-kal emelkedett (1. melléklet).

A fényforrás aktinometrálnása

Ahhoz, hogy egy fotokémiai folyamatban feltárjuk a kvantitatív viszonyokat is, szükséges tudni az egységnyi idő alatt a reaktor térfogategységébe jutó fotonok mennyiségét. Erre alkalmas rendszerek a fizikai vagy kémiai aktinóméterek. Az egyik leggyakrabban használt kémiai eljárás a ferrioxalát-aktinometria, a fényérzékeny kálium-[trioxaláto-ferrát(III)] vegyületet tartalmazó oldatban látható fény és UV sugárzás hatására a komplex ionok fémcentruma

vas(II)-vé redukálódik, miközben a ligandum szén-dioxiddá oxidálódik (23-26) [33].



A vas(II) fényelnyelése elhanyagolható a +3-as oxidációs számúéhoz képest, ezért ezzel nem kell számolni a mérés folyamán.

A bevilágított mintákat nátrium-acetát és 1,10-fenantrolin tartalmú oldathoz kell adagolni, így a keletkezett vas(II)ionok az aromás vegyülettel vörös színű komplexet alkotnak, amelynek fényelnyelése 510 nm-en mutat maximumot. A fényelnyelési értékekből meghatározható a vas(II)komplex keletkezési sebessége, melyből az egységnyi idő alatt egységnyi térfogatba érkező fotonok mennyisége számolható.

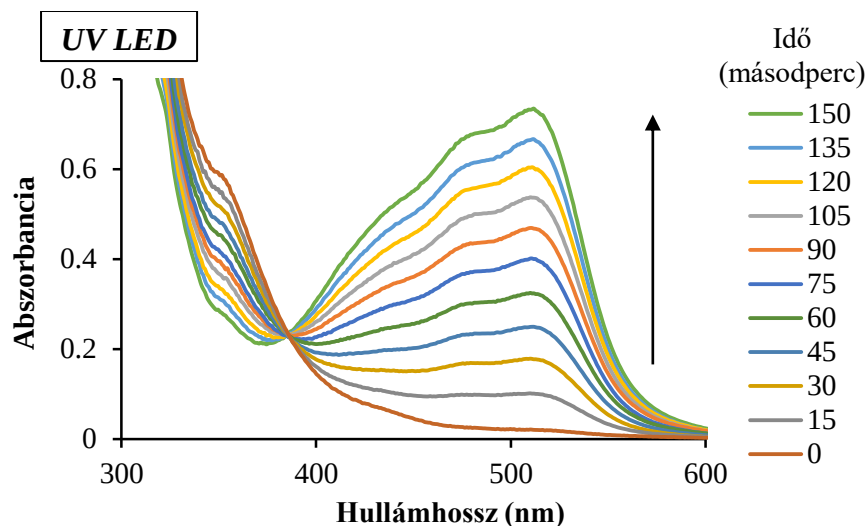
Az aktinometráláshoz szükséges anyagok és oldatok elkészítésének részletes leírását a 2. mellékletben adom meg.

A fényforrás intenzitásának meghatározásakor ugyanazokat a körülményeket alkalmaztam, mint a lebontási kísérletekben: az oldatba 10 dm³/h sebességgel levegőt áramoltattam, valamint kevertettem is. A fényforrást a kísérlet megkezdése előtt 20 perccel bekapcsoltam, hogy állandósuljon a fénykibocsátása és a hőmérséklete.

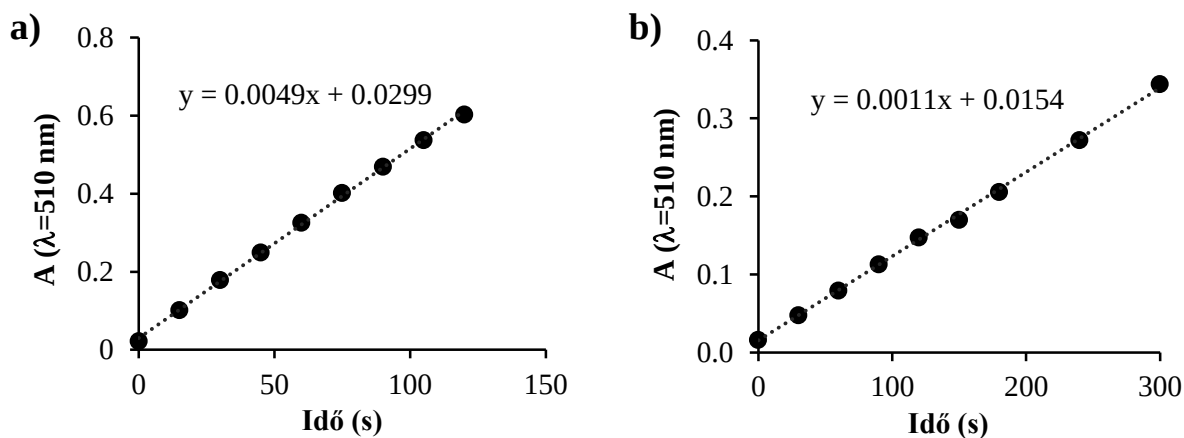
A mérés során 15 másodpercenként vettem mintát 3, illetve 5 percig. A minták 0,5 cm³-ét 25 cm³-es normállombikba adagoltam, majd 5 cm³ acetát-pufferrel beállítottam az oldat pH-ját. 2 cm³ fenantrolin reagenssel a vas(II)-ionokat trisz-fenantrolin komplexszé

alakítottam. Az oldatot ezután 25 cm³-re töltöttem desztillált vízzel, majd sötétben állni hagytam

kb. 20 percen át. Az oldatok fényelnyelési színeképeit a 14. ábrán mutatom be, az 510 nm-en mérhető fényelnyelési értékek időbeni változását a 15. ábra szemlélteti.



14. ábra: A [tris(1,10-fenantrolin)-vas(II)] komplex fényelnyelésének változása.



15. ábra: Az 510 nm-en mért fényelnyelés az idő függvényében.

a) UV LED b) Vis LED

Az 510 nm-en mért értékekre egyenest illesztettem, a meredekségből meghatároztam az időegység alatti abszorbancia-változást a hígított mintákban, melyből a Lambert-Beer törvény segítségével egyszerűen számítható a vas(II) koncentrációjának időbeni változása (27).

$$\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} = \frac{1}{l \cdot \varepsilon} \left(\frac{dA}{dt} \right) \quad (27)$$

Az egyenletben l az optikai úthossz, mely ez esetben 1 cm, ε a [tris(1,10-fenantrolin)-vas(II)] komplex moláris fényelnyelési együtthatója 510 nm-en, értéke: $\varepsilon = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Figyelembe

véve a hígítást – 0,5 cm³ mintát hígítottam 25 cm³-re, azaz $h=50$ – megkapjuk a vas(II) koncentrációjának növekedését a reaktorban. A reaktorba érkező fotonok mennyiségének számításához, szükséges tudni, hogy a fotonok hányad része hasznosul az egymást követő fotokémiai vagy fotofizikai folyamatokban, ezt a kvantumhasznosítási tényező ($\Phi_{Fe(II)}$) adja meg. Az UV LED 372 nm-nél mutat maximális intenzitást, ezen a hullámhosszon $\Phi_{Fe(II)} = 1,21$ [33], a látható fényt kibocsátó LED maximális intenzitása 455 nm-nél van, a kvantumhasznosítási tényező értéke 0,93 [33]. A fény intenzitása a (28)-as egyenlet alapján számolható:

$$I = \frac{1}{\Phi_{Fe(II)}} \cdot \frac{d[Fe^{2+}]}{dt} \quad (28)$$

$$I(\text{UV LED}) = 1,09 \cdot 10^{-3} \text{ mol foton dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$I(\text{Vis LED}) = 3,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol foton dm}^{-3} \text{ min}^{-1}.$$

4.4.2 A kísérletek végrehajtása

A lebontási kísérletekben a katalizátor koncentrációja minden esetben 1 g/dm³ volt. Az általam készített katalizátorok kevertetés és levegő-bevezetés ellenére is szemmel láthatóan leülepedtek. Valószínű, hogy a kalcinálás során a részecskék összetapadtak, s a szuszpendálás hatására sem váltak szét. A probléma megoldása lehet az ultrahangos kezelés, amely során az összetapadt szemcsék diszpergálódnak. Azonban figyelembe kell venni azt a tényt, miszerint a víz ultrahangozása során hidroxilgyök keletkezik [34]. Ez a jelenség meghiúsítaná a mérési eredményeket, ha a modellvegyület jelenlétében végezném a diszpergálást, ezért úgy jártam el, hogy a kísérlet előtt egy nappal a kimért katalizátort (100 mg) 10 cm³ vízben 40-45 percig ultrahangos fürdőbe helyeztem, majd egy éjszakán át kevertettem az immár homogénebb szuszpenziót. Az ultrahangos kezelés során képződő gyökök rövid élettartamúak, így gyökbefogó hiányában rekombinálódnak.

Az előkészített katalizátorból 100 cm³ szuszpenziót készítettem megfelelő modellvegyület koncentrációval, amelyet homogenizálás, valamint az adszorpciós-deszorpciós egyensúly elérése céljából a reaktorban 20-30 percig kevertettem bevilágítás nélkül. Eközben a fényforrást is bekapcsoltam, hogy felmelegedjen, s a bevilágítás alatt állandó intenzitással sugározzon. Természetesen közben a szuszpenzióval megtöltött reaktort alaposan elzártam a fénytől.

A kísérletek során meghatározott időközönként 4 cm³ mintát vettem az oldatból. Az analitikai vizsgálatok előtt Millipore Millex-LCR 0,45 µm-es szűrő segítségével választottam el a szuszpenzió szilárd részét a folyadéktól. A mintákat kisméretű, sötét üvegben tároltam.

A hidroxilgyök képződési sebességének meghatározásakor 10⁻⁴ mol/dm³ koncentrációjú kumarin szuszpenziót világítottam be, a minták fényelnyelését SCINCO S-3100-as spektrofotométerrel rögzítettem. A fotokatalitikus folyamatokban képződő 7-hidroxi-kumarin emisszióját Perkin Elmer LS50 B spektrofluoriméter segítségével 332 nm-es gerjesztés mellett 453 nm-en mértem.

Az oxálsav ($c_0=10^{-3}$ mol/dm³) degradációjának vizsgálatakor a modellvegyület aktuális koncentrációjának meghatározását permanganometriás titrálással végeztem: 2 cm³ mintához 5 cm³ 10%-os kénsav oldatot, kevés desztillált vizet adtam, majd 1,6·10⁻⁴ mol/dm³-es KMnO₄ oldattal titráltam az előzőleg 50-60 °C-ra melegített elegyet.

A bevilágított minták pH-ját VWR univerzális pH elektróddal mértem, amelyet Consort C561 készülékhez csatlakoztattam. A pH-mérőt mérés előtt 7-es és 4-es pH-jú pufferoldatokkal kalibráltam.

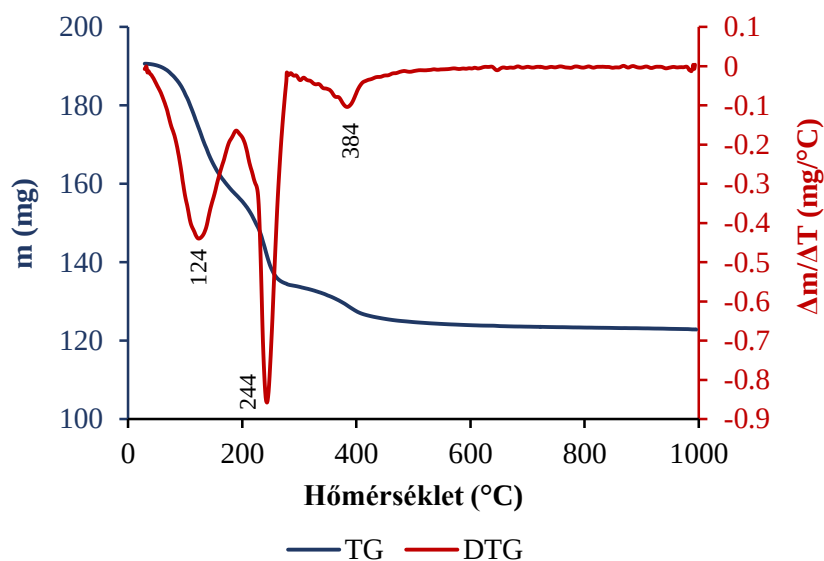
A titánsárga bevilágításakor 5·10⁻⁵ mol/dm³-es oldatot alkalmaztam. A modellvegyület fotobomlását a minták fényelnyelési színeképének rögzítésével (SCINCO S-3100-as spektrofotométerrel) követtem.

5. A kísérleti eredmények értékelése

5.1 Fizikai jellemzés

5.1.1 Termikus analízis

A kalcinálás alatt végbemenő folyamatokat derivatográfias vizsgálatokkal azonosítottuk. A minta tömegét a hevítés során a hőmérséklet függvényében rögzítettük, az így kapott TG görbe deriváltja a DTG görbe. A 16. ábra a szol-gél eljárással előállított módosítatlan TiO₂ termikus analízisének eredményeit mutatja. 3 bomlási lépcső figyelhető meg, az első 124 °C-nál jelentkezik, ekkor a bemért 190 mg minta tömege 33,9 mg-mal csökkent, amely 17,8%-os változást jelent. A második, meredekebb lépcső 244 °C-nál található, itt a tömegesökkenés 22,3 mg (11,7%). A harmadik csúcsot 384 °C-nál regisztráltuk, melyhez 10,5 mg (5,5%) tömegvesztés tartozik. A teljes folyamat során a minta tömege 67,1 mg-mal (35,3%) csökkent.



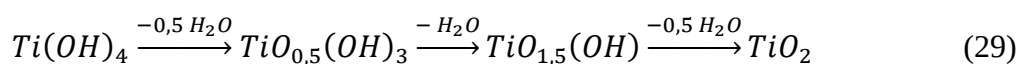
16. ábra: A módosítatlan katalizátor TG és DTG görbéje.

A hevítési maradék tömege 114,9 mg, amely 1,44 mmol TiO₂-nak felel meg. Feltételezve, hogy a kiindulási minta ekvivalens mennyiségű, azaz 166,6 mg Ti(OH)₄-ot tartalmazott, a tapadó nedvesség és a még jelenlévő szerves anyag tömege 23,4 mg.

Az egyes bomlási lépcsők tömegvesztéséből következtetni lehet a távozó anyag mennyiségére. Az első lépcsőben (124 °C) a tapadó nedvesség, illetve a maradék oldószer, valamint 0,58 mmol szerkezeti víz távozik. A második bomlási lépcsőben megközelítőleg

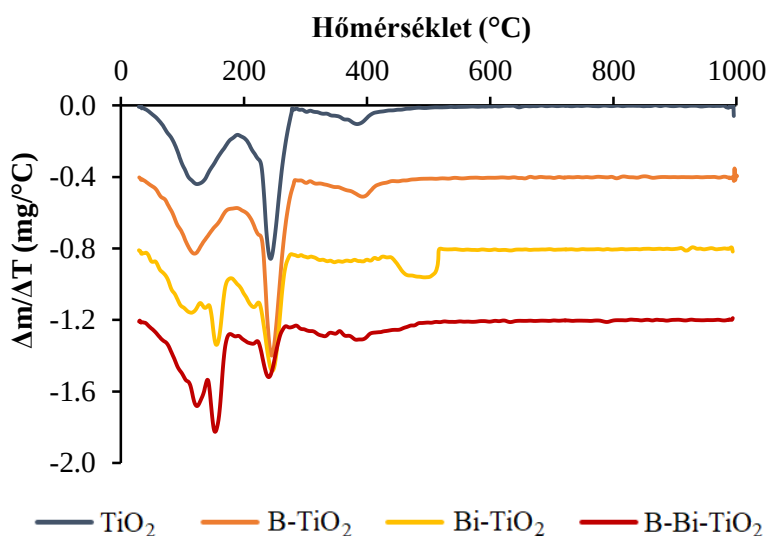
1,24 mmol szerkezeti vízzel, míg a harmadik lépcsőben 0,58 mmol vízzel csökken a minta tömege.

A Ti(OH)₄ hevítés hatására TiO₂-dá alakul, miközben 2 mol víz távozik. A kapott eredmények alapján valószínűsítjük, hogy adott mérési körülmények között a folyamat három lépcsőben játszódik le: először 0,5 mol, majd 1 mol, végül ismételt 0,5 mol víz távozik a kondenzációs reakciókban (29).



Összehasonlítottam a különböző katalizátorokra meghatározott DTG görbéket (17. ábra), az egyes csúcsokhoz tartozó hőmérsékleteket az 1. táblázatban foglalom össze.

120 °C-on valószínűleg a maradék szerves oldószer, a kötött nedvesség és a szerkezeti víz egy része, míg 245 °C-on és 380-390 °C körül a Ti-OH csoportok kondenzációs reakciójában képződő víz távozik. A szakirodalom szerint a Ti(OH)₄ termikus bomlása 2 lépésben történik, először 112 °C-on a tapadó nedvesség, majd 112 °C és 350 °C között a szerkezeti víz távozik a rendszerből [35].



17. ábra: A katalizátorok DTG görbéi (függőleges eltolás: -0,4 mg).

1. táblázat: A bomlási lépcsőkhöz rendelhető hőmérsékletek.

TiO ₂	B-TiO ₂	Bi-TiO ₂	B-Bi-TiO ₂
124 °C	120 °C	114 °C	124 °C
		156 °C	153 °C
244 °C	245 °C	247 °C	240 °C
384 °C	392 °C		383 °C

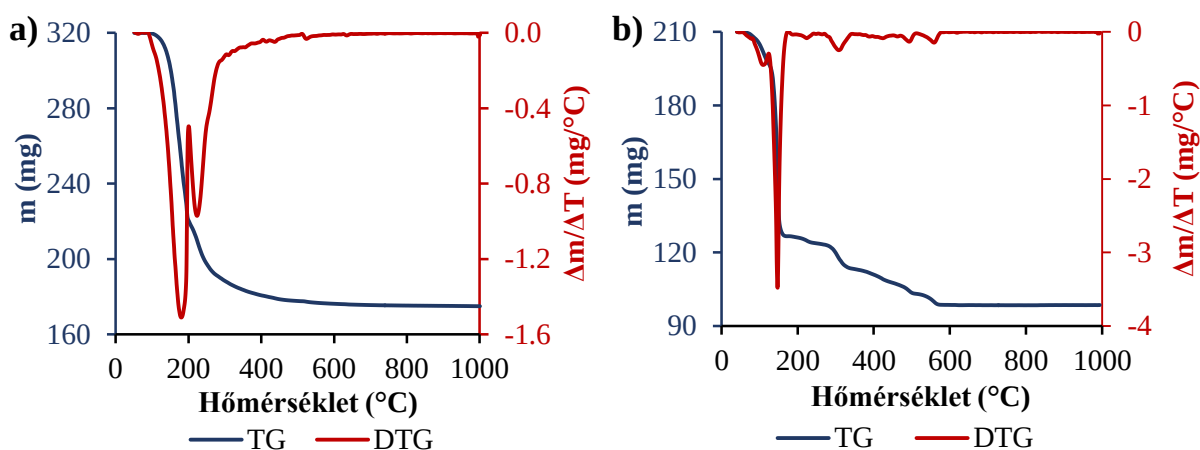
A TiO₂ és a B-TiO₂ DTG görbéje közel azonos, azaz a bórsav bomlására utaló jelek nem láthatók, amelyet a bórsav DTG görbéjével való összehasonlítás is alátámaszt (18.a ábra).

A bizmutot is tartalmazó mintákról készült felvételeken egy új csúcs figyelhető meg 155 °C körül (17. ábra).

Kodama a Bi₅O₇NO₃ összegképletű vegyület előállítása céljából vizsgálta a bizmut(III)-nitrát pentahidrát termikus bomlását [36]. Eredményei szerint 230 °C alatt csak víz távozik a vegyületből, 230 °C felett viszont már a NO₃⁻ bomlása is megfigyelhető. A termogrammon 150 °C-nál megjelenő éles csúcsot a kristályvíz távozásához rendelte.

Duval munkájában arról számolt be, hogy a bizmut(III)-nitrát pentahidrát TG görbéje fokozatosan ereszkedik 600-650 °C-ig, majd állandósul a tömeg, s a rendszerben csak Bi₂O₃ található, azaz a nitrát már 600 °C alatt elbomlott [37].

Az általunk alkalmazott mérési körülmények között a kristályvizes bizmut(III)-nitrát TG és DTG görbáját a 18.b ábra szemlélteti. A termogrammon 7 bomlási lépcső figyelhető meg, a hozzájuk tartozó hőmérsékletek: 110, 147, 224, 309, 423, 492 és 558 °C.



18. ábra: A módosító vegyületek TG és DTG görbéje.

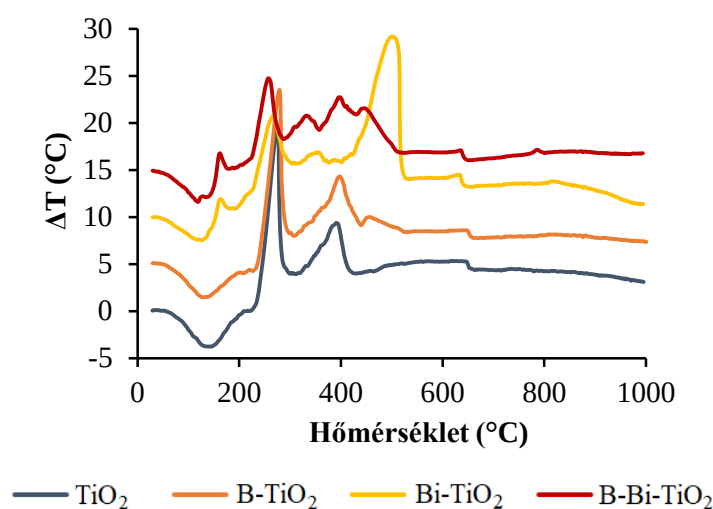
a) H₃BO₃ b) Bi(NO₃)₃·5H₂O

A hevítési maradék mennyiségéből és az egyes bomlási lépcsőknél mért tömegveszteségekből következtetni próbáltunk a lejátszódó folyamatokra. A bemért 210 mg Bi(NO₃)₃·5H₂O hevítése során 93,1 mg Bi₂O₃ maradék keletkezett, amelyből visszaszámolva a kristályvizes só tömege 193,8 mg. Ez megegyezik az első bomlási lépcső végén mért tömeggel, azaz a 110 °C-os lépcsőben a tapadó nedvesség távozott a rendszerből. A vizsgált minta 36 mg kristályvizet tartalmazott, ám a második bomlási lépcsőben 146 °C-on 70,9 mg-mal csökkent a tömeg. Ez azt jelenti, hogy 150 °C körül nemcsak a kristályvíz távozik, hanem már a

NO₃⁻ ionok egy része is elbomlik. Számításaink szerint a 2. bomlási lépcső után visszamaradó anyag BiO(NO₃)·H₂O képlettel jellemezhető.

Tudjuk jól, hogy a pontos összetétel meghatározása csupán a tömegcsökkenésekből nem lehetséges, ezért tervezzük, hogy a méréseket a távozó gáz analízisével egybekötve is megismételjük. Ez azért is szükséges, mert a Bi-TiO₂ DTG görbéje eltér a többi katalizátorétól, 500 °C körül széles bomlási lépcső figyelhető meg, melyet eddig még nem sikerült azonosítani.

A hevítés során rögzítettük a hőmérsékletkülönbséget a minta és a referencia anyag között, az így kapott DTA görbéket a 19. ábrán mutatom be.



19. ábra: A katalizátorokra jellemző DTA görbék (függőleges eltolás: 5 °C).

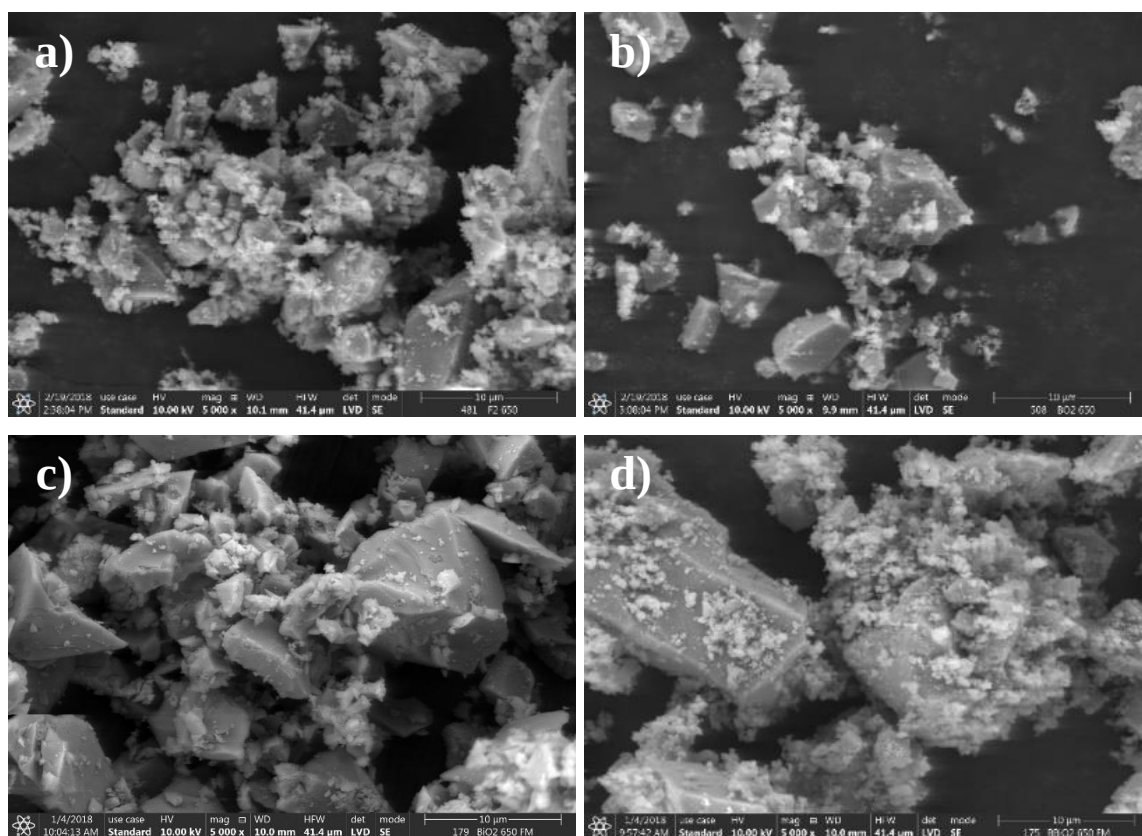
125 °C körül (TiO₂ – 145 °C) egy endoterm csúcs figyelhető meg, valószínűleg az elpárolgó víz és a szerves oldószer hőt von el a mintától, így csökken a hőmérséklete a referenciához képest. A 270 °C körül megjelenő exoterm csúcs a stabilabb, alacsonyabb energiájú Ti-O-Ti kötések kialakulásával magyarázható [35]. Érdeemes megemlíteni, hogy az eredmények alapján nem lehet egyértelműen az anatáz-rutil fázisátalakulás exoterm csúcsát, egyedül a B-Bi-TiO₂ esetén figyelhető meg 785 °C-nál egy minimális csúcs. *Hanaor és Sorrel* összefoglalójukban említik, hogy a fázisátalakulás általában 600 °C körül, lassan indul meg, így a nagy felfűtési sebesség miatt a csúcsot csak magasabb hőmérsékleteken lehet rögzíteni [38]. A hőeffektus detektálását nehezíti az is, hogy az anatáz átalakulásának előrehaladtával csökken a fázisátalakulás sebessége, így a látens hő is.

Yang és munkatársai szol-gél eljárással készített titán-dioxid fázisátalakulását vizsgálták [39]. A titán(IV)-izopropoxidból előállított gél derivatív termikus analízise során 787 °C-on határozták meg a fázisátalakuláshoz tartozó exoterm csúcsot (felfűtési sebesség: 10 °C/min).

5.1.2 Morfológiai vizsgálatok

A pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételek alapján a szemcsék alaki tulajdonságairól és elemi összetételéről kívántunk információt nyerni.

A 20. ábra a 650 °C-on kalcinált, majd porított katalizátorok pásztázó elektronmikroszkópos felvételeit mutatja 5000-szeres nagyításban. Megfigyelhető, hogy a nagyobb szemcséken apró, mikro-, illetve nanoméretű részecskék helyezkednek el, azaz az előállított katalizátorok polidiszperzek. A B-Bi-TiO₂ felvételén (20.d ábra) pehelyszerű, világos nanoméretű kristályok láthatóak a nagyobb szemcséken.



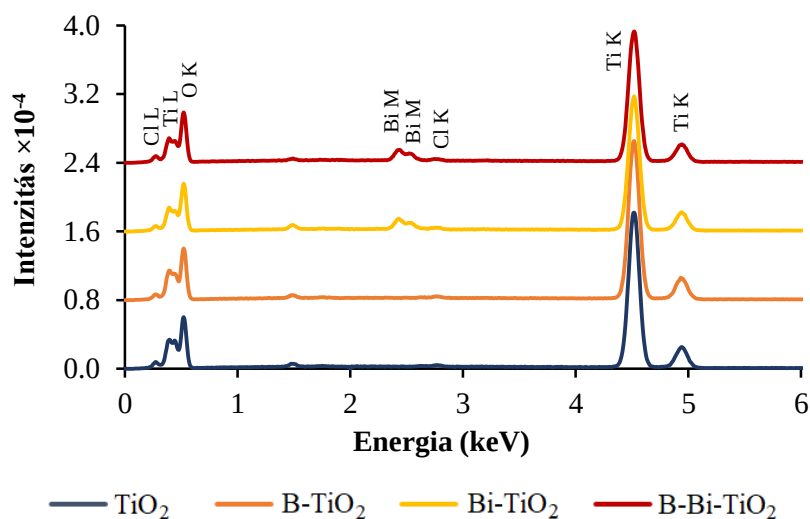
20. ábra: A 650 °C-on kalcinált katalizátorok 5000-szeres nagyításban.

a) TiO₂ b) B-TiO₂ c) Bi-TiO₂ d) B-Bi-TiO₂

A minták elemösszetételét energiadiszperzív röntgen spektrometriás módszerrel (EDS) vizsgáltuk. A kapott spektrumokon (21. ábra) jól megfigyelhető 4,52 és 4,94 keV-nál a titán K_α és K_β vonala, valamint 0,5 keV körül az oxigén K vonala. A bizmutot tartalmazó

mintákban 2,44 és 2,52 keV energiánál egyértelműen megjelennek a bizmut M csúcsai, 10 keV felett pedig a Bi L vonalakat lehet detektálni. A bórra jellemző sávokhoz túl alacsony energia tartozik, ezért nem azonosíthatók a spektrumon.

A mintákban 2,67 keV-nál kis intenzitású sáv található, mely a klór K csúcsához rendelhető, és valószínűleg a savas hidrolíziskor alkalmazott sósavból maradt vissza. Az 1,5 keV körüli csúcs az alumínium mintatartóból származik.



21. ábra: A 450 °C-on kalcinált katalizátorok ED spektruma.

A csúcsok alatti területekből következtetni lehet a katalizátorok elemösszetételére. Az így meghatározott mol%-ban megadott értékeket a 2. táblázat tartalmazza. A mérés hibája a titánra $\pm 1,4\%$, az oxigénre $\pm 10\%$, a bizmutra $\pm 7\%$, amely a csúcsok átfedéséből adódik.

Az adatok alapján a Ti:O molarány 1:2,07-nek adódott, az egyes katalizátorokra kapott eredmények nem mutattak jelentős eltérést. A minták összetétele: 31,4-32,5% titán, 66,7-67,4% oxigén. A bizmut elemaránya a 450 °C-on kalcinált Bi-TiO₂ katalizátorban 1,08%, a bórt is tartalmazó, azonos hőmérsékleten kalcinált mintában 1,13%. Ezek az értékek a titánhoz viszonyítva 3,35 és 3,60%-nak felelnek meg. A klór mennyisége nem volt számottevő, csupán 0,08-0,1%, itt a meghatározás hibája $\pm 4\%$.

2. táblázat: A 450 °C-on kalcinált minták elemösszetétele mol%-ban megadva.

	Ti	O	Bi
TiO₂	32,47%	67,43%	
B-TiO₂	32,51%	67,40%	
Bi-TiO₂	32,21%	66,71%	1,08%
B-Bi-TiO₂	31,38%	67,49%	1,13%

5.1.3 Fázisok azonosítása

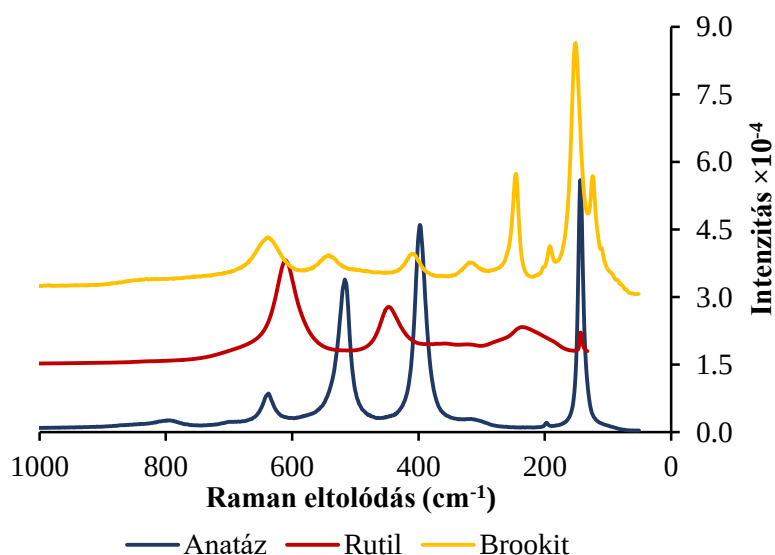
Raman spektroszkópia

A Raman spektrumok alapján a kalcináláskor bekövetkező fázisátalakulást követjük nyomon.

A fázisokat a tiszta anatáz, rutil és brookit Raman spektrumai alapján azonosítottuk (22. ábra), melyeket a rruff.info online adatbázisból töltöttünk le (RRUFFID=R060277, R110109, R050363). A megfigyelhető jellegzetes rezgések:

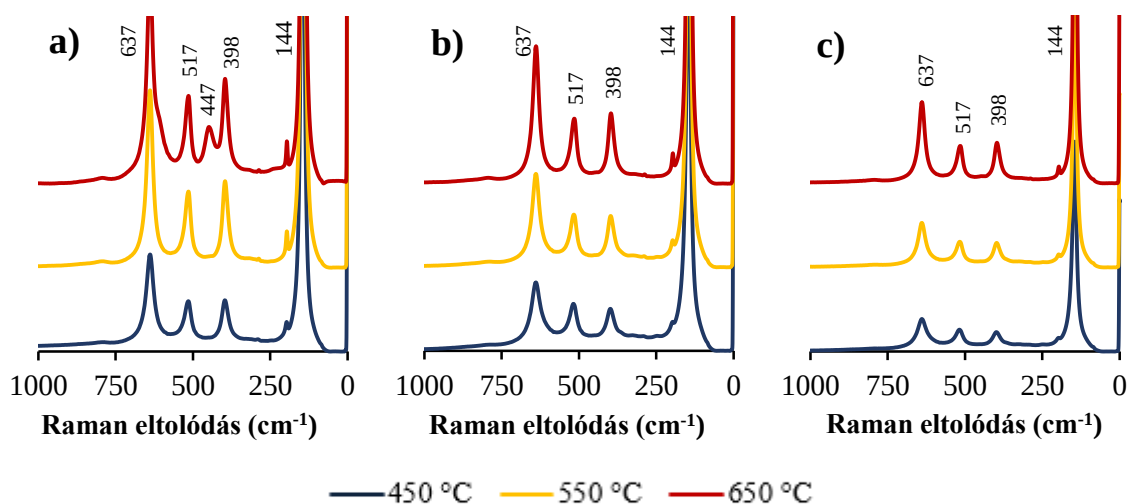
- anatáz: 144, 398, 517, 637 cm⁻¹,
- rutil: 143, 236, 447, 611 cm⁻¹,
- brookit: 124, 151, 192, 247, 318, 409, 542, 638 cm⁻¹.

Az alacsonyfrekvenciás (144-147 cm⁻¹) rezgések a Ti-Ti rezgésekhez rendelhetők, míg a többi csúcs a Ti-O rácsrezgéshez tartozik.



22. ábra: Az anatáz, a rutil és a brookit Raman spektruma.

A szol-gél eljárással előállított, különböző hőfokon kalcinált módosítatlan titán-dioxid Raman spektrumai alapján megállapítottuk (23. ábra), hogy a kalcinálási hőmérséklet emelésével párhuzamosan elkezdődik az anatáz-rutil átalakulás. Megjelenik a rutilra jellemző 447 cm⁻¹-es csúcs, valamint 611 cm⁻¹ körül kialakul egy váll. A módosított katalizátorok spektrumain a hőkezelés hatására bekövetkező fázisátalakulásra utaló rezgések nem figyelhetők meg, csak az anatázhoz tartozó csúcsokat lehet megbízhatóan azonosítani (23. ábra).



23. ábra: a) TiO₂ b) Bi-TiO₂ c) B-Bi-TiO₂ Raman spektrumai.

XRD eredmények

Ahhoz, hogy a pontos fázisösszetételt meghatározzuk, röntgendiffrakciós méréssel vizsgáltuk az előállított katalizátorokat. A kapott eredmények, melyeket a 3. táblázatban foglalkozok össze jó egyezést mutatnak a Raman spektroszkópia eredményeivel.

Az adalékmentes TiO₂ 450 °C-os hőkezelés után csak anatóz módosulatot tartalmazott. Az 550 °C-on hőkezelt mintában már megjelent a rutil fázis is, majd aránya a 650 °C-os kalcinálás hatására tovább nőtt (3. melléklet), de még nem ment végbe a teljes fázisátalakulás. Az adalékolt katalizátorok mindegyike még 550 °C-os hőkezelés után is csak anatóz fázist tartalmazott. A 650 °C-on kalcinált katalizátorokban már kis mennyiségben megjelent a rutil fázis is. Eredményeink jól mutatják, hogy a bór és a bizmut jelenléte gátolta a fázisátalakulást.

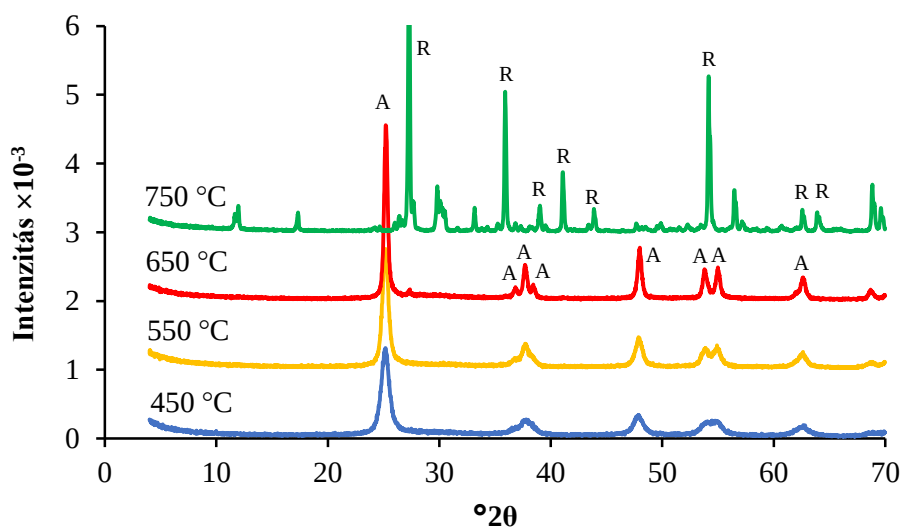
3. táblázat: A különböző hőfokon kalcinált minták fázisösszetétele (hiba: ±1-2%).

	450 °C		550 °C		650 °C	
	Anatóz	Rutil	Anatóz	Rutil	Anatóz	Rutil
TiO₂	100%		98,3%	1,7%	73,4%	26,6%
B-TiO₂	100%		100%		85,9%	14,1%
Bi-TiO₂	100%		100%		95,3%	4,7%
B-Bi-TiO₂	100%		100%		95,4%	4,6%

Erről a jelenségről különböző módosított TiO₂ katalizátorok vizsgálatokor már más kutatók is beszámoltak. *Wu és munkatársai* nitrogénnel és fluorral módosított titán-dioxid előállításakor figyelték meg, hogy az adalékanyagok gátolják az anatóz-rutil átalakulást [40].

Bagwasi és munkatársai azt tapasztalták, hogy az általuk készített bórral és bizmuttal módosított katalizátorokban 650 °C-os kalcinálás hatására sem történt meg az anatáz rutillá alakulása. 750 °C-on viszont lejátszódott a fázisátalakulás, valamint Bi₂O₃ és Bi_xTiO_y megjelenését tapasztalták [25]. Megvizsgáltuk, hogy az általunk előállított katalizátorok fázisösszetétele hogyan változik magasabb hőmérsékletű kalcinálás hatására. 4 órán át 750 °C-on hőkezeltük a bórral és bizmuttal módosított titán-dioxidot.

A röntgendiffrakciós felvételek változását a kalcinálási hőmérséklet függvényében a 24. ábra mutatja.



24. ábra: A B-Bi-TiO₂ minták XRD felvételei (A: anatáz, R: rutil).

Jól látható, hogy a 750 °C-on kalcinált B-Bi-TiO₂ katalizátorban a fázisátalakulás megtörtént. A minta 88,5%-nyi rutil módosulat mellett 11,5%-nyi α -Bi₂(Ti₄O₁₁) fázist is tartalmazott. Az összetétel jó egyezést mutat *Bagwasi és munkatársai* eredményével [25].

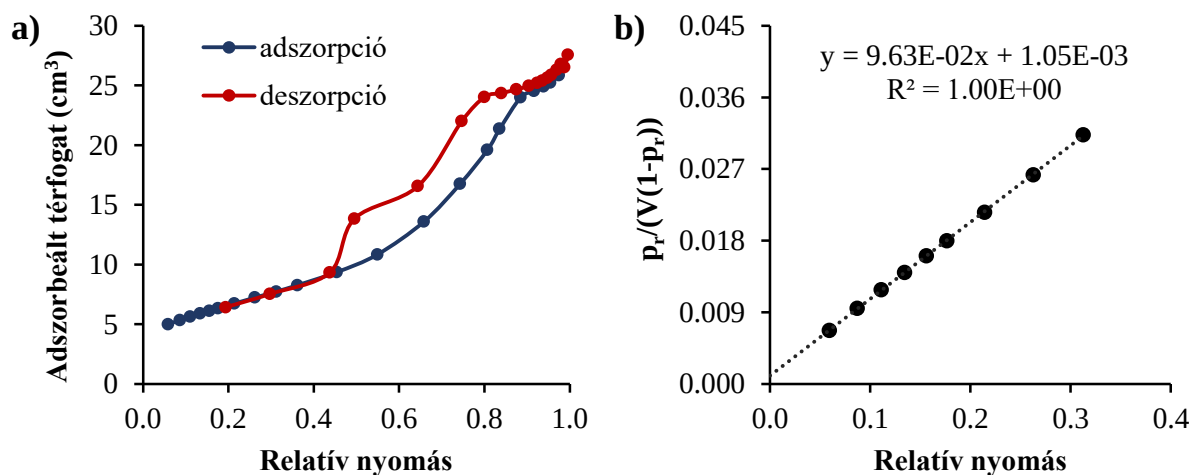
5.1.4 Fajlagos felület

A katalizátorok fajlagos felületének meghatározása nitrogén adszorpció/desorpció mérésével történt -196 °C hőmérsékleten és alacsony nyomáson. A felvett izotermákon jól megfigyelhető a deszorpciós hiszterézis, amely mezopórusos anyagra utal (25.a ábra).

A fajlagos felületet a linearizált BET egyenlet alapján számoltuk (30), ahol $p_r = p/p_0$ a relatív nyomás, V_m a monomolekulás borítottsághoz szükséges adszorptívum mennyisége cm³-ben kifejezve (273,15 K, 101325 Pa), V az adott relatív nyomáson adszorbeálódott anyag mennyisége (cm³), és C állandó.

$$\frac{p_r}{V \cdot (1-p_r)} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C-1}{V_m \cdot C} \cdot p_r \quad (30)$$

Kis relatív nyomás értékek ($0,05 < p_r < 0,35$) függvényében ábrázolva a (30)-as egyenlet bal oldalát (25.b ábra) olyan egyenest kapunk, melynek meredekségéből és tengelymetszetéből kiszámítható a monomolekulás borítottsághoz szükséges N₂ mennyiség.



25. ábra: a) A Bi-TiO₂ (450 °C) adszorpciós/deszorpciós izotermája.

b) A mérési pontokból számított lineáris összefüggés a Bi-TiO₂ (450 °C) katalizátorra.

A fajlagos felület az egy adszorbeált molekula felületigényének ismeretében számítható (31), ez az érték nitrogénre 0,162 nm².

$$F = \frac{V_m \cdot N_A \cdot a}{m \cdot 22410} \quad (31)$$

A (31)-es egyenletben F a fajlagos felület (m²/g), $N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹ az Avogadro-állandó, a az egy adszorbeált molekula felületigénye (m²), és m a bemért minta tömege (g). A 22410 dm³ mol⁻¹ érték 1 mol ideális gáz térfogatából adódik normál körülmények között.

A 450 °C-on kalcinált katalizátorok fajlagos felületét, valamint pórustérfogatát és átlagos pórusátmérőjét a 4. táblázat tartalmazza. A B-TiO₂ katalizátorhoz nem áll rendelkezésre általunk mért adat, a feltüntetett értékek szakirodalmi adatok [25]. Elmondható, hogy a módosító elemek jelenlétében kis mértékben nőtt a katalizátorok fajlagos felülete, ezzel párhuzamosan a pórustérfogat is, míg az átlagos pórusátmérő csökkent. Az értékek hasonlóak a Bagwasi és munkatársai által meghatározottakhoz, esetükben a B-Bi-TiO₂ fajlagos felülete 56 m²/g volt [25].

4. táblázat: A 450 °C-on kalcinált katalizátorokra vonatkozó adatok.

	TiO ₂	B-TiO ₂	Bi-TiO ₂	B-Bi-TiO ₂
Fajlagos felület (m²/g)	14,7	28,0 ^[25]	45,0	34,4
Pórustérfogat (cm³/g)	0,0322	0,0450 ^[25]	0,0792	0,0599
Átlagos pórusátmérő (nm)	6,65	-	5,32	5,20

Vizsgáltuk a hőkezelés hatását a fajlagos felületre (5. táblázat). A kalcinálási hőmérséklet emelésével fokozatosan csökken az értéke, a 750 °C-on hőkezelt minta esetén már csak 2 m²/g. A pórustérfogatban is csökkenő tendencia figyelhető meg, míg az átlagos pórusátmérő a hőmérséklet emelésével nő.

5. táblázat: A kalcinálási hőmérséklet hatása a B-Bi-TiO₂ felületi paramétereire.

	450 °C	550 °C	650 °C	750 °C
Fajlagos felület (m²/g)	34,4	16,2	6,7	2,0
Pórustérfogat (cm³/g)	0,0599	0,0460	0,0304	0,0086
Átlagos pórusátmérő (nm)	5,2	7,9	18,2	15,6

5.1.5 Gerjesztési küszöbenergia meghatározása

A gerjesztési küszöbenergia meghatározása a 4.3.5. pontban leírtak szerint történt. Felvettem a referencia (BaSO₄), az előállított katalizátorok, valamint a Degussa P25 TiO₂ diffúz reflexiós színeképeit, majd az adatokból képeztem a Kubelka-Munk függvényt.

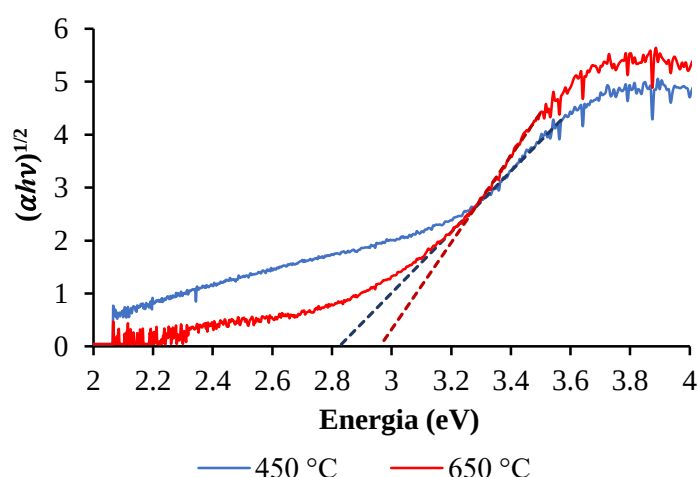
Az alkalmazott kísérleti körülmények között a vonatkoztatási katalizátornak tekintett Degussa P25 TiO₂ gerjesztési küszöbenergiája értéke 3,21 eV, amely pontosan visszaadja a szakirodalomban található, általánosan elfogadott 3,2 eV-ot [10].

6. táblázat: A számított gerjesztési küszöbenergia értékek (a meghatározás hibája ±6-7%).

	450 °C		550 °C		650 °C	
TiO₂	3,01 eV	412 nm	3,05 eV	407 nm	2,98 eV	416 nm
B-TiO₂	3,01 eV	412 nm	3,01 eV	412 nm	2,97 eV	418 nm
Bi-TiO₂	2,82 eV	440 nm	2,75 eV	451 nm	2,80 eV	443 nm
B-Bi-TiO₂	2,82 eV	440 nm	2,90 eV	428 nm	2,96 eV	419 nm

A módosítatlan, szol-gél eljárással előállított TiO₂ gerjesztési küszöbenergiája 3 eV körül van, amely a 412 nm-es fény energiájának felel meg (6. táblázat). Ha bórral módosítjuk a félvezetőt, akkor nem tapasztalható jelentős különbség a számolt értékek között, az eltérés mérési hibán belüli (6. táblázat). A másik módosító elem, a bizmut hatására azonban jelentősen megnő a katalizátor fényelnyelése a látható tartományban, azaz csökken a gerjesztési küszöbenergia (6. táblázat).

A bórral és bizmutterrel együtt módosított katalizátorok gerjesztési küszöbenergiájának meghatározását a 26. ábra szemlélteti.



26. ábra: A 450 °C-on és a 650 °C-on kalcinált B-Bi-TiO₂ minták esetén számított Kubelka-Munk függvények és a gerjesztési küszöbenergia meghatározása.

Jól látható, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten kalcinált minta szélesebben kiterjed a látható tartományba ($h\nu < 3,1$ eV), kevésbé meredek az abszorpciós váll, így kisebb a gerjesztési küszöbenergia értéke. A 650 °C-on hőkezelt minta esetén éppen ennek az ellenkezője figyelhető meg, ezért csak nagyobb energiával gerjeszthető (2,96 eV).

A kapott eredmények (6. táblázat) és a fázisarány (3. táblázat) között nincs szoros korreláció, azaz a gerjesztési küszöbenergia értékét a kis százalékban megjelenő rutil módosulat mellett más tényező is befolyásolja.

A B-Bi-TiO₂ (750 °C) minta gerjesztési küszöbenergiája 2,93 eV-nak adódott. A jelentős mennyiségű rutil és a megjelenő bizmut-titanát nem módosította nagymértékben a tiltott sáv szélességét az alacsonyabb hőmérsékleten kalcinált katalizátorokhoz képest.

A szol-gél eljárással előállított TiO₂ és B-TiO₂ katalizátorok fehér színűek voltak, fényelnyelésük kicsi a látható fény tartományában. A bizmutot is tartalmazó katalizátorok

kalcinálásakor az eredetileg fehér por színe narancssárgára változott ($450\text{ }^\circ\text{C}$ és $550\text{ }^\circ\text{C}$). Magasabb hőmérsékleten hevítve a katalizátorokat, színük fakult, a $650\text{ }^\circ\text{C}$ -on és $750\text{ }^\circ\text{C}$ -on hőkezelték már halványsárga színűek voltak (27. ábra).



27. ábra: Az előállított katalizátorok.

5.2 Fotokatalitikus aktivitás

Az előállított katalizátorok aktivitásának értékeléséhez szükség van referenciára, amelyhez viszonyítani lehet a kísérletekben kapott eredményeket. A Degussa P25 TiO_2 (DP25 TiO_2) egy széleskörűen alkalmazott fotokatalizátor, az UV tartományban jelentős, míg a látható tartományban kisebb aktivitást mutat, kiválóan alkalmazható referenciaként.

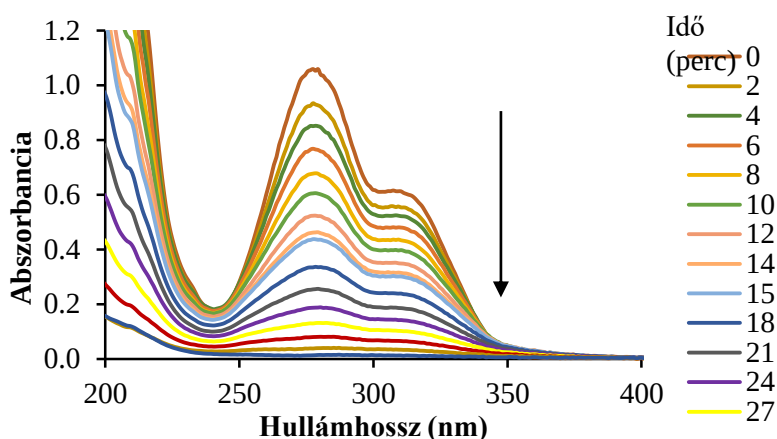
A fotokatalitikus kísérleteket először az ibolyántúli tartományban végeztük el, majd ezután tértünk át a látható fénnel történő gerjesztés hatására lejátszódó folyamatok vizsgálatára.

5.2.1 Aktivitás UV fényben

A hidroxilgyök képződése

A fotokémiai reakciókban kulcsfontosságú részecske a hidroxilgyök. Képződését a 2.5. fejezetben leírt módszer alapján vizsgáltuk. Gyökbefogóként kumarint alkalmaztunk, melynek átalakulását először a referencia katalizátoron mutatom be.

A folyamatot nemcsak a keletkező 7-hidroxi-kumarin emissziójának mérésével, hanem a kumarin fényelnyelésének változásával is nyomon lehet követni (28. ábra).

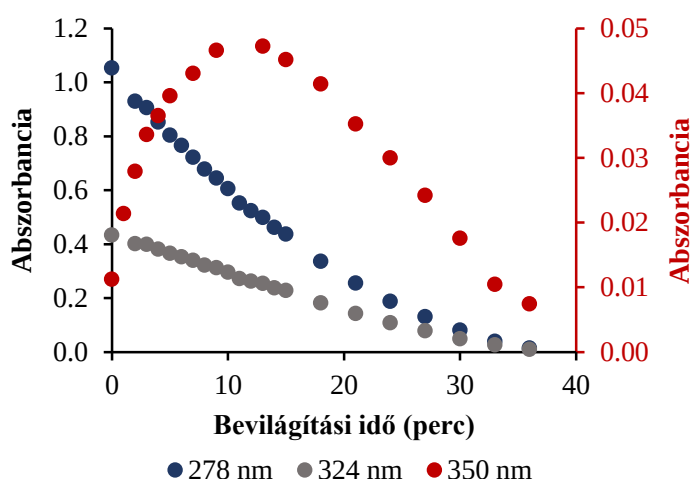


28. ábra: A kumarin fényelnyelésének változása.

$c_0(\text{kumarin}): 10^{-4} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ DP25 TiO}_2$, $\ell: 1 \text{ cm}$

A gyökbefogó abszorpciós maximumán (278 nm) a hidroxivegyület moláris fényelnyelési együtthatója lényegesen kisebb, mint a kiindulási vegyületé (4. melléklet), ezért a kis koncentrációban ($c \sim 10^{-7} \text{ M}$, 31. ábra) keletkező 7-hidroxi-kumarin nem módosítja jelentősen a fényelnyelést 278 nm-en, valamint 324 nm-en sem torzul a színkép (28. ábra). A 7-hidroxi-kumarinra (és valószínűleg a többi hidroxileződött származékra is) utaló jelek csupán 350 nm környékén figyelhetők meg, ahol a kumarin moláris fényelnyelési együtthatója

$110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ körüli érték, míg a 7-hidroxi-kumarin ϵ értéke még mindig relatíve nagy ($4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Itt a fényelnyelés kezdetben növekszik, majd csökken a kumarin hidroxileződésének, s az azt követő tovább alakulásának eredményeképp (29. ábra).

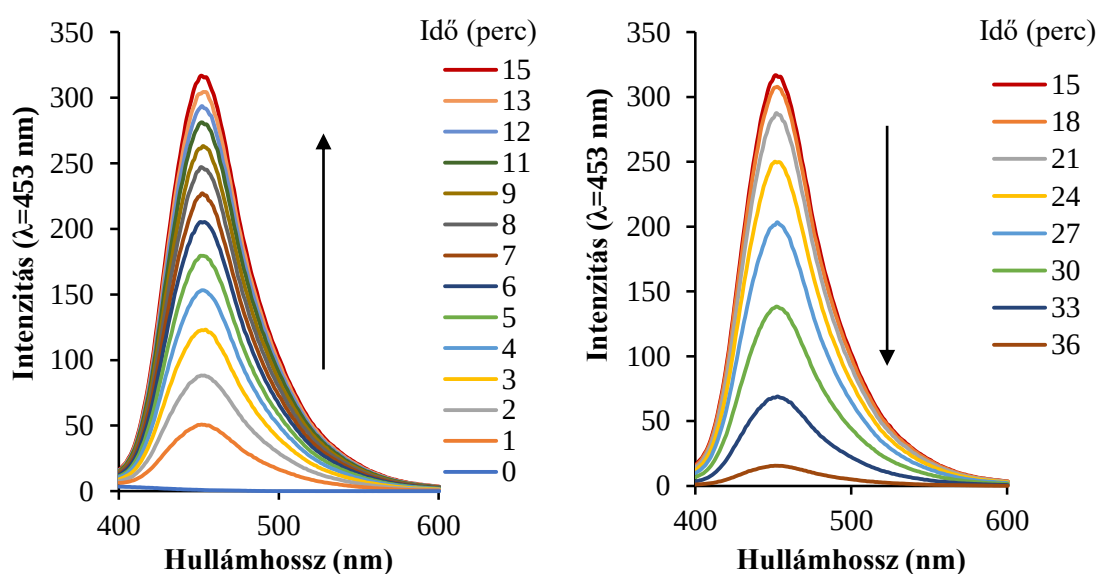


29. ábra: A fényelnyelés változása különböző hullámhosszakon.

$c_0(\text{kumarin}): 10^{-4} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ DP25 TiO}_2$, $\ell: 1 \text{ cm}$

A Degussa P25 TiO₂-ot tartalmazó szuszpenzióban a 278 nm-en fényelnyelést mutató komponensek koncentrációja 36 perces bevilágítás alatt gyakorlatilag nullára csökkent.

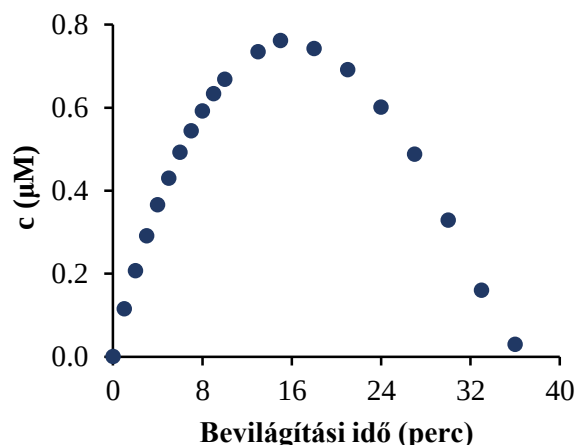
A fotokatalitikus folyamatokban keletkező 7-hidroxi-kumarin lumineszcencia spektrumának változását a 30. ábra szemlélteti. Az emisszió intenzitása az első 15 percben nőtt, majd fokozatosan csökkent. Ez azzal magyarázható, hogy a feleslegbe kerülő hidroxilgyökök, illetve a termikus reakciókban képződő egyéb gyökök reagáltak a 7-hidroxi-kumarinnal, és olyan vegyületek keletkeztek, amelyek már nem mutatnak fluoreszcenciát.



30. ábra: A 7-hidroxi-kumarin emissziós spektrumának változása.

$c_0(\text{kumarin}): 10^{-4} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} DP25 TiO₂, $\lambda_{\text{gerj.}}: 332 \text{ nm}$, $\ell: 1 \text{ cm}$

A folyamat fontos paramétere a 7-hidroxi-kumarin kezdeti képződési sebessége, mely arányos a hidroxilgyök képződésének sebességével. Ennek meghatározására kalibrációs görbét vettem fel különböző koncentrációjú 7-hidroxi-kumarin oldatok lumineszcencia intenzitásának mérésével (5. melléklet). A hidroxivegyület koncentrációját a bevilágítási idő függvényében ábrázolva (31. ábra), a görbe 0 időpillanathoz tartozó meredeksége megadja a 7-hidroxi-kumarin kezdeti képződési sebességét, melyre a Degussa P25 TiO₂-ot tartalmazó szuszpenzióban $1,07 \cdot 10^{-7} \text{ M min}^{-1}$ értéket határoztam meg adott kísérleti körülmények között.



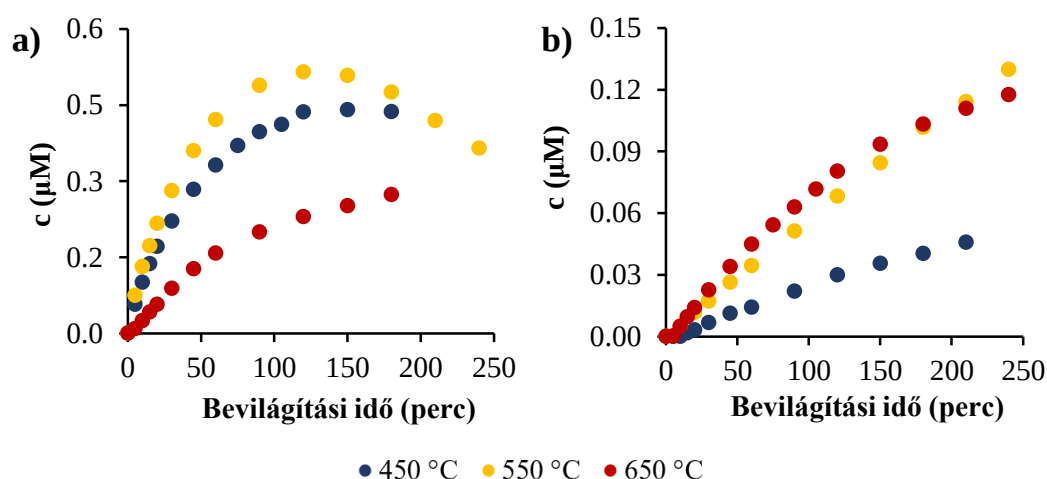
31. ábra: A 7-hidroxi-kumarin koncentrációjának változása.

$c_0(\text{kumarin}): 10^{-4} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} DP25 TiO₂, $\lambda_{\text{gerj.}}: 332 \text{ nm}$, $l: 1 \text{ cm}$

Az előállított katalizátorokat tartalmazó szuszpenziókban is meghatároztuk a hidroxivegyület kezdeti képződési sebességét, értéke a bórral módosított katalizátorok jelenlétében volt a legnagyobb (6. melléklet, 32.a ábra):

$$\begin{aligned} \text{B-TiO}_2 (450^\circ \text{C}) &- 1,12 \cdot 10^{-8} \text{ M min}^{-1}, & \text{B-TiO}_2 (550^\circ \text{C}) &- 1,53 \cdot 10^{-8} \text{ M min}^{-1} \\ \text{B-TiO}_2 (650^\circ \text{C}) &- 2,76 \cdot 10^{-9} \text{ M min}^{-1} \end{aligned}$$

A Bi-tartalmú katalizátorok gerjesztésekor csekély mennyiségű 7-hidroxi-kumarin képződött, a meghatározott kezdeti képződési sebességek 10^{-10} nagyságrendűek. A köztitermék aktuális mennyisége 240 perces bevilágítás alatt is csak $1,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ -re nőtt (32.b ábra). A referencia katalizátort tartalmazó szuszpenziókban kb. 1 perc alatt érhető el ez a koncentráció.

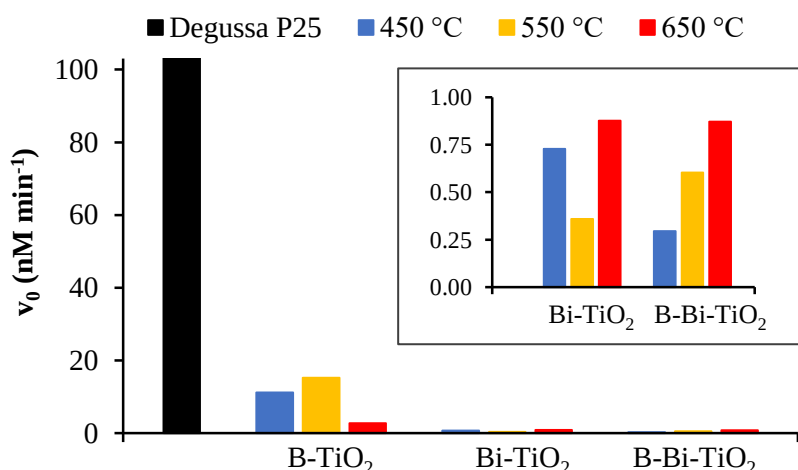


32. ábra: A 7-hidroxi-kumarin átalakulása a különböző katalizátorokon.

a) B-TiO₂, b) B-Bi-TiO₂.

$c_0(\text{kumarin}): 10^{-4} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} katalizátor, $\lambda_{\text{gerj.}}: 332 \text{ nm}$, $l: 1 \text{ cm}$

Az eredmények összehasonlításakor (33. ábra) minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a módosított katalizátorok hidroxilgyökképző sebessége jóval kisebb a referencia katalizátorra meghatározottnál (kb. 3%). Kivételt jelentenek ez alól a 450 °C-on és az 550 °C-on kalcinált B-TiO₂ katalizátorok, ahol 10,5%-os és 14,3%-os a 7-hidroxi-kumarin kezdeti képződési sebessége a DP25-höz viszonyítva.

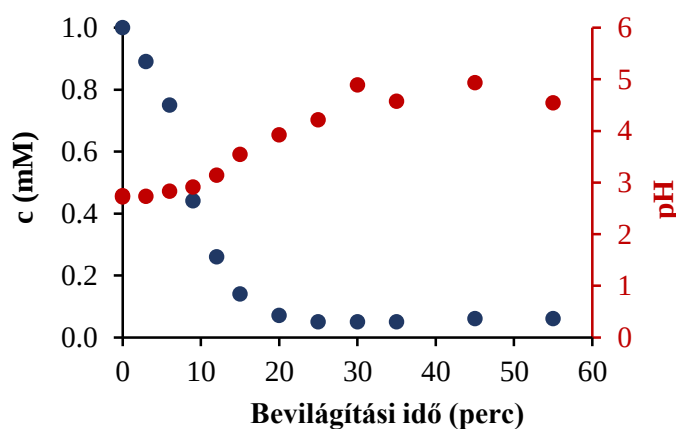


33. ábra: A kezdeti 7-hidroxi-kumarin képződési sebességek (a meghatározás hibája ± 4 -5%).

Az oxálsav degradációja

A katalizátorok fotoaktivitásának minősítésére egy másik lehetőség, ha modellvegyületként az oxálsavat alkalmazzuk.

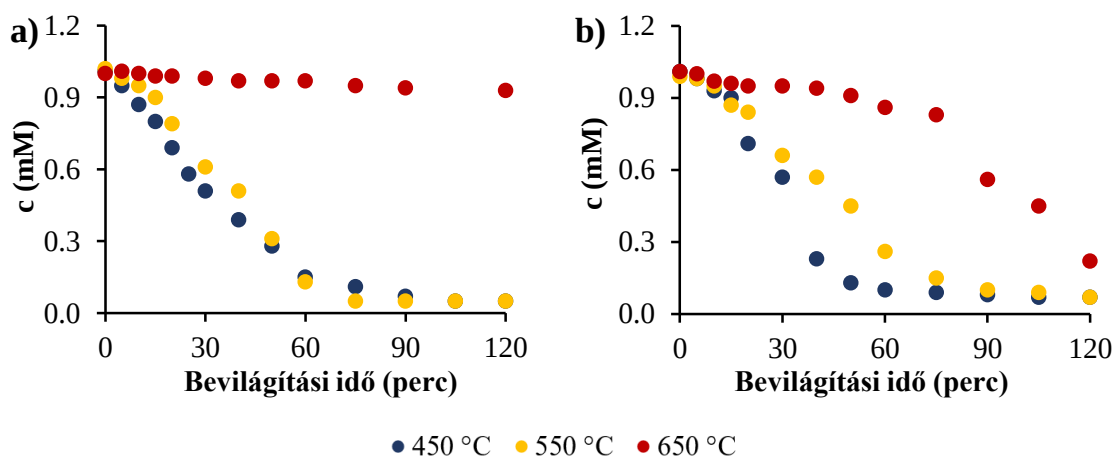
A referencia katalizátort tartalmazó szuszpenziókban gyakorlatilag 20 perc alatt teljesen lebomlott az oxálsav, miközben az oldat pH-ja 2,72-ről 4,93-ra nőtt, a számított kezdeti bomlási sebesség: $4,88 \cdot 10^{-5}$ M min⁻¹ (34. ábra).



34. ábra: Az oxálsav bomlása Degussa P25 TiO₂-on.

c_0 (oxálsav): 10^{-3} M, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} katalizátor

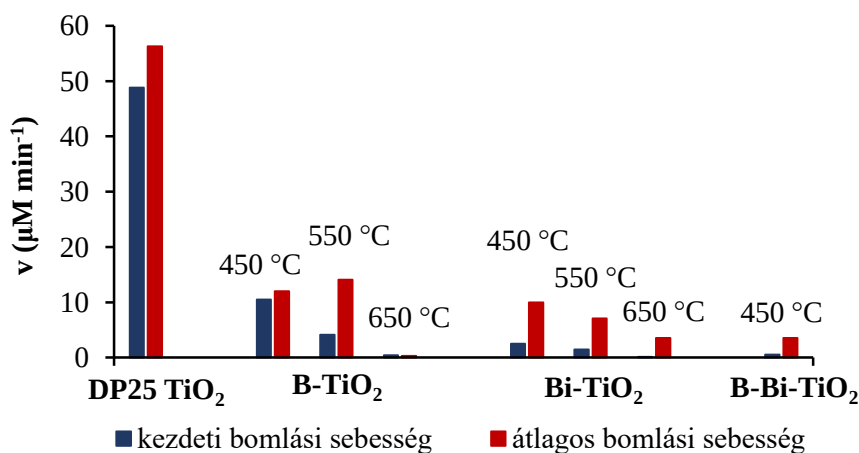
A 450 °C-on és az 550 °C-on kalcinált B-TiO₂-ot, illetve Bi-TiO₂-ot tartalmazó szuszpenziókban a modellvegyület koncentrációja 60-90 perc alatt (a pH növekedése mellett) a kimutathatósági határ alá csökkent (35. ábra). A 650 °C-on kalcinált B-TiO₂ fotoaktivitása csekély, gerjesztését követően alig degradálódik a dikarbonsav (35.a ábra).



35. ábra: Az oxálsav degradációja a) B-TiO₂ b) Bi-TiO₂ katalizátorokon.

$c_0(\text{oxálsav}): 10^{-3} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} katalizátor

Sok esetben megfigyeltem a koncentráció - idő grafikonokon, hogy a bevilágítás kezdeti szakaszában a modellvegyület aktuális koncentrációja alig változott, például a Bi-TiO₂ (650 °C) katalizátor jelenlétében 75 perc alatt a kiindulási 10^{-3} mol/dm^3 értékről csak $8,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ -re csökkent, majd ezután 45 perc alatt $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ -re (35.b ábra). E jelenség számszerűsítése céljából definiáltam egy úgynevezett átlagos bomlási sebességet, amelyet a 90%-os degradációhoz tartozó koncentrációváltozás és az ehhez szükséges idő hányadosaként számoltam. A két sebességi adat összehasonlításából következtetni lehet a kezdeti, kisebb bomlási sebességgel jellemezhető fázis jelenlétére (36. ábra).

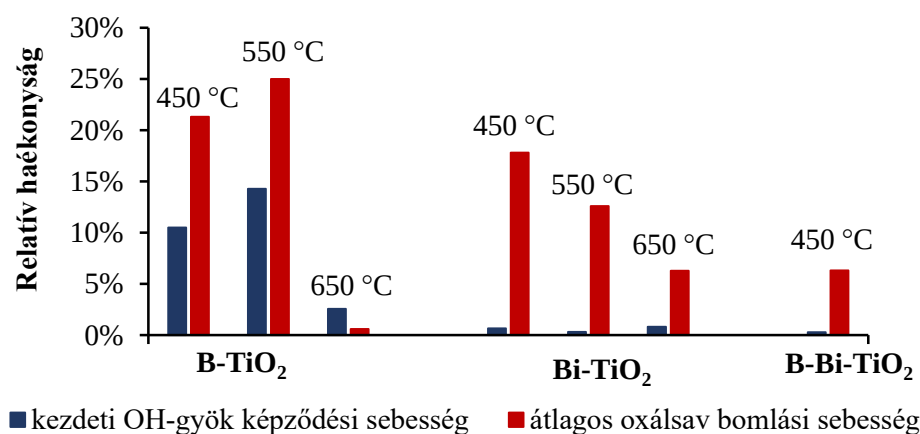


36. ábra: A kezdeti és az átlagos oxálsav bomlási sebességek az egyes katalizátorokon.

(A meghatározás hibája $\pm 4\%$.)

A 37. ábrán a módosított katalizátorok esetén számolt kezdeti 7-hidroxi-kumarin képződési (v_{7hk}) és az átlagos oxálsav bomlási sebességeket ($v_{oxálsav}$) hasonlítottam össze a Degussa P25 esetén meghatározott sebességi adatokhoz viszonyítva (32). E két jellemző választása azért tűnik célszerűnek, mert így egyrészt a többszöri hidroxileződés, másrészt az oxálsav bomlása elején megfigyelhető lassabb szakasz módosító hatása is kiküszöbölhető.

$$\text{Relatív hatékonyság} = \frac{v_{7hk \text{ vagy } oxálsav}(\text{katalizátor})}{v_{7hk \text{ vagy } oxálsav}(\text{Degussa})} \cdot 100 \quad (32)$$



37. ábra: A katalizátorok relatív hatékonyságának összehasonlítása.

(A meghatározás hibája ±4%.)

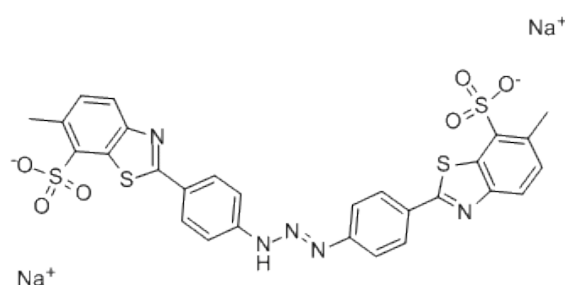
Ha az oxálsav átalakulásáért csak a hidroxilgyök lenne a felelős, akkor adott katalizátor esetén a relatív hatékonyságok megegyeznének. Ezzel szemben a 37. ábrán jól látszik, hogy az oxálsav bomlási sebessége szinte minden esetben nagyobb a referenciához viszonyítva, mint a 7-hidroxi-kumarin képződési sebessége. Ebből arra következtetünk, hogy a dikarbonsav lebomlásában nemcsak a hidroxilgyök, hanem a szuperoxid-gyökanion és közvetlenül a lyuk is szerepet játszik, azaz a degradációért több reaktív részecske is felelős. Annak feltárására, hogy melyik milyen mértékben járul hozzá a lebomláshoz további kísérletek szükségesek. Egyik lehetséges út, ha a bevilágítást argon atmoszférában végezzük el, s úgy vizsgáljuk a reakció sebességi viszonyait. Másik megoldás a szuperoxid-gyökanion képződési sebességének meghatározása, ám ez a gyökanion nagy reakciókészsége miatt igen nehéz feladat.

5.2.2 Aktivitás látható fényben

Vizsgáltam a katalizátorok aktivitását a látható fény tartományában is, ugyanolyan kísérleti körülményeket alkalmaztam, mint az UV fotoaktivitás tanulmányozásakor.

A bevilágítási kísérletek nem adtak pozitív eredményt. A kumarin oldatban a hidroxilgyök képződése gyakorlatilag elhanyagolható volt, és az oxálsav sem bomlott.

Bagwasi és munkatársai a bórral és bizmuttal módosított katalizátorok hatékonyságának megállapításakor modellvegyületként festékanyagot alkalmaztak (AO7) [25]. Kísérleti munkám következő szakaszában megvizsgáltam, hogy mi történik egy hasonló szerkezetű vegyület, a titánsárga (38. ábra) oldatának bevilágításakor.



38. ábra: A titánsárga szerkezete.

Az előkísérletek alapján a modellvegyület optimális koncentrációja $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³-nek adódott. Fényelnyelési színekében 322 és 407 nm-nél találunk abszorpciós maximumot (7. melléklet), 407 nm-en a moláris fényelnyelési együttható: $\varepsilon = 20283 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A vegyület fényelnyelése katalizátor nélküli oldatok Vis LED-del történő besugárzásakor nem változott, azaz a titánsárga nem bomlott.

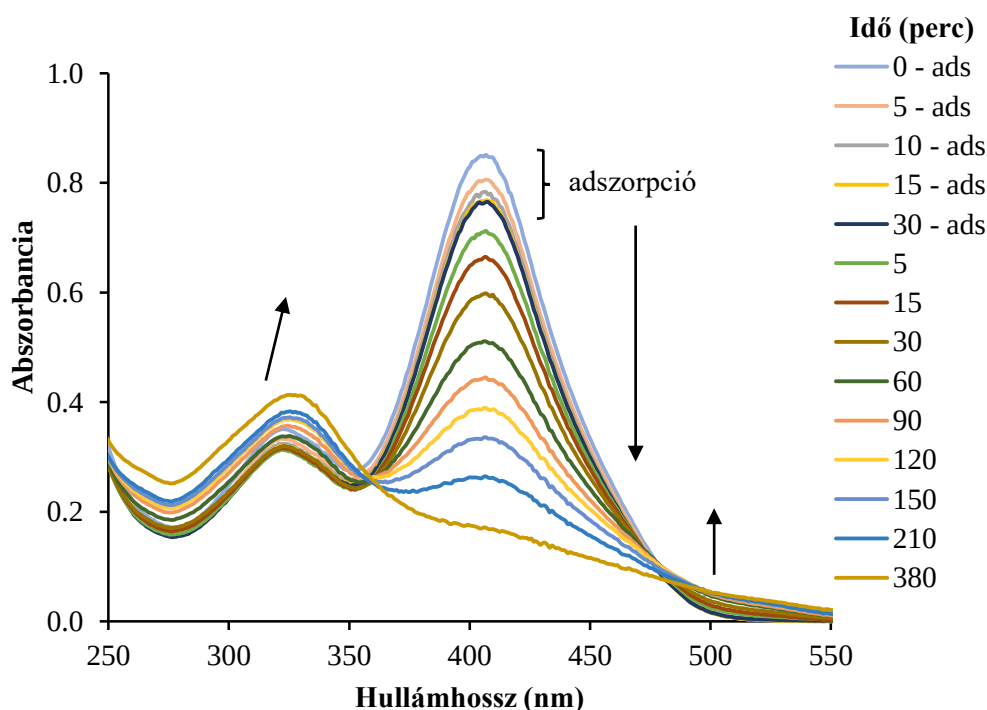
A titánsárga adszorpciója, degradációja

A modellvegyület fotodegradációjának vizsgálatát a 4.4.2. fejezetben leírtak szerint végeztem. A bevilágítás előtti 30 percben az adszorpció nyomon követése céljából mintát vettem a szuszpenzióból. A módosítatlan és a bórral adalékolt katalizátorokon nem tapasztaltam jelentős adszorpciót, míg a Bi-tartalmú titán-dioxid mintákon a festékanyag koncentrációja fokozatosan csökkent (8. melléklet). 25-30 perc alatt alakult ki az adszorpciós egyensúly, a felületi megkötődés 9-10%-os volt (7. táblázat). Ez a tendencia összhangban van a katalizátorok fajlagos felületének nagyságával, a legnagyobb értékeket a bizmut-tartalmú mintákra kaptuk (4. táblázat).

7. táblázat: Az adszorpció mértéke a különböző katalizátorokon.

(450 °C)	Adszorpció ($\Delta A/A_0$)
TiO₂	0 %
B-TiO₂	1 %
Bi-TiO₂	9 %
B-Bi-TiO₂	10 %

A modellvegyület fényelnyelési színeképének változását a 450 °C-on kalcinált B-Bi-TiO₂-ot tartalmazó szuszpenzió bevilágításakor a 39. ábrán szemléltetem. Jelentős változások figyelhetők meg: 407 nm-en az abszorbancia csökkenése intenzív, amely a modellvegyület átalakulására enged következtetni. Közttermék(ek) keletkezésére utal a fényelnyelés növekedése 322 nm-en, itt a sáv maximuma kis mértékben el is tolódik a nagyobb hullámhosszak felé, 380 perc után a maximum már 328 nm-en jelentkezik. Ugyancsak közttermék(ek) képződésére utal az 520 nm körül tapasztalható fényelnyelés növekedése.

**39. ábra:** A titánsárga fényelnyelési színeképének változása.

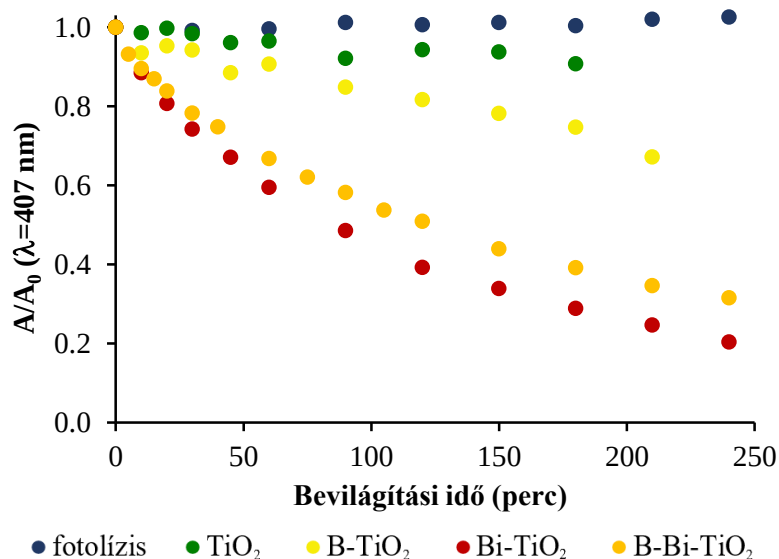
c_0 (titánsárga): $5 \cdot 10^{-5}$ M, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} B-Bi-TiO₂ (450 °C), ℓ : 1 cm

Habár a spektrális változások a titánsárga átalakulására utalnak, az oldat szerves széntartalma (TOC értéke) nem csökkent.

A fotoindukált folyamatokban első lépésben feltehetően a könnyen támadható azo-amino-csoport lép reakcióba, s ez eredményezi a tapasztalt színeképi változásokat, ám az átalakulás pontos ismeretéhez további vizsgálatok szükségesek.

Összehasonlítottam a különböző (450 °C-on kalcinált) katalizátorokon a titánsárga bomlását, a 407 nm-en mérhető abszorbancia időbeni változását a 40. ábrán mutatom be.

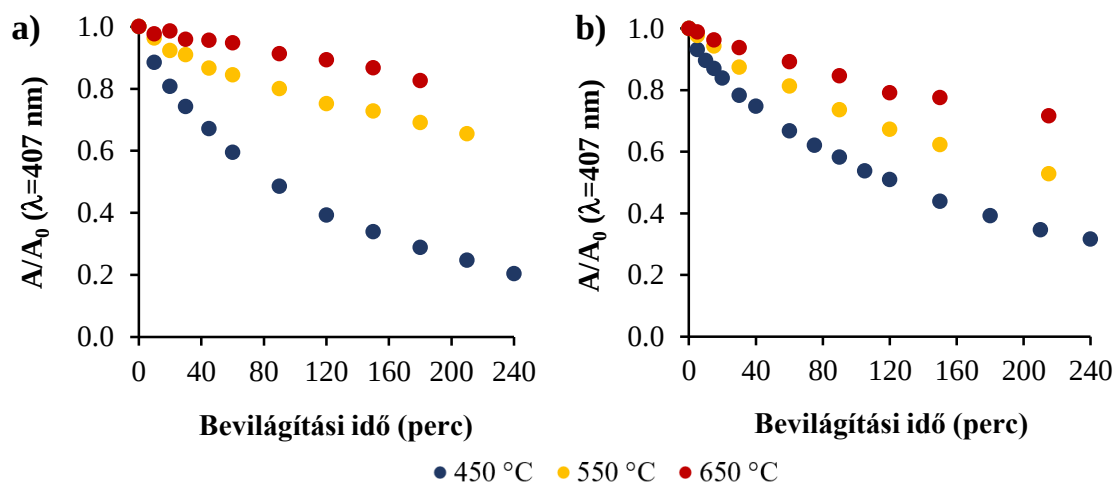
A módosítatlan katalizátor jelenlétében a modellvegyület bomlása látható fény hatására minimális. A bórral adalékolt TiO₂-ot tartalmazó szuszpenziókban 3,5 óra alatt 32,9%-kal csökkent a fényelnyelés, bizmuttal módosított katalizátorok jelenlétében nagyobb a változás: Bi-TiO₂ – 75,3%, B-Bi-TiO₂ – 65,4% (40. ábra). Összehasonlítva az aktivitásbeli sorrendet a fajlagos felület értékeivel, szembetűnő az összefüggés: a fajlagos felület (4. táblázat) növekedésével nő az aktivitás.



40. ábra: A titánsárga bomlásának összehasonlítása a különböző katalizátorokon.

c_0 (titánsárga): $5 \cdot 10^{-5}$ M, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} katalizátor, ℓ : 1 cm

Ezután vizsgáltam a kalcinálási hőmérséklet hatását. Azt tapasztaltam, hogy mindkét katalizátor (Bi-TiO₂, B-Bi-TiO₂) esetén a 450 °C-on hőkezelték fotoaktivitása volt a legnagyobb, a kalcinálási hőmérséklet emelésével csökkent a titánsárga degradációjának mértéke (41. ábra). Ez szintén összefüggésbe hozható a fajlagos felület értékeivel (5. táblázat), valamint a gerjesztési küszöbenergiával (6. táblázat) is.



41. ábra: A kalcinálási hőmérséklet hatása a titánsárga bomlására.

a) Bi-TiO₂ b) B-Bi-TiO₂

c_0 (titánsárga): $5 \cdot 10^{-5}$ M, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} katalizátor, l : 1 cm

A 8. táblázatban a számított kezdeti bomlási sebességeket hasonlítottam össze. Alacsonyabb kalcinálási hőmérsékleten (450 °C) a Bi-TiO₂ katalizátor fotoaktivitása kissé nagyobb, mint a B-Bi-TiO₂-é, magasabb hőmérsékleten (650 °C) a B-Bi-TiO₂ tűnik hatásosabbnak.

8. táblázat: Kezdeti bomlási sebességek (a meghatározás hibája $\pm 4\%$).

(min^{-1})	450 °C	550 °C	650 °C
Bi-TiO₂	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \cdot 10^{-4}$
B-Bi-TiO₂	$7,3 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$

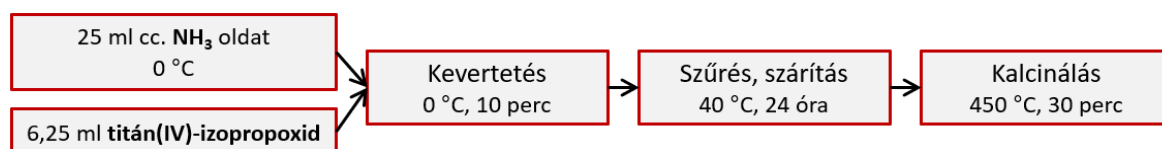
Az eredmények alapján valószínűsítjük, hogy a titánsárga degradációjának vizsgálatokor tapasztalt aktivitás oka, hogy a festékmolekula fényérzékenyítőként is viselkedhet a rendszerben. Ekkor a látható fény elnyeléséért a festékmolekula a felelős. A gerjesztést követően az elektron a félvezetőre vándorol, majd a töltésviteli folyamatok során képződő gyökök reagálnak a felületen adszorbeálódott festékmolekulával.

6. Terveim a folytatásra

Fontos tapasztalat, hogy a szakirodalmat minden esetben fenntartásokkal kell kezelni. Szembetűnő, hogy a cikkek többségében a katalizátorok látható tartománybeli aktivitásának tesztelésekor különböző festékanyagokat alkalmaznak modellvegyületként, s kevés példa van arra, hogy közvetlenül a reaktív részecskék koncentrációját határozzák meg. Hasonló következtetésre jutottak *Bagwasi és munkatársai* is. Cikkükben leírták, hogy azért választották modellvegyületnek a 2,4-diklórfenolt, hogy kiküszöböljék a fényérzékenyítés lehetőségét [41].

Megfelelő modellvegyület lehet a fenilalanin, amely nem színes, ezért nem érzékenyíti a katalizátort. Aromás gyűrűje és alifás oldallánca lehetőséget nyújt, hogy árnyaltabb képet kapjunk a katalizátorok aktivitásáról [42]. Az aminosavak amino-, illetve karboxilcsoportja reakcióba léphet a félvezető gerjesztésekor képződő részecskepár redukáló és oxidáló komponensével is, valamint a víz- és az oxigénmolekulákból elsődleges elektronátadási folyamatokban képződő különböző reaktív gyökökkel. Ezen reakciókon túl, azt is figyelembe kell venni, hogy az elektrofil tulajdonságú hidroxilgyök megtámadhatja a fenilcsoportot: a molekula hidroxileződhet, ezt követően pedig megtörténhet a gyűrű felnyílása is.

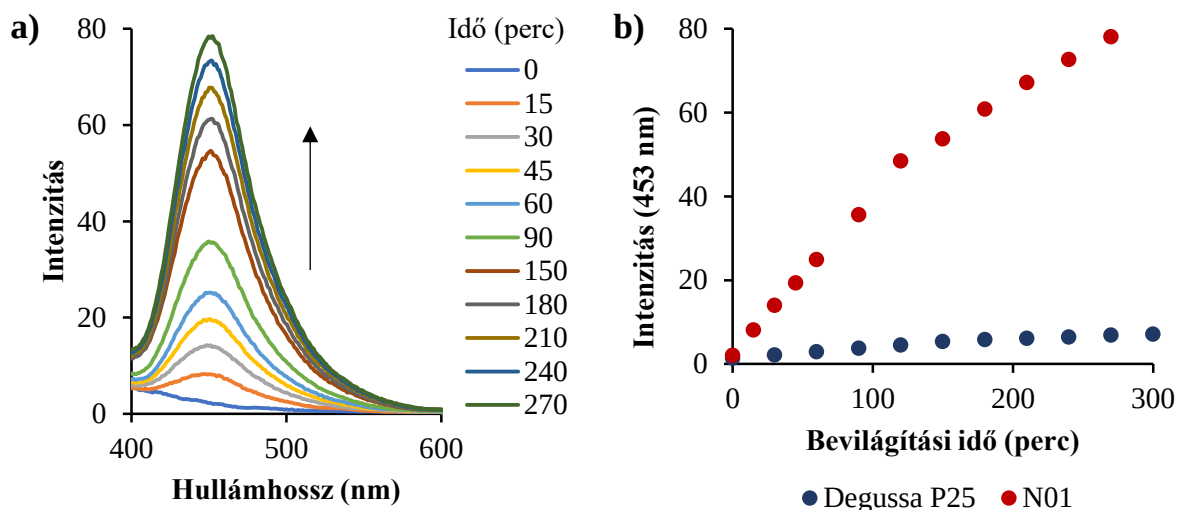
További terveim között szerepel új módosító elem(ek) alkalmazása. Az előkísérlet során *Vaiano és munkatársai* módszere alapján nitrogénnel módosított TiO_2 -ot (N01) állítottam elő (42. ábra) [43].



42. ábra: A N- TiO_2 előállítási módja.

6,25 ml titán(IV)-izopropoxidot intenzív kevertetés közben 25 ml 0 °C-ra előhűtött 25%-os ammónia oldathoz öntöttem. A fehér csapadék azonnal kivált, melyet 10 perc kevertetés után üvegszűrőn leszűrtem, desztillált vízzel mostam és szárítószekrényben szárítottam. Az így kapott anyagot porítottam, és a korábbiaktól eltérő módon csupán 30 percig kalcináltam 450 °C-on. A folyamat végén halványsárga port kaptam, melynek gerjesztési küszöbenergiája 3,11 eV-nak adódott.

Vis LED alkalmazása mellett vizsgáltam a kumarin átalakulását. A 7-hidroxi-kumarin képződését a 43. ábra szemlélteti.



43. ábra: A 7-hidroxi-kumarin lumineszcencia intenzitásának változása.

$c_0(\text{kumarin}): 10^{-4} \text{ M}$, levegőáram: $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, 1 g dm^{-3} katalizátor, $\lambda_{\text{gerj.}}: 332 \text{ nm}$, $\epsilon: 1 \text{ cm}$

Az eredmények jól mutatják, hogy az előállított katalizátor jelentős aktivitással bír a látható tartományban: A N-TiO₂ esetén 300 perces bevilágítás alatt több mint 10-szeres mennyiségű hidroxilgyök képződött, mint a Degussa P25 jelenlétében. Azonos körülmények között a B-Bi-TiO₂ mellett nem képződött hidroxilgyök.

Vizsgáltuk az eredmények reprodukálhatóságát is. Párhuzamos mérések során a meghatározott kezdeti képződési sebességek eltérése csupán 3%. Ezzel szemben új katalizátort előállítva, annak aktivitása lényegesen kisebb volt (eltérés: 51%). Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a preparálási körülmények legapróbb megváltozása is jelentősen befolyásolja a katalizátor minőségét, fotoaktivitását.

A nitrogén ígéretes, és széleskörűen kutatott adalékoló elem: a szakirodalomban gyakran lehet olyan cikkeket olvasni, melyekben nitrogénnel módosított TiO₂ fotokatalitikus tulajdonságainak vizsgálatáról számolnak be [18, 21, 24]. Az elvégzett előkísérlet is alátámasztja, hogy érdemes a nitrogénnel, mint adalékoló elemmel foglalkozni.

Céлом, hogy vizsgáljam a nitrogénnel módosított titán-dioxid fizikai jellemzőit, illetve fotoaktivitását kumarin és fenilalanin modellvegyület segítségével a látható fényben.

A jövőben tervezzük, hogy a katalizátorok szerkezetét transzmissziós elektronmikroszkóppal is megvizsgáljuk, valamint sok információval szolgálhat, ha tudjuk, hogy a módosító elem milyen formában és milyen pozícióban található a katalizátorban. Ennek meghatározása röntgen fotoelektron spektroszkópiai (XPS) módszerrel lehetséges, az analízis elvégzése távlati célunk.

7. Összefoglalás

Szakmai munkám során bórral és bizmutteral módosított katalizátorokat állítottam elő, majd tanulmányoztam szerkezeti és fotokémiai tulajdonságaikat.

- A termikus analízissel a kalcinálás alatt végbemenő folyamatokat vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a Ti-O-Ti kötések valószínűleg 245 °C körül alakulnak ki, ez a folyamat a DTA görbén exoterm csúcsot eredményezett. A TG és DTG görbék alapján valószínűsítettük, hogy a bizmut-tartalmú minták kalcinálásakor a NO₃⁻ ionok egy része már 150 °C körüli hőmérsékleten elbomlik. Az anatáz-rutil fázisátalakulást nem lehetett azonosítani a gyors felfűtési sebesség és a kis látens hő miatt.
- Az energiadiszperzív röntgen spektrometriás mérések kimutatták, hogy a bizmutteral módosított katalizátorok kb. 1,1 mol%-a bizmut, amely a titánhoz viszonyítva kicsivel több, mint 3%.
- A Raman spektrumok és a röntgendiffrakciós eredmények alapján elmondható, hogy a módosítatlan TiO₂ kalcinálásakor a hőmérséklet emelésével párhuzamosan megtörténik az anatáz rutillá alakulása. A bór kis mértékben, a bizmut pedig teljesen visszaszorította a fázisátalakulást. A 650 °C-on kalcinált, bórral és bizmutteral módosított katalizátor ugyan tartalmazott kis mennyiségű rutilt, ám nem számottevő mennyiségben.
- A bórral és bizmutteral történő módosítás hatására nőtt a katalizátor fajlagos felülete, a kapott értékek jó egyezést mutatnak a szakirodalmi adatokkal. A kalcinálási hőmérséklet emelésével jelentősen csökkent a fajlagos felület.
- A bórral történő adalékolás nem csökkentette a tiltott sáv szélességét. Abban az esetben, ha a módosító elem bizmut, jelentősen nőtt a katalizátor fényelnyelése a látható tartományban, a gerjesztési küszöbenergia 3,01 eV-ról 2,82 eV-ra csökkent.
- A 750 °C-on kalcinált B-Bi-TiO₂ katalizátor 88,5%-nyi rutil módosulat mellett 11,5%-nyi α-Bi₂(Ti₄O₁₁) fázist is tartalmaz, gerjesztési küszöbenergiája 2,93 eV.
- Vizsgáltam az előállított katalizátorok aktivitását az UV tartományban. A bevilágítás során keletkező 7-hidroxi-kumarin képződési sebessége minimális a Degussa P25 TiO₂ esetén mért értékekhez képest, míg az oxálsav bomlási sebessége összemérhető a

referencia katalizátoron mért adatokkal. Ennek oka, hogy az oxálsav átalakulásáért több részecske is felelős.

- Látható fény hatására a hidroxilgyök képződése gyakorlatilag elhanyagolható, valamint az oxálsav sem degradálódott az adott körülmények között.
- Titánsárgát alkalmazva modellvegyületként, a módosított katalizátorokat tartalmazó szuszpenzióban az oldat fényelnyelése szignifikánsan csökkent a látható fénnel történő bevilágítás során, azonban a reakcióelegy szerves széntartalma nem változott. Valószínűsítettük, hogy a spektrális változást a katalizátor felületén adszorbeálódott festékmolekula kötési rendszerében bekövetkező átalakulások okozták.
- UV fénnel történő bevilágítás során a bórral adalékolt, míg látható fény hatására a bizmutot is tartalmazó katalizátorok mutattak nagyobb fotoaktivitást. Az eltérő viselkedés valószínűleg a gerjesztési küszöbenergiák közötti különbséggel magyarázható, de a katalizátor egyéb paraméterei is befolyásolhatják a gerjesztést követően lejátszódó folyamatokat.

Irodalomjegyzék

- [1] Hager, D. G. (1990). UV-catalyzed hydrogen peroxide chemical oxidation of organic contaminants in water. *Innovative Hazardous Waste Treatment Technology Series*, 2, 143.
- [2] Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A., & Marotta, R. (1999). Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53(1), 51-59.
- [3] Gümüş, D., & Akbal, F. (2016). Comparison of Fenton and electro-Fenton processes for oxidation of phenol. *Process Safety and Environmental Protection*, 103, 252-258.
- [4] Nawrocki, J. (2013). Catalytic ozonation in water: Controversies and questions. Discussion paper. *Applied Catalysis B: Environmental*, 142, 465-471.
- [5] Chávez, A. M., Rey, A., Beltrán, F. J., & Álvarez, P. M. (2016). Solar photo-ozonation: A novel treatment method for the degradation of water pollutants. *Journal of Hazardous Materials*, 317, 36-43.
- [6] Fujishima, A. (1999). TiO₂ photocatalysis fundamentals and applications. *A Revolution in cleaning technology*, 14-21.
- [7] Ayodhya, D., & Veerabhadram, G., (2018). A review on recent advances in photodegradation of dyes using doped and heterojunction based semiconductor metal sulfide nanostructures for environmental protection. *Materials Today Energy*, 9, 83-113.
- [8] Fujishima, A. (1969). K. Honda, & S. Kikuchi. *Kogyo Kagaku Zasshi*, 1971, 72(1), 108. A. Fujishima, E. Hayashitani & K. Honda. *Seim Kenkyu*, 23, 363.
- [9] Fujishima, A., Rao, T. N., & Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry reviews*, 1(1), 1-21.
- [10] Augugliaro, V., Loddo, V., Pagliaro, M., Palmisano, G., & Palmisano, L. (2010). Clean by light irradiation: Practical applications of supported TiO₂. Royal Society of Chemistry.
- [11] Garcia, C. G., de Lima, J. F., & Iha, N. Y. M. (2000). Energy conversion: from the ligand field photochemistry to solar cells. *Coordination Chemistry Reviews*, 196(1), 219-247.
- [12] Vinu, R., Poliseti, S., & Madras, G. (2010). Dye sensitized visible light degradation of phenolic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 165(3), 784-797.

- [13] Fung, A. K., Chiu, B. K., & Lam, M. H. (2003). Surface modification of TiO₂ by a ruthenium (II) polypyridyl complex via silyl-linkage for the sensitized photocatalytic degradation of carbon tetrachloride by visible irradiation. *Water research*, 37(8), 1939-1947.
- [14] Znad, H., & Kawase, Y. (2009). Synthesis and characterization of S-doped Degussa P25 with application in decolorization of Orange II dye as a model substrate. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 314(1-2), 55-62.
- [15] Sharma, P. K., Cortes, M. A. L., Hamilton, J. W., Han, Y., Byrne, J. A., & Nolan, M. (2017). Surface modification of TiO₂ with copper clusters for band gap narrowing. *Catalysis Today*.
- [16] Wu, M. C., Wu, P. Y., Lin, T. H., & Lin, T. F. (2018). Photocatalytic performance of Cu-doped TiO₂ nanofibers treated by the hydrothermal synthesis and air-thermal treatment. *Applied Surface Science*, 430, 390-398.
- [17] Asiltürk, M., Sayılkan, F., & Arpaç, E. (2009). Effect of Fe³⁺ ion doping to TiO₂ on the photocatalytic degradation of Malachite Green dye under UV and vis-irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 203(1), 64-71.
- [18] Khaki, M. R. D., Shafeeyan, M. S., Raman, A. A. A., & Daud, W. M. A. W. (2017). Application of doped photocatalysts for organic pollutant degradation-A review. *Journal of Environmental Management*, 198, 78-94.
- [19] Szabó-Bárdos, E., Czili, H., & Horváth, A. (2003). Photocatalytic oxidation of oxalic acid enhanced by silver deposition on a TiO₂ surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 154(2-3), 195-201.
- [20] Simsek, E. B. (2017). Solvothermal synthesized boron doped TiO₂ catalysts: photocatalytic degradation of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals under visible light irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 200, 309-322.
- [21] Nassoko, D., Li, Y. F., Wang, H., Li, J. L., Li, Y. Z., & Yu, Y. (2012). Nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles by using EDTA as nitrogen source and soft template: Simple preparation, mesoporous structure, and photocatalytic activity under visible light. *Journal of Alloys and Compounds*, 540, 228-235.
- [22] Li, B., Zhao, Z., Gao, F., Wang, X., & Qiu, J. (2014). Mesoporous microspheres composed of carbon-coated TiO₂ nanocrystals with exposed {001} facets for improved visible light photocatalytic activity. *Applied Catalysis B: Environmental*, 147, 958-964.

- [23] Smijs, T. G., & Pavel, S. (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4, 95.
- [24] Devi, L. G., Nagaraj, B., & Rajashekhar, K. E. (2012). Synergistic effect of Ag deposition and nitrogen doping in TiO₂ for the degradation of phenol under solar irradiation in presence of electron acceptor. *Chemical Engineering Journal*, 181, 259-266.
- [25] Bagwasi, S., Tian, B., Zhang, J., & Nasir, M. (2013). Synthesis, characterization and application of bismuth and boron Co-doped TiO₂: a visible light active photocatalyst. *Chemical Engineering Journal*, 217, 108-118.
- [26] Borzyszkowska, A. F., Pieczyńska, A., Ofiarska, A., Nikiforow, K., Stepnowski P., & Siedlecka, E. M., (2016) Bi-B-TiO₂-based photocatalytic decomposition of cytostatic drugs under simulated sunlight treatments. *Separation and Purification Technology*, 169, 113-120.
- [27] Czili, H., & Horváth, A. (2008). Applicability of coumarin for detecting and measuring hydroxyl radicals generated by photoexcitation of TiO₂ nanoparticles. *Applied Catalysis B: Environmental*, 81(3-4), 295-302.
- [28] Louit, G., Foley, S., Cabillic, J., Coffigny, H., Taran, F. Valleix, A., Renault, J. P. & Pin, S., (2005) *Radiation Physics and Chemistry*. 72, 119-124.
- [29] Herrmann, J. M., Mozzanega, M. N., & Pichat, P. (1983). Oxidation of oxalic acid in aqueous suspensions of semiconductors illuminated with UV or visible light. *Journal of Photochemistry*, 22(4), 333-343.
- [30] Kosanić, M. M. (1998). Photocatalytic degradation of oxalic acid over TiO₂ power. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 119(2), 119-122.
- [31] Domènech, X., Ayllón, J. A., & Peral, J. (2001). H₂O₂ formation from photocatalytic processes at the ZnO/water interface. *Environmental Science and Pollution Research*, 8(4), 285-287.
- [32] Smith, R. A. (1978). *Semiconductors*. Cambridge University Press
- [33] Hatchard, C. G., & Parker, C. A. (1956). A new sensitive chemical actinometer-II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. *Proceedings of the Royal Society London A*, 235(1203), 518-536.
- [34] Hart, E. J. & Henglein, A., (1987). *The Journal of Physical Chemistry*, 91, 3654

- [35] Duval, C. (1963). Chapter 22: Titanium In *Inorganic thermogravimetric analysis*. (pp. 289). Elsevier Publishing Company,
- [36] Kodama, H. (1994). Synthesis of a new compound, Bi₅O₇NO₃, by thermal decomposition. *Journal of Solid State Chemistry*, 112(1), 27-30.
- [37] Duval, C. (1963). Chapter 79: Bismuth In *Inorganic thermogravimetric analysis*. (pp. 639) Elsevier Publishing Company
- [38] Hanaor, D. A., & Sorrell, C. C. (2011). Review of the anatase to rutile phase transformation. *Journal of Materials Science*, 46(4), 855-874.
- [39] Yang, J., Huang, Y. X., & Ferreira, J. M. F. (1997). Inhibitory effect of alumina additive on the titania phase transformation of a sol-gel-derived powder. *Journal of Materials Science Letters*, 16(23), 1933-1935.
- [40] Wu, Y., Xing, M., Tian, B., Zhang, J., & Chen, F. (2010). Preparation of nitrogen and fluorine co-doped mesoporous TiO₂ microsphere and photodegradation of acid orange 7 under visible light. *Chemical Engineering Journal*, 162(2), 710-717.
- [41] Bagwasi, S., Niu, Y., Nasir, M., Tian, B., Zhang, J. (2013). The study of visible light active bismuth modified nitrogen doped titanium dioxide photocatalysts: Role of bismuth. *Applied Surface Science*, 264, 139-147.
- [42] Szabó-Bárdos, E., Somogyi, K., Törő, N., Kiss, Gy., & Horváth, A. (2011). Photocatalytic decomposition of L-phenylalanine over TiO₂: Identification of intermediates and the mechanism of photodegradation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 101, 471-478.
- [43] Vaiano, V., Sacco, O., Sannino, D., Navarra W., Daniel, C. & Venditto, V. (2017). Influence of aggregate size on photoactivity of N-doped TiO₂ particles in aqueous suspensions under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 336, 191-197.

Köszönetnyilvánítás

Nagyon szépen köszönöm témavezetőmnek, Szabóné dr. Bárdos Erzsébetnek a támogatását, hogy mindig a legtöbbet akarja belőlem kihozni, köszönöm a fáradhatatlan munkáját, a sok segítséget és törődést.

Köszönöm Kulcsár Petrának a fotokatalitikus lebontási kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, valamint köszönöm Zsirkáné Fónagy Orsolyának a hasznos tanácsait a laborban végzett munka terén.

Megköszönöm Dr. Dobrádi Annamáriának és Dr. Kovács Kristófnak az elektronmikroszkópos felvételeket, Kristófné dr. Makó Évának az XRD méréseket, Tilinger Ferencnének a TOC meghatározásokat, Dr. Juzsakova Tatjánának a fajlagos felület méréseket, valamint Dr. Zsirka Balázsnak a szakmai segítséget és a Raman méréseket.

Köszönöm Dr. Fodor Lajosnak a gerjesztési küszöbenergia mérésének kivitelezéséhez nyújtott szakmai tanácsait.

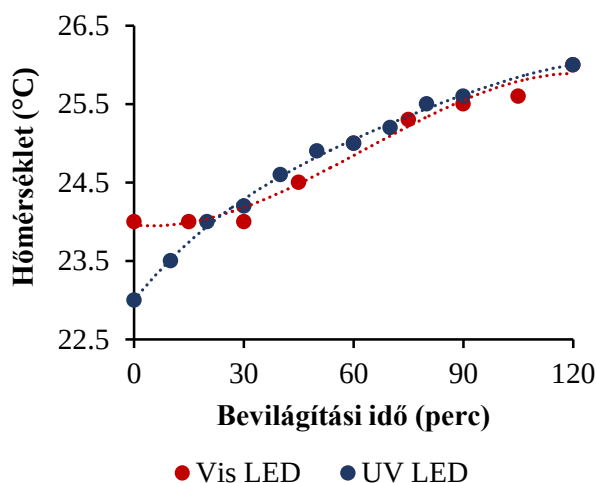


AZ EMBERI ERŐFORRÁSOK MINISZTERIUMA ÚNKP-18-1 KÓDSZÁMÚ ÚJ
NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.

A kutatás anyagi háttérét a GINOP-2.3.2-15-2016-00016 és az EFOP-3.6.1-16-2016-00015 pályázatok biztosították.

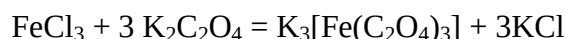
Mellékletek

1. melléklet: A reakcióelegy hőmérsékletének a változása.



2. melléklet: Az aktinometráláshoz szükséges anyagok és oldatok elkészítése.

10 gramm kálium-[trioxalát-ferrát(III)] ($K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$) előállítása:

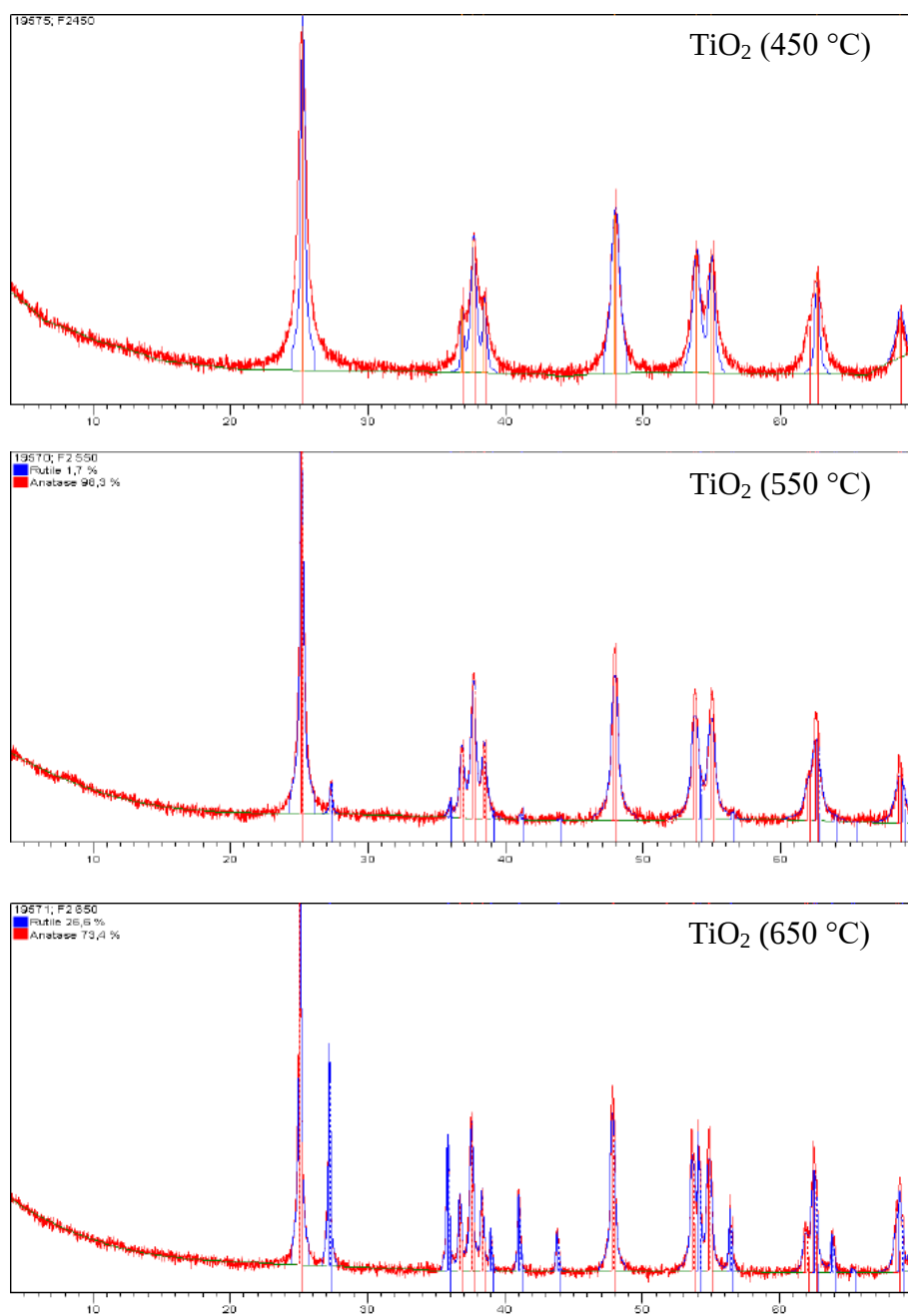


A számított mennyiségű $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -ból 20%-os oldatot kell készíteni, majd keverés közben hozzá kell adni 10%-kal több $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ 30%-os oldatához. Az elegyet 10-15°C-ra kell hűteni, hogy a termék kikristályosodjon. A kivált kristályokról az anyalúgot leöntése után, átkristályosítás céljából 20 cm³ meleg vízben újra fel kell oldani. Az oldatot lehűtése után a kivált anyagot szívótölcséren leszűrjük. Néhány cm³ jeges vízzel, majd néhány cm³ éterrel mossuk, levegőn szárítjuk és mérjük. A zöld színű kristályok fényérzékenyek, ezért sötét üvegben kell tárolni.

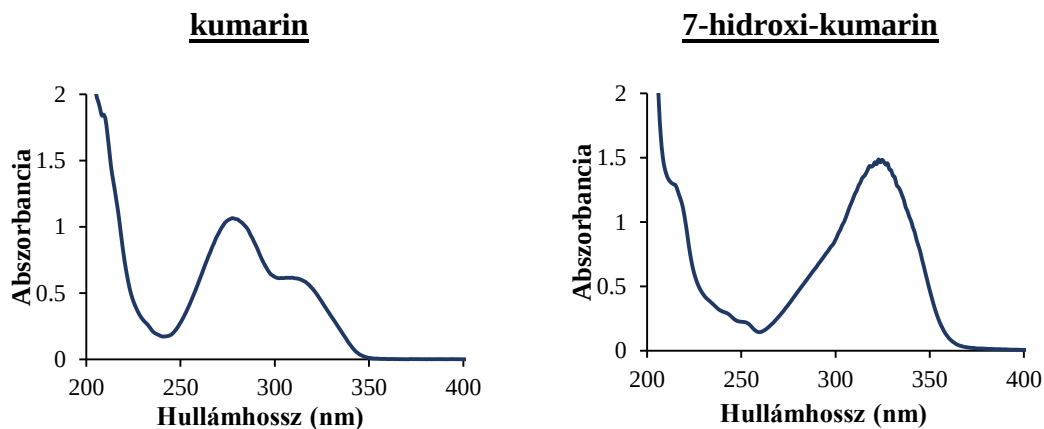
Aktinometráláshoz használt oldatok összetétele

- 1.) Ferrioxalát aktinométer oldat: 0,006 mol dm⁻³ $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$, 0,05 mol dm⁻³ H_2SO_4 vizes oldata
 - 2.) Fenantrolin oldat; 1,10-fenantrolin 0,1% (m/m) vizes oldata.
 - 3.) Nátrium-acetát-ecetsav puffer oldat: 600 cm³ 1 mol dm⁻³ $NaCH_3COO$ és 10,0 cm³ 20% (m/m) koncentrációjú kénsav oldat elegyét 1 dm³-re egészítjük ki desztillált vízzel.
- Az 1.) és 2.) oldat fényérzékeny, ezért sötétben kell tárolni.

3. melléklet: A módosítatlan TiO₂ XRD felvételei (piros: anatáz, kék: rutil).

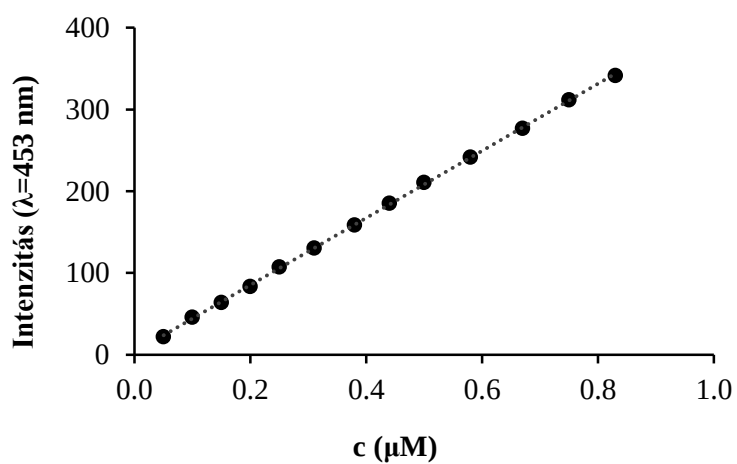


4. melléklet: A kumarin és a 7-hidroxi-kumarin fényelnyelési színeke és a moláris fényelnyelési együtthatók.



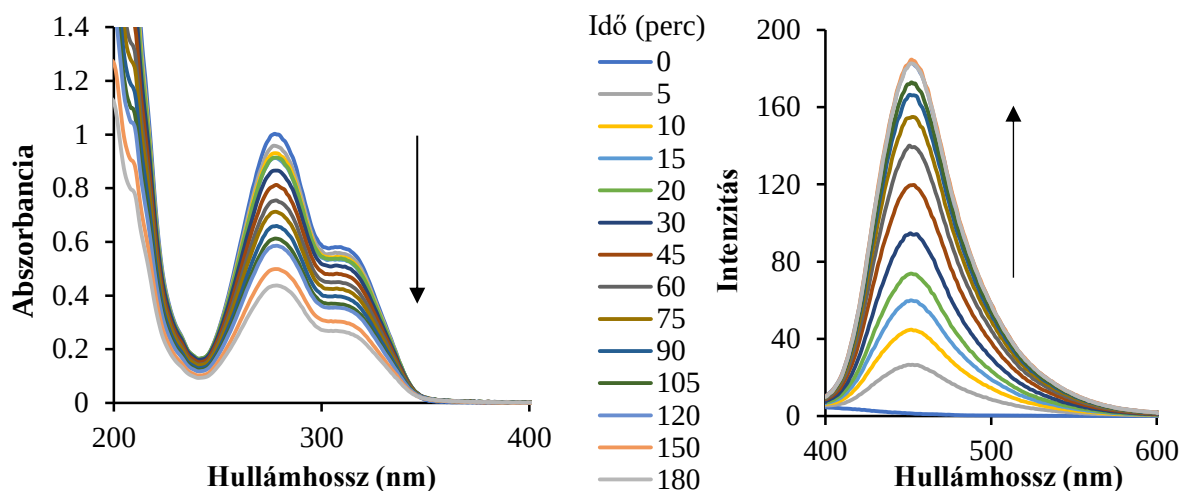
$c=10^{-4} \text{ M}, \ell=1$		$c=10^{-4} \text{ M}, \ell=1$	
278 nm	324 nm	278 nm	324 nm
$\varepsilon = 10627 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\varepsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\varepsilon = 4270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\varepsilon = 14835 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

5. melléklet: A 7-hidroxi-kumarin emissziójának változás a koncentráció függvényében.

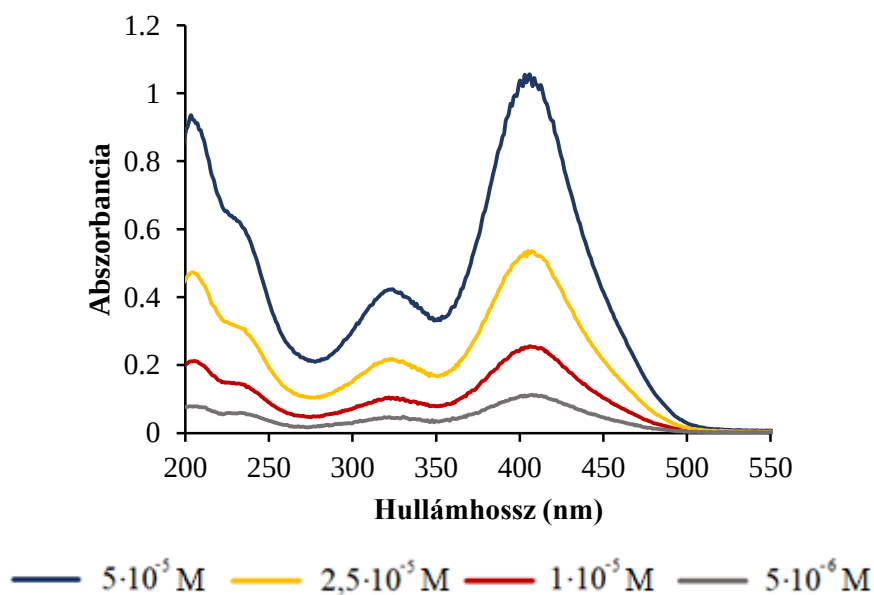


$$c [M] = 2,438 \cdot 10^{-9} \cdot I - 8,066 \cdot 10^{-9}$$

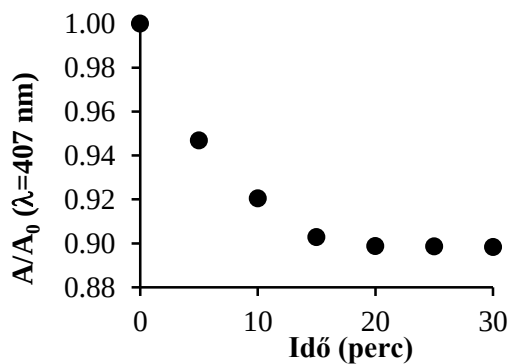
6. melléklet: A kumarin fényelnyelési színeképének, illetve a 7-hidroxi-kumarin emissziójának változása a B-TiO₂ (450 °C) katalizátort tartalmazó szuszpenziókban.



7. melléklet: A titánsárga fényelnyelési színeképe ($\ell = 1$, $\varepsilon_{(407\text{ nm})} = 20283\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).



8. melléklet: Adszorpció a B-Bi-TiO₂ (450 °C) katalizátoron.





**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018**



Forgócellás adagoló GPU-val gyorsított DEM szimulációja

Készítette: Füvesi Balázs

Témavezető: Dr. Ulbert Zsolt

Mérnöki Kar, Folyamatmérnöki Intézeti Tanszék

A pályamunka lezárásának dátuma: 2018. 11. 04.

Tartalom

Tartalmi kivonat.....	142
1. Bevezetés.....	143
2. A Diszkrét Elem Módszer	148
2.1. A Newtoni mozgásegyenletek.....	149
2.2. Részecske-részecske ütközések kezelése rugalmas ütközési modellel ..	151
2.2.1. Részecske-részecske ütközések kezelése	152
2.2.1.1. Normál irányú erők számítása	152
2.2.1.2. Tangenciális irányú erők számítása	155
2.2.1.3. A súrlódási erő számítása	158
2.2.2. Részecske-fal ütközések kezelése	158
2.2.2.1. Mozgó fal kezelése	158
2.2.2.2. Álló fal kezelése.....	159
3. A szimulált siló - cellás adagoló berendezés bemutatása.....	160
4. A szimulált berendezés geometria reprezentációja	163
5. GPU és párhuzamos számítás alkalmazása.....	165
6. Szimulációs eredmények és értékelésük	167
6.1. A cellás adagoló fordulatszámának és átmérőjének vizsgálata a részecske tömegáramra.....	167
6.2. A részecskék áramlási képének vizsgálata a cellás adagolóban	169
6.3. A cellás adagoló indításának vizsgálata	171
6. Összefoglaló	173
Köszönetnyilvánítás	174
Irodalomjegyzék.....	174

Tartalmi kivonat

Szilárd szemcsés anyagok silóból történő kontrollált kiürítésére a legelterjedtebb megoldás a cellás adagolók alkalmazása, melyet nem csak a vegyiparban, de szinte minden olyan területén használnak, ahol szilárd, szemcsés anyagok adagolására van szükség, mint például gyógyszer-, élelmiszer-iparban, mezőgazdaságban, bányászatban, vagy akár szilárd tüzelésű erőműveknél stb. Mivel a cellás adagolókat szilárd anyagok kontrollált mozgatására használják fontos, hogy azok működési jellemzői ismertek legyenek és, hogy jól lehessen használni a felmerülő irányítási feladatok végrehajtására.

A berendezések kísérleti vizsgálata sokszor nehézségekbe ütközhet, mivel a méréshez használt eszközök megváltoztathatják a berendezés működését. A Diszkrét Elem Módszer segítségével a szilárd szemcsés anyagok viselkedése jól szimulálható, vizsgálható, ugyanakkor a szemcsék számának növekedésével a számítási igénye jelentősen növekszik. A napjainkban egyre inkább fejlődő, viszonylag olcsón és egyszerűen elérhető sokszor HPC-s teljesítményre is képes GPU kártyák segítségével ezek a szimulációk a berendezés komplexitásától és részecskeszámától függően gyorsan elvégezhetők, a korábbi soros végrehajtású programok több hetes futási ideje néhány órára rövidíthető párhuzamos végrehajtású programok alkalmazásával.

A munkám során a forgócellás adagoló geometriai és műveleti paramétereinek hatását vizsgáltam az adagoló tömegáramára szimulációs úton. A részecskék mozgásának leírására és szimulációjára a diszkrét elem módszert alkalmaztam. A szimulációs vizsgálatokban a cellás adagoló átmérőjének és fordulatszámának hatását vizsgáltam az adagoló által át bocsátott tömegáramra. A fordulatszám változtatásával sikerült megállapítani egy olyan tartományt, ahol a tömegáram lineárisan változik a fordulatszámmal, majd a fordulatszám további növelésével a tömegáram egy maximumot ér el. Ennek fontos szerepe lehet a cella ürítéséhez kapcsolódó irányítási feladatok végrehajtásában. A szimulációs vizsgálatokat egy általam fejlesztett GPU-ra optimalizált programmal végeztem.

1. Bevezetés

A szilárd anyagok kezelése számos ipari technológia részét képezi a vegyiparban, gyógyszeriparban, élelmiszeriparban stb. Az egyszerűbb tárolási (pl. silós tárolás) és szállítási műveletektől (pl. pneumatikus szállítás) kezdve a gáz-szilárd vagy folyadék-szilárd kétfázisú műveletekig (pl. gáz-szilárd fluidizáció, gáz-szilárd katalitikus reakció) számos technológiai műveletben találkozhatunk a szilárd szemcsés anyagok felhasználásával. A szilárd részecskéket is magában foglaló kétfázisú műveletek, áramlások közös jellemzője, hogy a szilárd és gáz fázis közötti kölcsönhatás hatékony fáziskeveredést, intenzív tömeg és hőátadást tud biztosítani a legkülönbözőbb műveleti célokra (pl. gáz-szilárd kémiai reakció). A szilárd fázis mozgása a részecskék közötti ütközések és a légáram nyomó vagy húzó hatásának mértékétől függően különböző áramlási mechanizmust és áramlási képet eredményezhet. A szilárd anyagokat tartalmazó műveletek kísérleti vizsgálata idő és költségigényes, a vizsgálatokkal kapott eredmények sokszor nem teljes körűek köszönhetően a mérőeszközök korlátjainak és annak, hogy nehéz a mérőeszköz elhelyezése a szilárd áramló fázisban úgy, hogy ne változtassuk meg annak áramlási tulajdonságait. Bár számos fejlett mérési technika létezik már a szilárd áramlások tulajdonságainak mérésére, mint például a fázis-doppler részecske analízátor, a nagysebességű video feldolgozás, a mágneses rezonancia tomográfia, a pozitron emissziós részecske követés stb., amelyek hasznos információkat nyújtanak a részecskék mozgásáról, azonban számos olyan tényező, amelyek az áramlás struktúráját jelentősen befolyásolják, mint pl. az ütköző részecskék közötti erőhatások, még nem állnak rendelkezésre.

A kísérletek azonban könnyebben elvégezhetők szimulációs vizsgálatok felhasználásával, ha megfelelően részletes modell áll a rendelkezésünkre a vizsgált rendszerrel kapcsolatban. A szilárd szemcsés anyagok áramlásának modellezése és szimulációja egyre népszerűbbé válik és intenzív kutatómunka látható e területen a vonatkozó irodalomban. A szilárd szemcsés anyagok áramlása minden esetben párosul valamilyen gáz vagy folyadék fázis áramlásával, így a szilárd részecskéket tartalmazó áramlás mindenképpen egy kétfázisú áramlásnak tekinthető, amelynek leírására minden fázis esetében a megfelelő kölcsönhatási tagokkal kiegészített áramlási egyenletek használhatóak. A gáz vagy folyadék fázis hatása a szilárd részecskékre azonban különböző mértékű lehet az egyes esetekben. Például a silókból történő szilárd anyag elvétel esetében a gázfázis hatása elhanyagolható a részecskék mozgására ezért nem szükséges a szilárd részecskék és a gázfázis közötti kölcsönhatás számítása és így az

áramlási egyenletek alkalmazása a gázfázis tulajdonságainak számítására. Ellentétes példa lehet a szilárd anyagok pneumatikus szállítása, amely esetben a két fázis kölcsönhatása jelentős és ezért az áramlás leírásában mind a szilárd mind a gázfázis tulajdonságainak modellezése szükséges.

A szerzők az irodalomban a szilárd-fluidum áramlások leírására két fő módszert javasolnak a szilárd részecskék kezelését illetően. Az egyik módszerben az úgynevezett Euler módszerben mind a szilárd és fluidum fázisokat folytonos fázisnak tekintik és ezeket a módszereket, mint két-folyadék modellként (two fluid model, TFM) hivatkozzák. Ezekben a modellekben mindkét fázist az áramlási egyenletekkel írják le, amelyek kiegészülnek a két fázis kölcsönhatását leíró tagokkal. A hátránya ezen módszereknek az, hogy mivel a szilárd részecskéket folytonos fázisként kezeli nem kapunk semmilyen információt az egyes részecskék önálló mozgásával kapcsolatban. A másik módszerben a szerzők a fluidum fázist szintén folytonos fázisként kezelik és áramlási egyenletekkel írják le, azonban a szilárd részecskéket önálló rendszerként, elemenként kezelik, amelyeknek önálló tömege és önálló mozgása, sebessége van. A fluidum fázisra felírt áramlási egyenletek ebben az esetben is tartalmazzák a szilárd és fluidum fázis kölcsönhatását leíró tagokat. A részecske-részecske és részecske-fal ütközésekből adódó erők modellezésére és számítására rugalmas és rugalmatlan ütközési modelleket ajánlanak a szerzők. Ezeket a módszereket, mint Euler-Lagrange, Euler-diszkrét elem módszerként (EULER-DEM) vagy CFD-DEM modellként hivatkozzák a vonatkozó irodalomban. Amennyiben a fluidum fázis hatása elhanyagolható a részecskék mozgásának számítása önállóan a diszkrét elem módszerrel történhet a fluidum fázis tulajdonságainak számítása nélkül. A diszkrét elem módszereknek az előnye, hogy eredményként részletes információt nyújtanak a szilárd közeg áramlásáról. A hátrányuk azonban az, hogy mivel minden részecskét önállóan kezel, nagyszámú részecske halmaz esetén nagy számítási erőforrásokat igényel.

A két-folyadék elmélet alkalmazása kapcsán Anderson és Jackson (1967) vezettek be először olyan kölcsönhatási tagokat a Navier-Stokes egyenletben, amellyel a részecske-fluidum és a részecske-részecske kölcsönhatásokat vették figyelembe a modellben. A kilencvenes években jelentős eredményeket értek el a TFM modellek felhasználásával a fluidágyak két-fázisú áramlásainak modellezésében és szimulációjában Bouillard és társai (1989), Ding és Gidaspow (1990), Kuipers és társai (1991, 1992, 1993), Gidaspow (1994) valamint Nieuwland és társai (1996). McKeen és társai (2003) katalizátor szemcsék mozgását szimulálták egy fluidágyas katalitikus krakkoló reaktorban. Wang és társai (2009) egy olyan

TFM modellt fejlesztettek ki, amely homogén és heterogén reakciók leírására alkalmas tagokat tartalmaz. Pougatch és társai (2010) részecske aprózódást szimuláltak fluidágyban. Összességében elmondható, hogy a két-folyadék modellek bár összetettek, azonban nem képesek a diszkrét részecskék dinamikájának és áramlási tulajdonságainak a leírására.

Az utóbbi évtizedekben mutatkozó gyors fejlődés a számítástechnikában és párhuzamos számításban tette lehetővé a diszkrét elem módszerek elterjedését és gyors fejlődését a szilárd szemcsés, illetve a fluidum-szilárd kétfázisú áramlások szimulációjában. A diszkrét elem módszerben az áramló szilárd részecske halmaz minden részecskéjének mozgását külön számítjuk. A részecskék mozgását a Newtoni mozgástörvények alapján számítjuk figyelembe véve a részecskékre ható erőket, amelyek más részecskékkal történő ütközésből vagy a mozgó fluidum fázis nyomó illetve húzó hatásából adódik.

Áttanulmányozva az irodalmat megállapítható, hogy az utóbbi két évtizedben számos publikáció született a diszkrét elem módszer alkalmazásával kapcsolatban. A gáz-szilárd fluidizáció szimulációjában jelentős eredményeket értek el Tsuji és társai (1993) valamint Kawaguchi társai (1998, 2000), akik a szimulációs vizsgálataikban rugalmas ütközési modellt (Cundall és Strack, 1979) használtak és a részecskék keveredését vizsgálták egy fluidágy belsejében. Hoomans és társai (1996, 2000) rugalmatlan ütközési modellt használtak a szimulációs vizsgálataikban, amelyekben a gázsebesség hatását vizsgálták a részecskék áramlására szintén egy fluidágyban. Kaneko és társai, (1999) CFD-DEM szimulációs módszert használtak egy polimer reaktor szimulációjára. A szimulációban a fluidum fázis sebessége mellett számították a hőmérséklet mezőt és ezek felhasználásával minden részecske esetében a polimerizációs reakció kinetikáját és a reakcióhőt. Ulbert és társai (2000) egy olyan CFD-DEM szimulációs tanulmányt mutattak be, amelyben egy reaktív gáz-szilárd kétfázisú áramlást szimuláltak egy Mediator Recirculation Integration Technology (MERIT) cirkulációs fluidágyas égető berendezésben. A szerzők által javasolt modell tartalmazza a reakció komponensek megmaradási egyenleteit. A gáz-szilárd kémia reakció leírására a shrinking-core modellt alkalmazták a szerzők minden részecske esetében. Tsuji és társai (2008) 4.5 részecske szimulációját mutatták be egy fluidágyban párhuzamos számítást felhasználva. Yang és társai (2013) a különböző áramlási típusok közötti átmeneteket vizsgálták egy fluidágyban a részecskék felületi energiájának függvényében. Fan és társai (2016) egy szimulációs vizsgálatot mutattak be, amelyben kohéziós részecskék szimulációját vizsgálták és ennek megfelelően figyelembe a kölcsönhatási erők számításánál figyelembe vették a részecskék felületi kohéziós kölcsönhatását. Hou és társai (2016) egy olyan

fluidágyat szimuláltak a CFD-DEM módszer alkalmazásával, amely hőátadó csöveket tartalmaz. A szerzők a csövek és a fluidágy közötti hőátadást vizsgálták. Hou és társai, (2017) a részecske-fluidum kölcsönhatás, a részecske-részecske ütközés, a gravitációs erő, valamint a sűrűlódás által a részecskék között létrejövő energia átadást vizsgálták szilárd szemcsés és fluidum-szilárd kétfázisú áramlások esetében.

A fenti példákból látható, hogy a diszkrét elem módszer alkalmazásával nemcsak önmaga a fluidum-szilárd áramlások minősége vizsgálható, de lehetőséget nyújt más folyamatok, mint pl. gáz szilárd kémiai reakció, figyelembe vételére és a diszkrét részecske tulajdonságok kezelésére, mint pl. a hőmérséklet, koncentráció stb.

A jelen TDK dolgozat témája a silós szilárd anyag tárolásához szinte minden esetben társuló cellás adagoló berendezés szimulációja. A silókból történő szilárd anyag elvétel esetében a gázfázis hatása elhanyagolható a részecskék mozgására ezért nem szükséges a szilárd részecskék és a gázfázis közötti kölcsönhatás figyelembe vétele. Az irodalomban számos példa látható a silók diszkrét elem módszerrel történő szimulációjára. Masson és Martinez (2000) siló töltését és ürítését szimulálták diszkrét elem módszerrel. A szimulációs vizsgálataikban a részecskék mechanikai paramétereinek hatását vizsgálták a részecskék áramlására. Megmutatták, hogy a részecskék sűrűlódásának és rugalmassági tényezőjének jelentős hatása van az áramlási tulajdonságokra. Yang és Hsiau (2001) siló töltését és ürítését szimulálták. Különböző típusú inzer elemeket használtak és azt vizsgálták, hogy hogyan javítható a silóból történő szilárd anyag kiáramlás minősége. Goda és Ebert (2005) egy olyan szimulációs tanulmányt mutattak be, amelyben a részecskék falra gyakorolt hatását vizsgálták a diszkrét elem módszer felhasználásával. Gonzalez-Montellano és társai (2011) egy laboratóriumi méretű silót vizsgáltak kísérleti és szimulációs úton, amelyben a részecskék sűrűlódási tényezőjét identifikálták a kísérletek által. Zeng és társai (2017) a részecskék sebességének és a részecskék közötti létrejövő erők fluktuációját vizsgálták a siló ürítése során. Megmutatták, hogy a sebesség fluktuáció a sűrűlódási tényező egy kritikus értéke felett jelentkezik.

A silók ürítését biztosító cellás adagolók kísérleti és szimulációs vizsgálatára kevés közlemény található a témához tartozó irodalomban. Egy silóhoz kapcsolódó cellás adagolót vizsgált kísérleti úton Al-Din és Gunn (1983). A szerzők a cellás adagoló által szállított részecske tömegáramot vizsgálták a cellás adagoló fordulatszámának függvényében és megállapították, hogy a fordulatszámnak csak egy bizonyos tartományában lineáris a kapcsolat a fordulatszám és tömegáram között. Kirkwood és társai (1998) cellás adagolóval

ellátott siló ürítése során a szilárd anyag silón belüli keveredését és szegregációját vizsgálták tartózkodási idő analízissel. Megállapították, hogy alacsony adagoló fordulatszámnál a részecskék szegregálódnak a silón belül és holtterek alakulnak ki, amelyben a részecskék jelentősen lassabban mozognak lefelé. Magasabb fordulatszámnál azonban a siló teljes szemcsehalmaza egyenletesen mozog lefelé biztosítva ezáltal azt a követelményt, hogy a silóba táplált szemcserétegek ne keveredjenek.

A cellás adagoló alkalmazása minden ipari területen előfordul, ahol a szilárd anyagokat silóban tárolják. A silók tartalmának szabályozott ürítése fontos a technológiai és irányítástechnikai szempontok miatt és ezért a cellás adagolók működésének minél mélyebb megértése jelentősen hozzájárulhat annak sikeres tervezéséhez mind geometriai mind műveleti értelemben. A TDK dolgozatban a hangsúlyt a cellás adagoló szimulációjára fektetjük, és nem vizsgáljuk a silóban létrejövő áramlás tulajdonságait. A szimulációs vizsgálatokban alkalmazott módszer a diszkrét elem módszer, amellyel részletes bepillantás nyerhető cellás adagolón belüli szilárd fázis áramlásáról. A szimulációs vizsgálatok célja annak megállapítása, hogy a cellás adagoló geometriai és műveleti tervezési paraméterei hogyan befolyásolják a cellás adagolón átáramló szilárd anyag tömegáramát.

A dolgozat következő részeiben ismertetésre kerül a szilárd áramló közeg modellezésében és szimulációjában alkalmazott diszkrét elem módszer, a diszkrét elem módszer alkalmazásához kapcsolódóan a részecske és fal ütközések kezelésében alkalmazott háromszöges geometriai reprezentációs módszer, a számításokban alkalmazott GPU és párhuzamos programozás főbb jellemzői, valamint a cellás adagoló szimulációjának eredményei és annak értékelése.

2. A Diszkrét Elem Módszer

A berendezések kísérleti vizsgálata sokszor nehézségekbe ütközhet, mivel a méréshez használt eszközök megváltoztathatják a berendezés működését, ilyen esetekben szimulációs vizsgálatokkal lehetséges a bennük lejátszódó folyamatok megismerése. Egy a valóságot jól leíró modell használata, akkor is előnyös lehet, ha egymást követő sok, különböző paraméterű vizsgálatot szeretnénk elvégezni, mivel a modellben megváltoztatni egy paramétert egyszerűbb lehet, mint új kísérleti berendezést készíteni.

A DEM (Discrete Element Method – Diszkrét Elem Módszer) egy olyan numerikus számítási módszer, melynek segítségével nagyszámú részecske mozgását, viselkedését lehet modellezni és szimulálni. A DEM használatával a részecskék és a berendezés falai közötti kölcsönhatások Newton második mozgástörvényével írhatók le. Napjainkban a DEM széles körben elfogadott, hatékony módszer szemcsés, illetve nem folytonos anyagok mozgásának leírására a különböző mérnöki feladatok megoldásakor. Alkalmazása egyre jobban elterjed az ipar több területén, mint például vegyiparban, gyógyszeriparban, építőiparban, élelmiszeriparban, vagy akár a bányászatban, kohászatban, mezőgazdaságban stb. A számítástechnika fejlődésével lehetőség nyílik akár több millió részecskéből álló szemcsehalmoz mozgásának számolására. Ugyanakkor a DEM nagy számítási igénye miatt a módszernek korlátot szab a részecskeszám és a szimulált jelenség ideje, ezért a szimuláció futási idejének csökkentése érdekében célszerű valamelyiket alacsonyan tartani. A DEM előnye, hogy segítségével szemcsés áramlások széles köre vizsgálható, segítségével jól modellezhetők a kísérletileg megfigyelt jelenségek nem csak a szemcsés áramlásokban, de a mérnöki alkalmazások olyan más területein is mint, adhéziós finom porok, talaj mechanika. DEM segítségével a szemcsés halmazok mikroszkopikus viselkedése sokkal részletesebben vizsgálható, mint az kísérletileg sokszor lehetséges lenne. Például a szemcsék egymásra hatása folytán a közöttük kialakuló 3D erőhatások hálózata nagyszámú szemcsés halmazban. Hátránya, a már előzőekben említett, nagy számítási igény, melyből adódóan vagy nagy részecskeszámú halmaz rövid időbeli viselkedése, vagy kevesebb részecskéből álló rendszer hosszabb időbeli viselkedése szimulálható csak a szimuláció futási idejének alacsonyan tartása miatt. Ugyanakkor ez a hátrány a számítástechnikai eszközök fejlődésével egyre jobban csökken. Különösen az egyre gyorsabb és több memóriával rendelkező GPU-k megjelenésével, melyek párhuzamos számítási lehetőségeit kihasználva a szimulációk futási ideje csökkenthető, a részecskeszám és a szimulált idő növelhető.

2.1. A Newtoni mozgásegyenletek

A DEM szimuláció során a részecskék egy kezdeti állapotból kiindulva, azok kölcsönhatásait figyelembe véve a részecskék mozgását határozzuk meg, amelyhez a részecske 3 fő tulajdonsága kerül kiszámításra minden egyes iterációs lépésben, a pozíció, a sebesség és a részecske forgó mozgását jellemző szögsebesség (Tsuji és társai, 1993). Ezeken kívül a szimulált jelenségtől, és a modell összetettségétől függően más részecske tulajdonságok számítása is lehetséges, mint például a hőmérséklet, a komponens koncentráció, a felületi bevonás mértéke, elektromos töltöttség stb.

A részecskék mozgásának meghatározásához a DEM a részecskéket külön elemként kezeli és figyelembe veszi a köztük létrejövő kölcsönhatásokat. A részecskék közötti kölcsönhatás az ütközés formájában valósulhat meg. Az ütközés történhet egy másik részecskével, a berendezés mozgó vagy álló falával. Az ütközés hatására a vizsgált két részecske vagy a részecske és a fal között ellentétes irányú erő keletkezik. A részecskék mozgására ezenkívül hatással van az ütközésektől függetlenül ható erőter, például a gravitáció, (különböző jelenségek szimulációjánál elektromos erőterek stb. is figyelembe vehető). A részecskék mozgása kétféleképpen jellemezhető, egyenes vonalú haladó és forgó mozgással. Az egyenes vonalú haladó mozgást befolyásolja az ütközési erő, az erőter pl. gravitáció, valamint, ha nem elhanyagolható, akkor kétfázisú rendszer esetén a közegellenállási erő. A forgó mozgásra csak az ütközési erők hatnak. A részecskék egyenes vonalú haladó valamint forgó mozgását leíró Newtoni mozgástörvények:

$$m_i \mathbf{a}_i = \sum_{j=1}^{j=q_i} (\mathbf{f}_{cn,ij} + \mathbf{f}_{ct,ij}) + m_i \mathbf{g} \quad (1)$$

$$I \dot{\boldsymbol{\omega}}_i = \sum_{j=1}^{j=q_i} \mathbf{T}_{ij} = \sum_{j=1}^{j=q_i} (\mathbf{r}_i \times \mathbf{f}_{ct,ij}) \quad (2)$$

Ahol

- m_i az i részecske tömege
- $\mathbf{a}_i$ az i részecskére ható gyorsulás vektor
- q_i az i részecskével ütközésben levő részecskék száma
- $\mathbf{f}_{cn,ij}$ az i és j részecske között létrejövő ütközési erő vektor normál irányú komponense

- $\mathbf{f}_{ct,ij}$ az i és j részecske között létrejövő ütközési erő vektor tangenciális irányú komponense
- $\mathbf{g}$ az i részecskére ható gravitációs gyorsulás vektor
- $\mathbf{I}$ az i részecske tehetetlenségi nyomatéka
- $\dot{\boldsymbol{\omega}}_i$ az i részecskére ható szöggyorsulás vektor
- $\mathbf{T}_{ij}$ az i és j részecske között az ütközési pontban fellépő forgatónyomaték vektor
- $\mathbf{r}_i$ az ütközési pont és az i részecske középpontjának távolságát megadó vektor

A szimuláció iterációs lépései során ezeknek a hatásoknak a kiszámítása történik minden részecskére külön-külön. Miután a gyorsulás vektor és szöggyorsulás vektor meghatározása megtörtént kiszámítható az i részecske szögsebesség vektora ($\boldsymbol{\omega}_i$), sebesség vektora ($\mathbf{v}_{p,i}$) és pozíció vektora ($\mathbf{p}_i$) a következő differenciálegyenletek numerikus megoldásával:

$$\frac{d\mathbf{v}_{p,i}}{dt} = \frac{\mathbf{v}_{p,i,t+\Delta t} - \mathbf{v}_{p,i,t}}{\Delta t} = \mathbf{a}_i \quad (3)$$

$$\frac{d\boldsymbol{\omega}_i}{dt} = \frac{\boldsymbol{\omega}_{i,t+\Delta t} - \boldsymbol{\omega}_{i,t}}{\Delta t} = \dot{\boldsymbol{\omega}}_i \quad (4)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = \frac{\mathbf{p}_{i,t+\Delta t} - \mathbf{p}_{i,t}}{\Delta t} = \mathbf{v}_{p,i} \quad (5)$$

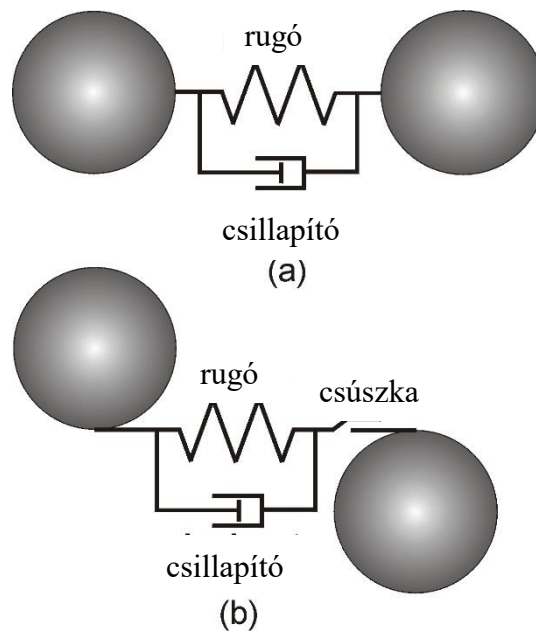
2.2. Részecske-részecske ütközések kezelése rugalmas ütközési modellel

Elsősorban a részecskék fizikai tulajdonságaitól, mint például a részecske rugalmasságától és felületi súrlódási tényezőjétől, függ a részecske-részecske és részecske-fal ütközések mechanikája. Az objektumok közötti ütközés lehet rugalmas és rugalmatlan. Mindkét ütközés típus modellezésére számos ütközési található a vonatkozó irodalomban. A dolgozatban bemutatott szimulációs vizsgálatokban egy rugalmas ütközési modellt használunk és az ütköző részecskéket rugalmas gömbnek tekintjük (Cundall és Strack, 1979). Továbbá feltételezzük, hogy a részecskék felülete közötti adhéziós erő elhanyagolható, valamint a részecskék felülete között fellépő súrlódást a Coulomb-féle súrlódási törvény írja le.

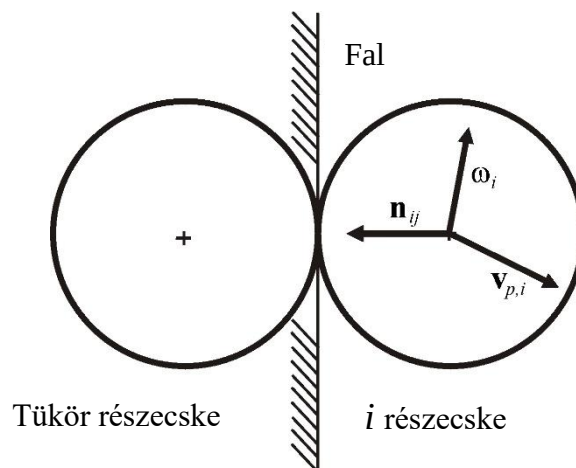
A részecskék mozgását befolyásoló ütközési erők az ütközések során normál és tangenciális irányban hatnak a részecskékre. Az ütközési erők számítása ennek megfelelően 2 részre osztható: normál és tangenciális erők számítására. A normál irányú erők a részecske egyenes vonalú mozgására vannak hatással, míg a tangenciális ütközési erő a forgó mozgást befolyásolja.

Az alkalmazott rugalmas ütközési modell az ütközési erők számításához a rugó, lengéscsillapító és csúszka mechanikai elemeket használja fel. Ezek mechanikai paramétereiken keresztül befolyásolják az ütközést. Ezek a paraméterek a rugóállandó (k), csillapítási tényező (η) és a súrlódási tényező (μ). A rugó elem a rugalmas ütközés leírására szolgál. A lengéscsillapító az ütközés során fellépő energiaveszteséget modellezi, míg a csúszka elem a részecskék felületi súrlódását írja le. A normál irányú ütközési erők számítására a rugó és csillapító elemek szolgálnak, míg tangenciális irányú erők számításához mindhárom elem használata szükséges. Az 1. ábrán a modellben felhasznált elemek láthatók a normál és tangenciális irányú ütközési erők modellezésére.

A részecske-fal ütközéseket részecske-részecske ütközésre vezetjük vissza, amely a 2. ábrán látható: A fal benti részére a részecskével szemben egy tükör részecske kerül elhelyezésre, a fal felületétől részecske sugárnyi távolságra, vagyis úgy, hogy a részecske, mint gömb és a fal, mint sík, egy pontban érintsék egymást. Valamint a két részecskét összekötő $\mathbf{n}_{ij}$ normálvektor a felület normáljával párhuzamos. A falrészecske sebességvektor és szögsebesség vektora álló fal esetén egyaránt egy null vektor, mozgó fal esetén csak a szögsebesség null vektor a sebesség vektora a fal adott pontjának mozgási sebességével egyezik meg. Ezután az i részecskére ható erők a részecske-részecske ütközésre visszavezethetők, ahhoz hasonló módon számíthatók.



1. ábra. Ütközési modell, normál irány (a), tangenciális irány (b)



2. ábra. Részecske-fal ütközés

2.2.1. Részecske-részecske ütközések kezelése

2.2.1.1. Normál irányú erők számítása

A valóságban két részecske rugalmas ütközésekor a részecskék közelednek egymáshoz, összenyomódnak és deformálódnak, a relatív sebességük lecsökken, majd a későbbiekben visszanyerik eredeti alakjukat és közben ellentétes irányba kezdenek el mozogni. A szimulációban alkalmazott ütközési modell alapján a két részecske alakját ütközés során

változatlannak tekintjük, így az ütközési pontban az ütközés során a részecskék között átfedés alakul ki, azaz a részecskék középpontja közötti távolság kisebbé válik, mint a sugaraik összege.

$$\mathbf{r}_i = \frac{R_i}{R_i + R_j} (\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_i) \quad (6)$$

Ahol

- $\mathbf{r}_i$ - a két részecske középpontja közötti távolság i részecskére vonatkoztatott értéke
- R_i és R_j - az i és j részecske sugara
- $\mathbf{p}_i$ és $\mathbf{p}_j$ - az i és j részecske pozíciója

Ha mindegyik részecskék sugara egyenlő, akkor a következő formára egyszerűsödik.

Az ütközési pontban kialakuló $\delta_{n,ij}$ átfedés számítása a következőképpen lehetséges.

$$\delta_{n,ij} = (d_i + d_j) / 2 - |\mathbf{p}_i - \mathbf{p}_j| \quad (7)$$

Ahol

- d_i és d_j - az i és j részecske átmérője
- $\mathbf{p}_i$ és $\mathbf{p}_j$ - az i és j részecske pozíciója

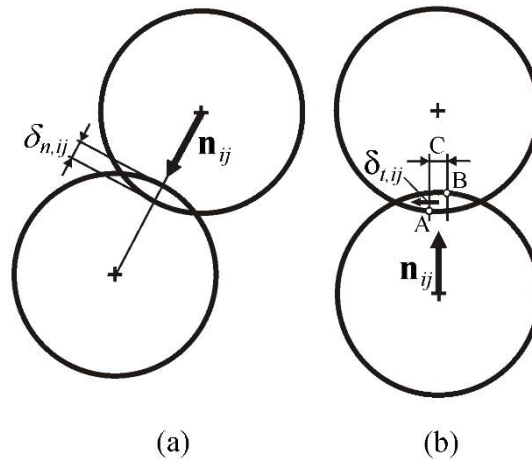
Az i részecskére ható rugóelem által keletkező erő számítása.

$$\mathbf{f}_{cn,r,ij} = -k_n \delta_{n,ij} \mathbf{n}_{ij} \quad (8)$$

Ahol

- k_n - a rugóállandó normál irányban
- $\delta_{n,ij}$ - a normál irányú átfedés az i és j részecske között
- $\mathbf{n}_{ij}$ - a normál vektor az i és j részecske között, az i részecske középpontjából mutat a j részecske középpontja felé

A két részecske között kialakuló átfedést a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra. Átfedések bemutatása. Normál irány (a), Tangenciális irány (b)

Az ütközés folyamán a részecskék veszítenek kinetikus energiájukból. A kinetikus energiájuk egy része az ütközés során a deformálódás miatt elveszik. A veszteség nagysága függ a részecskék sebességétől és fizikai tulajdonságaitól. A veszteség az ütközés utáni kisebb részecske sebességben nyilvánul meg.

Az energiaveszteség nagyságát a restitúciós koefficiens (e) adja meg, ami a szilárd anyagok jellemző fizikai tulajdonsága. Ha nincs energiaveszteség értéke 1, ha van veszteség, akkor értéke 1-nél kisebb. Az ütközési modellben a részecskeütközés közben fellépő energiaveszteséget a csillapítási elem modellezi, melynek paramétere a η csillapítási tényező. A csillapítási erő számítása a következőképpen történik.

$$\mathbf{f}_{cn,cs,ij} = -\eta_n (\mathbf{v}_{r,ij} \cdot \mathbf{n}_{ij}) \mathbf{n}_{ij} \quad (9)$$

Az egyenletben szereplő szorzás jel ($\cdot$) skaláris szorzást jelent.

Ahol

- η_n - a normál irányú csillapítási tényező
- $\mathbf{v}_{r,ij}$ - a két részecske közötti relatív sebesség
- $\mathbf{n}_{ij}$ - a normál vektor az i és j részecske között, az i részecske középpontjából mutat a j részecske középpontja felé

Csillapítási tényező és a restitúciós koefficiens közötti kapcsolatot a következő egyenlet írja le.

$$\eta = -2\sqrt{mk} \frac{\ln e}{\sqrt{\pi + (\ln e)^2}} \quad (10)$$

Ahol

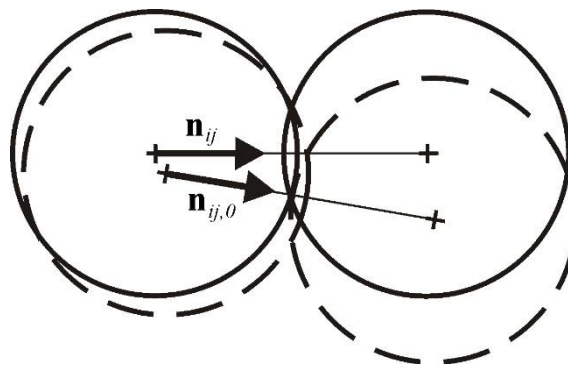
- η - a csillapítási tényező
- m - a részecske tömege
- k a rúgó állandó

Az i részecskére normál irányban kialakuló erőhatás mértéke a csillapítási és rugóerő összegzéséből adódik.

$$\mathbf{f}_{cn,ij} = (-k_n \delta_{n,ij} - \eta_n \mathbf{v}_{r,ij} \cdot \mathbf{n}_{ij}) \mathbf{n}_{ij} \quad (11)$$

2.2.1.2. Tangenciális irányú erők számítása

A normál irányhoz hasonlóan tangenciális irányú ütközési erő számításának is az alapja az ütközési pontok között kialakuló átfedés ($\delta_{t,ij}$), amelyet a normál iránnyal szemben egy vektorral adunk meg. A 3. ábrán látható módon az A és B ütközési pontok az ütközés elején a tér ugyanazon pontjai, azonban a továbbiakban a részecskék ütköző és forgómozgásának következtében a felületek elcsúsznak, elmozdulnak, így a kezdeti pontok helyzete folyamatosan változhat, egymástól eltávolodik. A két pont között kialakul egy C távolság, mely a tangenciális átfedés vektor hosszával lesz egyenértékű. Az ütközés közben a $\delta_{t,ij}$ átfedés vektor értéke és iránya is folyamatosan változik az ütköző részecskék relatív csúszási sebességének megfelelően, amely az ütközési pontok relatív sebességet jelenti. Ütközés közben $\mathbf{n}_{ij}$ értéke is folyamatosan változhat, ami az egyik részecske középpontjától a másik középpontja felé mutató normál vektor. Ezt a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra. Részecskék mozgása ütközés során

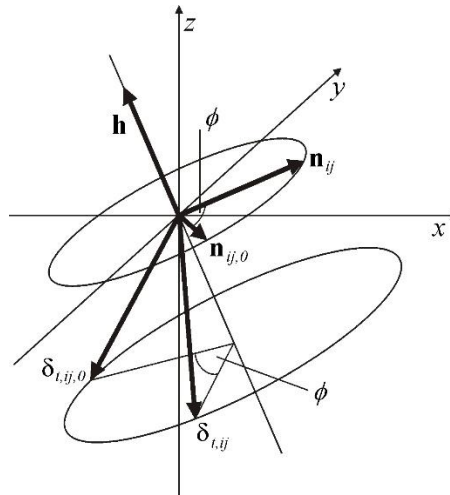
Ezen változás miatt az átfedés vektor értékét minden számítása lépésben korrigálni kell, amely két lépésben történik. Elsőként az átfedés vektor értékét korrigáljuk $\mathbf{n}_{ij}$ új értékének megfelelően, majd a módosított átfedés vektor értékét korrigáljuk a pillanatnyi relatív csúszási sebességnek megfelelően. A $\delta_{t,ij}$ átfedés vektor számítása.

$$\delta_{t,ij}(t + \Delta t) = E(\mathbf{h}, \phi) \delta_{t,ij,0}(t) + \mathbf{v}_{rs,ij} \Delta t \quad (12)$$

Ahol

- Δt - a numerikus időlépés
- $\delta_{t,ij,0}(t)$ - az átfedés vektor értéke t időpillanatban
- $\mathbf{v}_{rs,ij}$ - a részecskék ütközése közben fellépő relatív csúszási sebesség
- $E(\mathbf{h}, \phi)$ - transzformációs mátrix

Az 5. ábrán láthatók az $E(\mathbf{h}, \phi)$ mátrix megadásához szükséges paraméterek.



5. ábra. Tangenciális átfedés térbeli vektor transzformációja.

Az $E(\mathbf{h}, \phi)$ transzformációs mátrix számításához először meg kell határozni $\mathbf{h}$ normálvektor értékét és ϕ szög értékét. A $\mathbf{h}$ vektor számítása az $\mathbf{n}_{ij}$ normálvektor új és régi értékének felhasználásával történik.

$$\mathbf{h} = \frac{\mathbf{n}_{ij} \times \mathbf{n}_{ij,0}}{|\mathbf{n}_{ij} \times \mathbf{n}_{ij,0}|} \quad (13)$$

Az egyenletben a $(\times)$ jel a vektoriális szorzást jelöli.

A ϕ szög számítása az alábbi egyenlet alapján történik.

$$\phi = \text{asin}(|\mathbf{n}_{ij} \times \mathbf{n}_{ij,0}|) \quad (14)$$

A rendelkezésre álló értékekből már meghatározható $E(\mathbf{h}, \phi)$ mátrix, ami 3x3-as négyzetes mátrix. A számításához szükséges képlet, melyben $\mathbf{h}$ vektor a $\mathbf{h} = (h_x, h_y, h_z)$ formában szerepel.

$$E(\mathbf{h}, \phi) = \begin{bmatrix} \cos \phi + h_x^2(1 - \cos \phi) & h_x h_y(1 - \cos \phi) - h_z \sin \phi & h_z h_x(1 - \cos \phi) + h_y \sin \phi \\ h_x h_y(1 - \cos \phi) + h_z \sin \phi & \cos \phi + h_y^2(1 - \cos \phi) & h_y h_z(1 - \cos \phi) - h_x \sin \phi \\ h_z h_x(1 - \cos \phi) - h_y \sin \phi & h_y h_z(1 - \cos \phi) + h_x \sin \phi & \cos \phi + h_z^2(1 - \cos \phi) \end{bmatrix} \quad (15)$$

A csúszási sebesség az ütközési pontok relatív kerületi sebességétől és a részecskék relatív sebességének tangenciális komponensétől függ.

Ehhez először ki kell számolni a részecskék relatív sebességét.

$$\mathbf{v}_{r,ij} = \mathbf{v}_{p,i} - \mathbf{v}_{p,j} \quad (16)$$

Ezután kiszámolható a részecskék relatív sebességének tangenciális komponense.

$$\mathbf{v}_{rt,ij} = \mathbf{v}_{r,ij} - (\mathbf{v}_{r,ij} \cdot \mathbf{n}_{ij}) \cdot \mathbf{n}_{ij} \quad (17)$$

Az ütközési pontnál létrejövő kerületi sebesség ($\mathbf{v}_{c,i}$) a szögsebességből ($\boldsymbol{\omega}_i$) és a két részecske középpontja közötti távolság i részecskére vonatkoztatott értékéből számítható.

$$\mathbf{v}_{c,i} = (|\mathbf{r}_i| \boldsymbol{\omega}_i) \times \mathbf{n}_{ij} \quad (18)$$

Ezután megadható a relatív csúszási sebesség az előzőekben kiszámolt értékek összegeként.

$$\mathbf{v}_{rs,ij} = (\mathbf{v}_{c,i} + \mathbf{v}_{c,j}) + \mathbf{v}_{rt,ij} \quad (19)$$

A tangenciális átfedés vektor felhasználásával számítható ki a tangenciális rugóerő.

$$\mathbf{f}_{ct,r,ij} = -k_t \boldsymbol{\delta}_{t,ij} \quad (20)$$

Ahol

- k_t - a rugóállandó tangenciális irányban

Normál irányhoz hasonlóan a csillapítási erőt is ki kell számítani, ebben az esetben a relatív csúszási sebesség felhasználásával.

$$\mathbf{f}_{ct,cs,ij} = -\eta_t \mathbf{v}_{rs,ij} \quad (21)$$

Ahol

- η_t - a tangenciális irányú csillapítási tényező

A tangenciális irányú ütközési erő a tangenciális rugóerő és a tangenciális csillapítási erő eredője, vagyis a következőképpen számítható.

$$\mathbf{f}_{ct,ij} = -k_t \boldsymbol{\delta}_{t,ij} - \eta_t \mathbf{v}_{rs,ij} \quad (22)$$

2.2.1.3. A súrlódási erő számítása

Két részecske ütközésekor a felületek egymáson való mozgása tangenciális irányú súrlódási erőt hoz létre, ami a forgó mozgás irányával ellentétes irányú, azt lassítani próbálja. A súrlódás erő a Coulomb féle súrlódási törvény használatával számítható. Minden számítási ciklusban összehasonlításra kerül a kiszámolt tangenciális erő nagysága a $\mu |\mathbf{f}_{cn,ji}|$ kifejezés értékével. Amennyiben a tangenciális erő a nagyobb a tapadási súrlódási erőnél, akkor a két felület között csúszás jön létre és a tapadási súrlódási erő helyett csúszási súrlódási erő jelentkezik, ezért a tangenciális erőt újra kell számolni.

$$\mathbf{f}_{ct,ij} = -\mu |\mathbf{f}_{cn,ij}| \mathbf{t}_{ij} \quad (23)$$

Ahol

– μ - i és j részecske közötti súrlódási tényező

$\mathbf{t}_{ij}$ normálvektor számításához használt képlet.

$$\mathbf{t}_{ij} = \boldsymbol{\delta}_{t,ij} / |\boldsymbol{\delta}_{t,ij}| \quad (24)$$

Ezután a $\boldsymbol{\delta}_{t,ij}$ tangenciális átfedés értékét is újra kell számolni.

$$\boldsymbol{\delta}_{t,ij} = \frac{\mu |\mathbf{f}_{cn,ij}| \mathbf{t}_{ij}}{k_t} \quad (25)$$

2.2.2. Részecske-fal ütközések kezelése

2.2.2.1. Mozgó fal kezelése

A relatív csúszási sebesség kiszámításához csak a részecske ütközési pontnál létrejövő kerületi sebessége és a részecskék relatív sebességének tangenciális komponense szükséges. Mivel a tükrőrészecske szögsebessége 0, ezért az abból számolható tükrőrészecske kerületi sebessége is minden esetben 0.

$$\mathbf{v}_{rs,ij} = \mathbf{v}_{c,i} + \mathbf{v}_{rt,ij} \quad (26)$$

A falütközés kezelésének módjából adódóan (a sík fal normál vektora egy sík falszakaszon belül állandó). A részecske-részecske ütközéssel ellentétben az ütközés közben $\mathbf{n}_{ij}$ értéke

nem változhat, ezért nincs szükség $E(\mathbf{h}, \phi)$ transzformációs mátrix számítására. A $\delta_{t,ij}$ átfedés vektor számítása a következőre változik.

$$\delta_{t,ij}(t + \Delta t) = \delta_{t,ij,0}(t) + \mathbf{v}_{rs,ij}\Delta t \quad (27)$$

Ahol

- Δt - a numerikus időlépés
- $\delta_{t,ij,0}(t)$ - az átfedés vektor értéke t időpillanatban
- $\mathbf{v}_{rs,ij}$ - a részecskék ütközése közben fellépő relatív csúszási sebesség

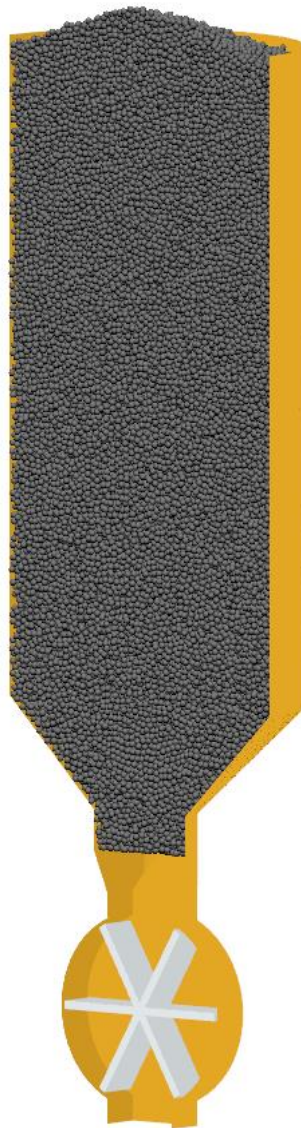
2.2.2.2. Álló fal kezelése

Álló fal esetén is érvényesek a mozgó falnál leírt egyszerűsítések. Valamint azokon kívül még egy további egyszerűsítés írható fel. Mivel a tükörrészecske sebessége 0, ezért a részecskék közti relatív sebesség megegyezik a részecske sebességével.

$$\mathbf{v}_{r,ij} = \mathbf{v}_{p,i} \quad (28)$$

3. A szimulált siló - cellás adagoló berendezés bemutatása

A cellás adagoló vizsgálatát kétféle siló alkalmazásával terveztem. Az első siló konstrukció esetén a siló kúpjának a vízszintessel bezárt szöge 10° lett volna, a második során pedig 45° fok lett volna ugyanez a szög. Az előzetes szimulációk során kiderült, hogy a cellás adagoló viselkedése a siló kúpos részének vízszintessel bezárt szögétől alig kimutatható módon függ, ezért végül ezt a két verziót elvetettem. A végleges szimulációk során egyféle siló geometriát alkalmaztam. A silót úgy töltöttem fel, hogy a tetején még kicsit halmozva legyenek a szemcsék. Az összes szimulációt ebből a kiindulási állapotból indítottam. A cellásadagoló felszerelt siló részecskékkal megtöltött kezdeti állapotát mutatja a 6. ábra, metszeti nézetben, a cellás adagolót és a silót egy függőleges síkkal elfelezve.



6. ábra A siló és egy adott paraméterezésű cellás adagoló kezdeti állapota, metszet.

A cellás adagoló esetében a geometriai paraméterek közül az átmérőjét változtattam, a műveleti paraméterek közül pedig a fordulatszámot. A cellás adagoló mindkét változójának módosítása esetén változik a cellásadagolón keresztüli tömegáram, így a későbbi vizsgálatokhoz ezeket tartottam meg (1. táblázat).

1. tábla. Geometriai és műveleti paraméterek.

Siló magassága [m] (a kifolyónyílás aljától, a siló tetejéig)	0,49 m
A siló átmérője [m]	0,2 m
A siló kúpos részének a vízszintessel bezárt szöge.	45°
A cellás adagoló átmérője [m]	0,06 – 0,12 m
Cellás adagoló magassága [m] (a kifolyónyílás aljától, a befolyónyílás tetejéig)	0,14 m
Cellás adagoló fordulatszáma [1/s]	0,5 – 5,0 1/s

A szimulációs vizsgálatokban alkalmazott részecske tulajdonságokat illetve a szimulációs vizsgálatok paramétereit a 2. és 3. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat. A szimulációs vizsgálatokban alkalmazott részecske tulajdonságok (érvényesek a tükörrészecskékre is)

Sugár	0,002 m
Sűrűség	1190 kg/m ³
Gördülési ellenállás	1e-4
Súrlódási tényező	0,43
Csillapítási tényező normál	0,09893
Csillapítási tényező tangenciális	0,09893
Rugóállandó normál	800
Rugóállandó tangenciális	800

3. táblázat. A szimulációs futtatások paraméterei

Szimulációs időlépték	5e-5 s
Mentési időlépték	2e-2 s
Szimuált idő hossza	4 s
Részecskék száma	245000
Álló falak száma	500-600
Mozgó falak száma	24

A szimulációs futtatásokban használt számítógép és GPU adatait a 4. táblázat tartalmazza.

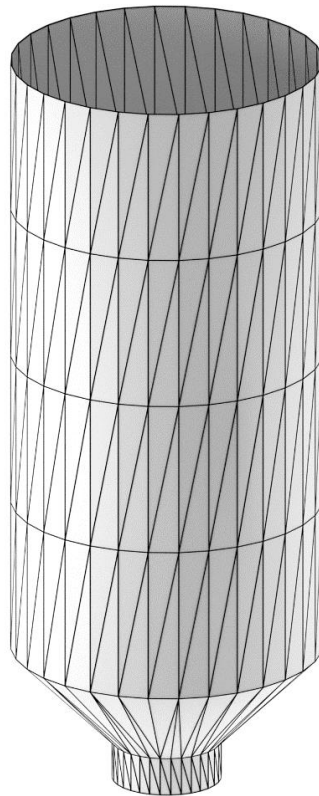
A számítógép adataiból látható, hogy a program képességeinek megfelelő kihasználásához főleg GPU teljesítményre van szükség.

4. táblázat. A szimulációt futtató számítógép adatai

CPU típusa	Intel Core i5-3570 CPU @3.40GHz
Memória mérete	16 GB
Alaplap típusa	Gigabyte Z77-D3H
GPU típusa	Nvidia GeForce GTX 1080 Ti
CUDA magok száma	3584
GPU memória	11 GB
GPU GFLOPS (Single precision)	10609

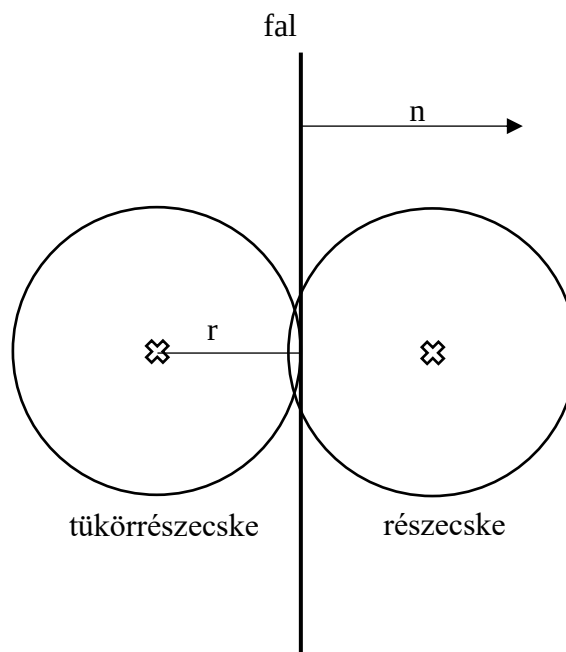
4. A szimulált berendezés geometria reprezentációja

Az általam készített szimulációs programban a falakat háromszögekkel lehet közelíteni. Ennek két nagy előnye van az általánosan elterjedt egyenletekkel megadott falkezeléssel szemben. Egyrészt bármilyen görbületű fal könnyen megadható a számítógépes grafikában kidolgozott módszerekkel. A berendezések egy ilyen programmal elkészíthetők, majd az így létrehozott berendezések fájlban elmenthetők, ezután a szimulációs programomba importálhatók. A berendezések geometriáját, anélkül lehet a programban változtatni, hogy a programkódot módosítani, a programot újra fordítani kéne. A másik előnye, hogy a GPU akkor tud hatékonyan működni, ha egyszerre sok hasonló adattal kell, hogy dolgozzon. Így az a kedvező, ha sok ugyanolyan felépítésű háromszög adatát kell, hogy feldolgozza, szemben azzal, mintha kevesebb, de eltérő struktúrájú egyenletekkel kellene számolnia. További előnye a háromszöges közelítésnek, hogy a közelítés pontossága a szükséges helyeken növelhető nagyobb adatsűrűséggel, vagyis több háromszög alkalmazásával. Ahol pedig kisebb az eltérés, ott kevesebb háromszög használata szükséges, vagyis kevesebb adatot is kell feldolgozni. A berendezés geometriájának háromszögekkel történő közelítését a 7. ábra mutatja be egy példán keresztül.



7. ábra példa egy siló geometriájának háromszögekkel történő közelítésére

A falak kezelésénél, a háromszögekkel történő közelítésen kívül fontos még a korábban már említett tükörrészecske pozíciójának meghatározása. A pozíció meghatározásához, elsőként ellenőrzöm, hogy az adott részecske ütközhet-e az adott háromszöggel. Ha ütközhet, akkor meghatározom a háromszögnek azt a pontját, ami a részecskéhez a legközelebb van, ehhez Mark W. Jones (1995) által kidolgozott módszert használom. Ezután az adott ponttól részecskesugár távolságra a háromszög normálvektorával párhuzamosan elhelyezem a tükörrészecskét. Ezt az elhelyezést a 8. ábra mutatja részecske-fal ütközés közben, a részecskék közötti átfedés mértékét felnagyítva.



8. ábra tükörrészecske pozíciója

5. GPU és párhuzamos számítás alkalmazása

A szimuláció pontos körülményeitől (részecskeszám, falszám, mozgó, álló falak, részecskék, falak térbeli elhelyezkedése stb.) függően többféle megoldást is kidolgoztam. A legáltalánosabb során minden részecskéhez egy GPU magot rendelek, vagyis az összes részecske adata egy iteráción belül egyidőben kerül kiszámításra. Egy mag a hozzá rendelt részecskéhez tartozó memóriaterületen lévő adatokat tudja csak írni, de az összes többi adatot tudja olvasni, erre a párhuzamosításból történő problémák elkerülése miatt volt szükség. Ebből a megoldásból következik, hogy minden részecskék közötti interakció két helyen van eltárolva, vagyis például az ütközési adatok mind a két résztvevő részecske adatai között megtalálhatók. Ez a megoldás a párhuzamos írási problémák egyszerű elkerülése miatt volt szükséges. Az olvasás módja miatt, viszont ott is felléphetnének gondok, abban a lépésben, amikor az előző iterációbeli és a jelenlegi iterációban meghatározott adatokból új adatok meghatározása történik. Ennek megoldására két adategységet alkalmazok, amiből az egyik mindig az előző a másik pedig az éppen számolt iteráció adatait tartalmazza. Az itt leírtakon kívül használtam más, hatékonyabb, de összetettebb megoldásokat is a párhuzamosításból fakadó problémák megoldására. Nagyobb részecskeszám esetén előfordulhat, hogy több részecske van, mint ahány maggal a GPU rendelkezik. Ebben az esetben a magokhoz rendelt első adag részecske új adatainak kiszámítása után a GPU magokhoz új részecskék rendelődnek és azok adatai is kiszámításra kerülnek, ez addig ismétlődik, amíg minden részecske adata kiszámításra nem kerülnek. Ezután történik csak meg az iteráció növelés és a folyamat kezdődik előlről.

A GPU-val történő párhuzamos programvégrehajtás során fontos továbbá, hogy lehetőség szerint minden adat a GPU memóriájában legyen tárolva és a CPU csak az utasításokat adja a GPU-nak a szükséges számításokról. Ezért a szimuláció elején az összes részecske, fal és egyéb szükséges adatot átmásolok a GPU memóriájába, majd a CPU-val adom az utasításokat a számításokról. Mivel a GPU memóriája és a számítógép hagyományos memóriája közötti adatmásolás lassú, csökkentené a program sebességét, ezért fontos, hogy csak a legszükségesebb esetekben a lehető legnagyobb sávszélesség kihasználtsággal történjen a két memória közötti adatmásolás. Ezt a problémát úgy oldottam meg, hogy két egymásba ágyazott ciklust használok. A belső ciklus során csak a GPU-n belül történik számítás, az adott iterációs szám végrehajtása. A belső ciklus végeztével történik meg az adatok másolása a hagyományos memóriára, majd onnan mentésük fájlba, ezt a folyamatot a külső ciklus

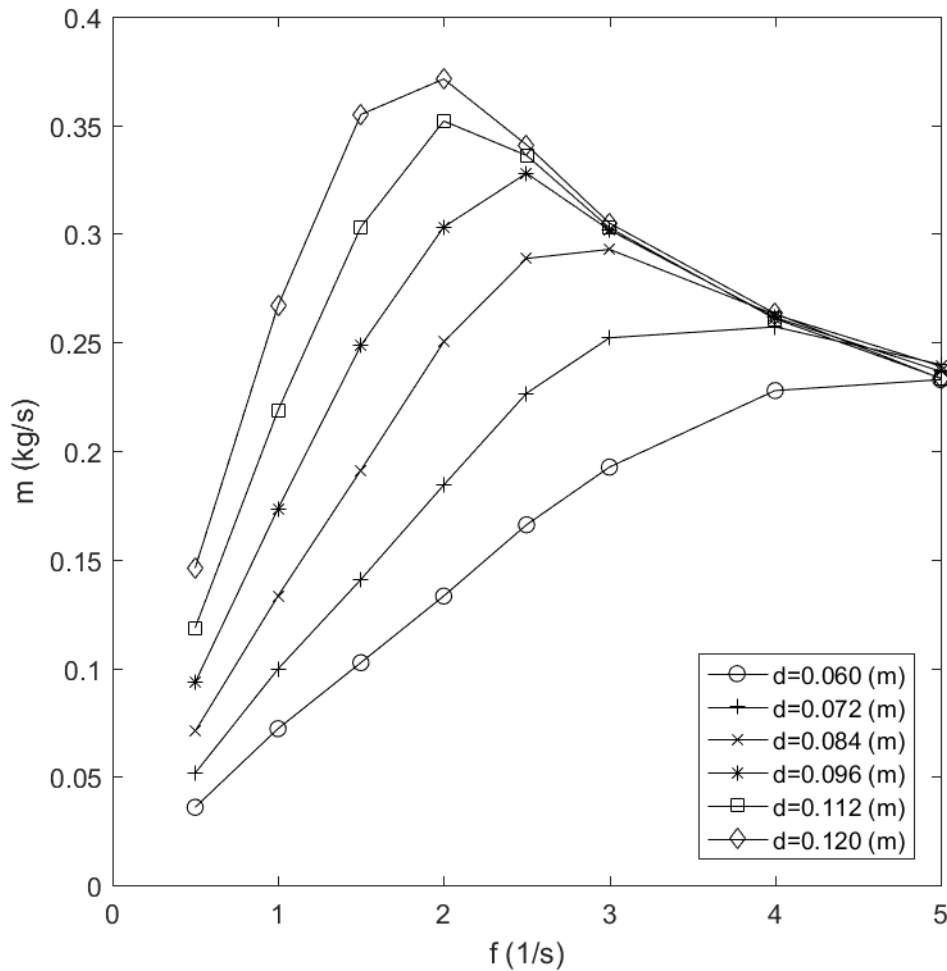
tartalmazza.

Továbbá fontos megjegyezni, hogy a GPU-n futtatott kód végrehajtása akkor hatékony, ha minden GPU mag ugyan azt a számítást végzi. Nagy figyelemmel kell lenni az elágazó utasítások alkalmazására, mivel azok jelentősen ronthatják a teljesítményt. Ha lehetséges valamilyen más megoldást kell helyettük használni, a sorrendjükön, egymásba ágyazásukon változtatni.

6. Szimulációs eredmények és értékelésük

6.1. A cellás adagoló fordulatszámának és átmérőjének vizsgálata a részecske tömegáramra

A cellás adagolóval elérhető tömegáram idő szerint ábrázolva egy pulzáló, periodikus változást mutat, ez a cellás kialakítás és a forgás következménye. A cellás adagoló indulásakor, leállásakor bizonyos geometriai, műveleti paraméterek mellett a tömegáram időbeli változása tovább bonyolódhat, azaz változhat az amplitúdó, a frekvencia és a felfutás ideje. A leírt pulzáló, szinuszos tömegáram miatt, nem beszélhetünk annak stationer értékéről. Ha egy hosszabb ideig működtetett cellás adagoló tömegáram értékeinek átlagával számolunk, akkor azzal jól összehasonlíthatók a különböző geometriai, műveleti paraméterű cellás adagolók, ezért én is ezt a megoldást választottam. A szimulációt annyi ideig futtattam, hogy a forgócellás adagoló legalább két teljes fordulatot tegyen meg. Vagyis legalább 12 periódus legyen, ebből az első 1–2 periódusban általában még nem volt vagy kisebb értékű volt a tömegáram, mivel a cellák az elején még nem tudtak feltöltődni. Tehát miután a tömegáram egyenletes periodikus változást mutatott a tömegáram értékeket átlagoltam. A tömegáram időbeli változását úgy számoltam ki, hogy meghatároztam a cellás adagoló alatt lévő részecskék számának különbségét a jelenlegi és az előző pillanatbeli mentésben. Az így kapott értéket megszoroztam a részecskék térfogatával és sűrűségével, így megkaptam, hogy a két mentés között időintervallumban mekkora tömegű anyag hagyta el a cellás adagolót. Az így kapott adatot osztottam az iterációs idő és a két mentés közötti iterációk számának szorzatával, ezután a kapott értékeket átlagoltam a fentebb leírtak szerint, így megkaptam az átlagos tömegáram nagyságát különböző geometriai és műveleti paraméterek mellett. Az így kapott adatokat ábrázoltam, ezek láthatók a 9. ábrán.



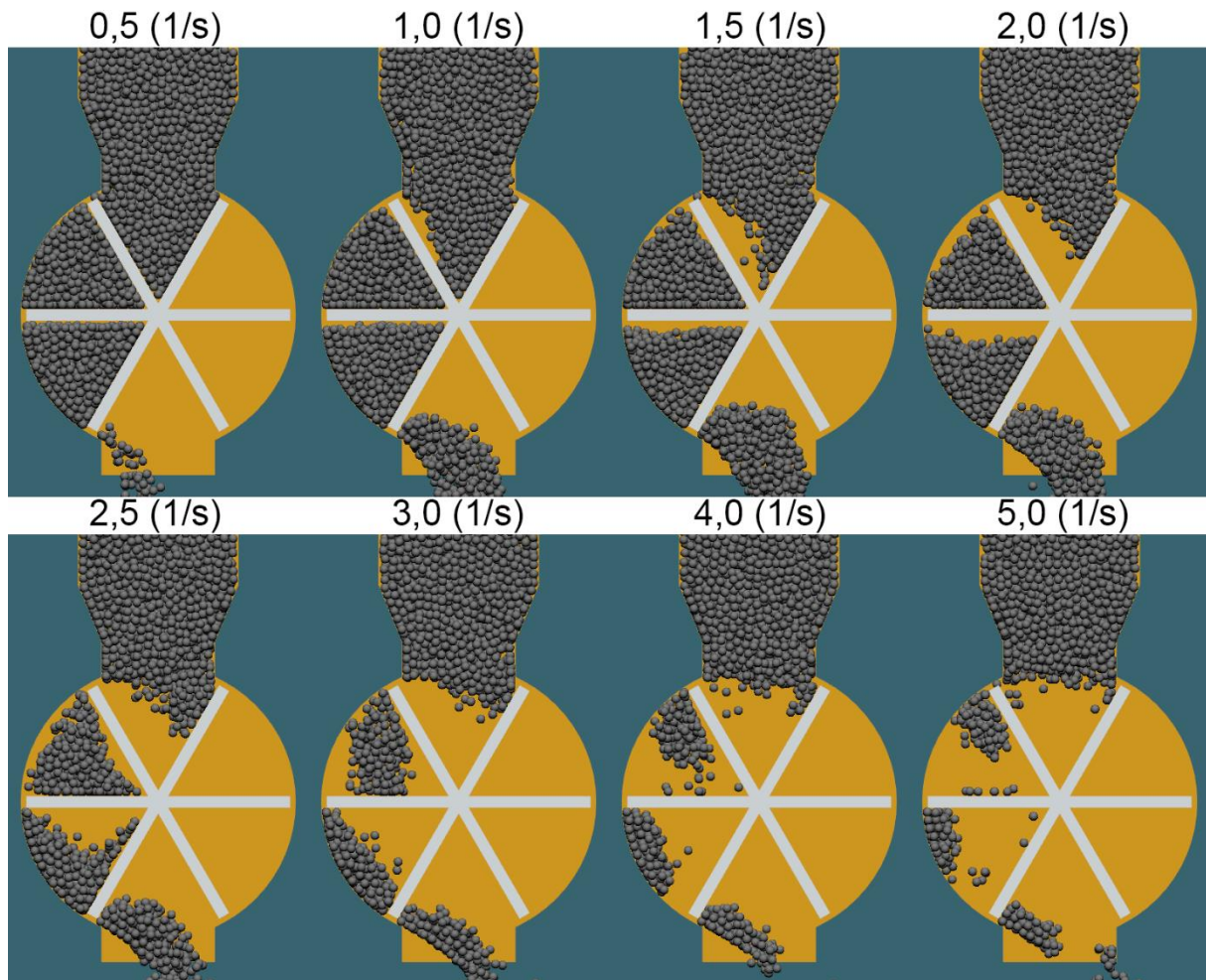
9. ábra. A tömegáram változása a fordulatszám függvényében, különböző adagoló átmérők mellett.

A 9. ábra mutatja a különböző paraméterű cellás adagolók átlagos által biztosított tömegáramot. Az y-tengelyen a tömegáram, az x-tengelyen a műveleti paraméter, a cellás adagoló fordulatszáma, található. A görbék különböző geometriai paraméterhez, a cellás adagló átmérőjéhez, tartoznak. Megfigyelhető, hogy a cellás adagoló átmérőjét növelve az átlagos tömegáram is növekszik. A fordulatszámot tekintve az első szakaszban megfigyelhető egy lineáris felfutási szakasz, ami irányítási szempontból jelentős. A lineáris szakasznak köszönhetően, a fordulatszám növelésével az átlagos tömegáram nagysága is egyenletesen növekszik, így ipari szabályzó berendezésekkel a tömegáram egyszerűen szabályozható a lineáris szakaszhoz tartozó intervallumban, a kívánt tömegáramhoz tartozó fordulatszám beállításával. A lineáris felfutási szakasszal kapcsolatban az is megfigyelhető, hogy a

különböző átmérőjű adagolókhöz tartozó lineáris szakaszok fordulatszám intervalluma csökken. A legkisebb, 0,06 m, átmérőjű cellához tartozó lineáris szakasz 0,5 – 3 1/s fordulatszám között alakul ki, addig a legnagyobb, 0,120 m, átmérőjű cellához tartozó lineáris szakasz már csak 0,5 – 1,5 1/s fordulatszámok között alakul ki. Mivel a kívánt tömegáram beállítása, a cellás adagoló szabályozása annál könnyebb minél kisebb a lineáris szakasz meredeksége, ezért célszerű a cellás adagoló átmérőjét alacsonyan tartani. A kezdeti, lineáris szakasz után, egy maximum elérése figyelhető meg a görbéken, aminek értéke annál nagyobb, minél nagyobb a cellás adagoló átmérője. Ez a maximális érték azt jelenti, hogyha szükség van nagyobb tömegáramok elérésére, akkor az adott esetekben csak az átmérő növelésével érhető el, a fordulatszám növelésével nem. A maximum elérése annál később következik be, minél kisebb a cellás adagoló átmérője, ez valószínűleg a lapáthosszal magyarázható, a jelenség 10. ábrán jól megfigyelhető. A maximális tartomány után egy letörési tartomány következik, ahol az átlagos tömegáram értéke csökkenni kezd. Mivel a maximumok elérése az átmérő csökkenésével eltolódik, ezért ez a letörési szakasz is eltolódik, de a 9. ábra 4 – 5 1/s fordulatszámú tartományában már jól látszik, hogy a letörési tartományban, minden átmérőjű cella tömegárama fokozatosan ugyan arra a tömegáramhoz kezd tartani. A lineáris és a maximális tartomány alapján meghatározható egy átmérő optimum, mivel az adott tömegáram csak megfelelően nagy átmérőjű cellás adagolóval érhető el, viszont ennél nagyobb átmérő alkalmazása nem ajánlott, mivel nagyobb átmérőknél növekszik a lineáris szakasz meredeksége és a szabályozás kevésbé lesz pontosan elvégezhető. A letörési tartomány alapján pedig egyértelmű, hogy fölösleges egy adott átmérőjű cellás adagolót nagyobb fordulatszámon működtetni teljesítmény fokozás céljából, mivel maximális értéknél úgysem érhető el nagyobb tömegáram vele, sőt a tömegáram még csökkeni is kezd.

6.2. A részecskék áramlási képének vizsgálata a cellás adagolóban

A cellás adagoló tömegáramának vizsgálata során a fordulatszámtól függő jelenségek pontosabb megértéséhez ábrázoltam állandó átmérő mellett különböző fordulatszámoknál a részecskék elhelyezkedését a cellás adagolóban. A 10. ábra ugyanabban az időpillanatban készült ugyan akkora átmérőnél, különböző fordulatszámoknál. Az időpillanatot úgy választottam meg, hogy a cellás adagoló lapátjai ugyan abban a helyzetben legyenek és a tömegáram már egyenletes periodikus változást mutat.



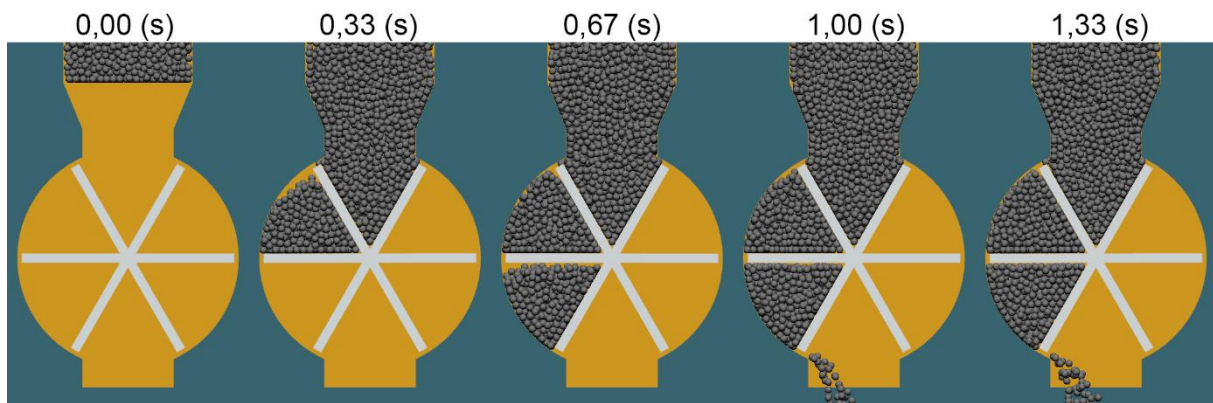
10. ábra. A részecskék elhelyezkedése a cellás adagolóban állandó átmérő (0,12m), különböző fordulatszámok mellett.

Az ábrán megfigyelhető, hogy a cellás adagoló feltöltődése folyamatosan csökken. A 0.5 1/s fordulatszámhoz tartozó képen látszik, hogy a cellának még van ideje feltöltődni. 1,0 – 1,5 1/s fordulatszám között a kialakuló üres rész még kicsi, és a fordulatszám növekedéséből adódó adagolási gyorsulás valószínűleg még tudja kompenzálni. 2,0 1/s fordulatszámánál az átlagos tömegáram eléri maximumát. 2,5 1/s fordulatszámtól a keletkező üres rész egyre jobban növekszik, de a részecskék még az alsó lapáton nyugszanak. 3,0 1/s egy másik fordulópontnak tekinthető, ugyanis ennél a fordulatszámnál a részecskék mintha lebegnének a cellás adagoló lapátjai között, vagyis a lapátok gyorsasága elérte a részecskék esés sebességét. 4,0 1/s fordulatszámnál a részecskéket már a felső lapátok nyomják előre. 5,0 1/s-nál már alig van ideje némi részecskének a cellás adagolóba jutni, ennél nagyobb fordulatszámnál már nem is végeztem szimulációt. Összességében tehát az mondható el, hogy egy adott fordulatszám alatt a celláknak még van idejük teljesen feltelni, a tömegáram ennek hatására növekszik. A fordulatszám növekedésével a celláknak egyre kevesebb idejük lesz megtelni,

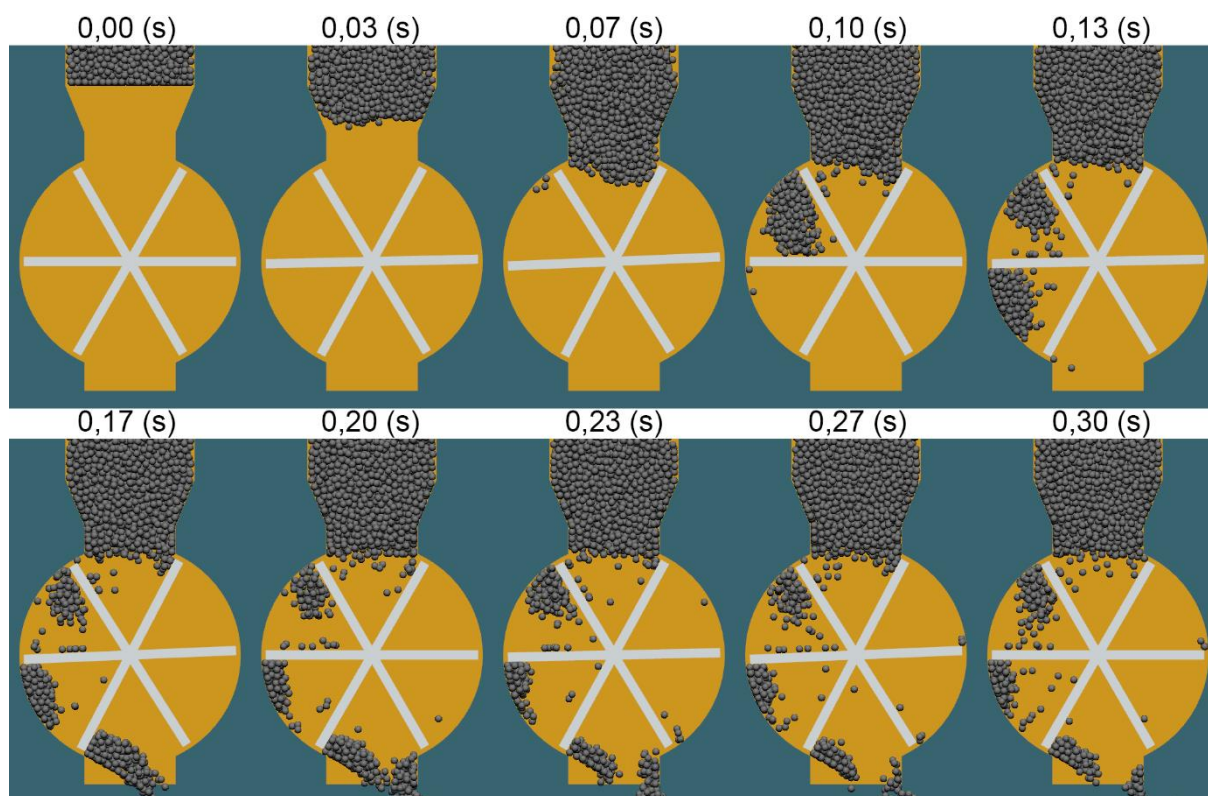
ezt egy ideig a fordulatszámából adódó adagolási gyorsaság még tudja kompenzálni, ez után viszont a tömegáram maximumot ér el. A fordulatszám további növekedésével annyira kevés idejük lesz a celláknak a feltöltődésre, hogy a tömegáram csökkenni kezd. Egy fordulatszám felett pedig már a cellás adagoló lapátjai tolják maguk előtt a részecskéket.

6.3. A cellás adagoló indításának vizsgálata

A cellás adagoló elindulásának bemutatásához ábrázoltam állandó átmérőnél, minimális (0,5 1/s) és maximális (5,0 1/s) a cellás adagolóban a részecskék helyzetét 1/6 fordulatonként. A cellás adagoló indulása 0,5 1/s fordulatszámnál a 11. ábrán, 5,0 1/s fordulatszámnál a 12. ábrán figyelhető meg.



11. ábra. A cellás adagoló indulása 0,12 m cella átmérőnél, 0,5 1/s fordulatszámnál 1/6 fordulatonként



12. ábra. A cellás adagoló indulása 0,12 m cella átmérőnél, 5,0 1/s fordulatszámmal körülbelül 1/6 fordulatonként

Mindkét ábránál az első kép a 0. időpillanatot, a részecskék kezdeti állapotát mutatja. A 11. ábrán látható, hogy a részecskéknek van idejük feltölteni a cellákat, az adagoló mindig tele lesz mire a következő fázisba ér. A kiürítési fázisnál a részecskéknek van ideje kihullani a cellákból. A 12. ábrán megfigyelhető, hogy a részecskéknek nincs idejük feltölteni a cellákat, a cellás adagoló lapátjai olyan gyorsan forognak, hogy amint egy kis részecske leesett eléjük, azt rögtön el is ragadják. A 12. ábránál külön érdekes a kiürítési fázis, a lapátok olyan erővel tolják maguk előtt a részecskéket, hogy kilépésnél azokat nekik csapják a cellás adagoló kilépő csonkjának falához. Az első pár adag részecske kiürülését ez még nem zavarja, viszont pár hatod fordulat után, akkora felhalmozódás alakul ki ebben a tartományban, hogy az új részecskék nem tudnak kiürülni és az adagolóban maradnak. Néhány újabb hatod fordulat után az új részecskék elkezdik kinyomni a felhalmozódott részecskéket, az áramlási kép stabilizálódik és egyre kevesebb részecske kezd bennragadni a cellákban.

6. Összefoglaló

A diszkrét elem módszer (DEM) alkalmazásával a cellás adagoló által átszállított részecskék tömegáramát vizsgáltam különböző tervezési paraméterek, geometriai és műveleti paraméterek mellett. A módszer alkalmazásával lehetőség nyílik a szilárd részecskék mozgásának és áramlásának dinamikus szimulációjára és a cellás adagolóban kialakuló áramlási képek vizsgálatára.

A szimulációs vizsgálatokkal azt kaptam, hogy az adagolón átáramló részecskék tömegárama periodikusan változik, köszönhetően a cellás adagoló kialakításának. A cellás adagoló fordulatszámának vizsgálatával megállapítottam, hogy a részecskék átlagos tömegárama a vizsgált fordulatszám tartományban nem lineáris. Minden adagoló átmérő esetén azonban létezik egy olyan fordulatszám tartomány, amely esetben lineárisan változik a tömegáram a fordulatszámmal. Ezekben a lineáris fordulatszám tartományokban használható szabályozási feladatok elvégzésére az adagoló. A lineáris szakaszok után minden adagoló átmérő esetén a tömegáram egy maximumot ér el majd csökkenő tendenciát mutat. A szimulációs vizsgálatok által kapott részletes áramlási képek segítségével láthatóvá váltak a különböző fordulatszámokhoz tartozó részecske áramlások sajátosságai, a részecskék és az adagoló lapátjainak kölcsönhatása.

A szimulációs vizsgálatokat GPU-ra megírt kód segítségével végeztem. A párhuzamos programozás segítségével a szimulációs vizsgálatok futási ideje több napos nagyságrendről, pár órára csökkent. Így lehetőség volt több szimuláció futtatására, több paraméter vizsgálatára, azok közül a legígéretesebb kiválasztására, majd ezután sűrűbb paraméter beosztás melletti szimulációk készítésére és azok eredményeinek bemutatására.

A diszkrét elem módszer alkalmazásában a részecske-fal ütközéseket tekintve egy olyan készülék geometria reprezentációt alkalmaztam, amelyben a geometriát egy háromszögekkel megadott felülettel közelítettem, amely hatékonyabbá tette a részecske-fal ütközések számítását és annak GPU általi kezelését.

A tömegáram fordulatszám és átmérő függésének vizsgálatával sikerült olyan megállapításokat tenni, amelyek cellás adagolóval biztosított tömegáram szabályozás esetén fontos műveleti szempontok lehetnek. A DEM szimulációs vizsgálatok által rendelkezésre álló részletes áramlási képek tanulmányozásával lehetőség nyílt a cellás adagolóban kialakuló áramlások és jelenségek részletes megfigyelésére, illetve a cellás adagoló működésének jobb megértésére.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet Dr. Ulbert Zsolt témavezetőmnek a munkám során nyújtott szakmai útmutatásaiért, segítségéért és hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Irodalomjegyzék

- Anderson, T.B., Jackson, R.: A fluid mechanical description of fluidized beds. I&EC Fundamentals, 1967, 6 (4), 527-539
- AL-DIN N., GUNND.J.: Metering of Solids by a Rotary Valve Feeder, Powder Technology, 1983, 36, 25-31
- Bouillard, J.X., Lyczkowski, R.W., Gidaspow, D.: Porosity distribution in a fluidized bed with an immersed obstacle. AIChE J., 1989, 35 (6), 908-922
- Cundall, P.A., Strack, O.D.L.: A discrete numerical model for granular assemblies. Géotechnique, 1979, 29 (1), 47-65
- Ding, J., Gidaspow, D.: A bubbling fluidization model using kinetic theory of granular flow. AIChE J., 1990, 36 (4), 523-538
- Fan, H., Mei, D., Tian, F., Cui, X., Zhang, M.: DEM simulation of different particle ejection mechanisms in a fluidized bed with and without cohesive interparticle forces. Powder Technology, 2016, 288, 228–240
- Gidaspow, D.: Multiphase flow and fluidization. Academic Press, New York, 1994, ISBN: 9780122824708
- Goda T. J., Ebert F.: Three-dimensional discrete element simulations in hoppers and silos, Powder Technology, 2005, 158, 58 – 68
- Gonzalez-Montellano C., Ramírez Á., Gallego E., Ayuga F.: Validation and experimental calibration of 3D discrete element models for simulation of the discharge flow in silos, Chemical Engineering Science, 2011, 66, 5116-5126
- Hoomans, B.P.B., Kuipers, J.A.M., Briels, W.J., van Swaaij, W.P.M.: Discrete particle simulation of bubble and slug formation in a two-dimensional gas-fluidized bed: A hard sphere approach. Chem. Eng. Sci., 1996, 51 (1), 99-118
- Hoomans, B.P.B., Kuipers, J.A.M., van Swaaij, W.P.M.: Granular dynamic simulation of segregation phenomena in bubbling gas-fluidized beds. Powder Technology, 2000, 109, 41-48
- Hou, Q.F., Zhou, Z.Y., Yu, A.B.: Gas–solid flow and heat transfer in fluidized beds with tubes: Effects of material properties and tube array settings. Powder Technology, 2016, 296, 59–71
- Hou, Q.F., Kuang, S.B., Yu, A.B.: A DEM-based approach for analyzing energy transitions in granular and particle-fluid flows. Chem. Eng. Sci., 2017, 161, 67–79
- Kaneko, Y., Shiojima, T., Horio, M.: DEM simulation of fluidized beds for gas-phase olefin polymerization. Chem. Eng. Sci., 1999, 54, 5809-5821

- Kawaguchi, T., Tanaka, T., Tsuji, Y.: Numerical simulation of two-dimensional fluidized beds using the discrete element method (comparison between the two- and three-dimensional models). *Powder Technology*, 1998, 96, 129-138
- Kawaguchi, T., Sakamoto, M., Tanaka, T., Tsuji Y.: Quasi three-dimensional numerical simulation of spouted beds in cylinder. *Powder Technology*, 2000, 109, 3-12
- Kirkwood, C., Roberts, A.W. and Craig, D.A.: The antisegregation and blending characteristics of a massflow hopper and rotary valve, Paper for presentation at 6th Int Conf on Bulk Materials, Storage, Handling and Conveying, (The Institution of Engineers, Australia, September), 1998
- Kuipers, J.A.M., Prins, W., van Swaaij, W.P.M.: Theoretical and experimental bubble formation at a single orifice in a two-dimensional gas-fluidized bed. *Chem. Eng. Sci.*, 1991, 46 (11), 2881-2894
- Kuipers, J.A.M., van Duin, K.J., van Beckum, F.P.H., van Swaaij, W.P.M.: A numerical model of gas-fluidized beds. *Chem. Eng. Sci.*, 1992, 47 (8), 1913-1924
- Kuipers, J.A.M., van Duin, K.J., van Beckum, F.P.H., van Swaaij, W.P.M.: Computer simulation of the hydrodynamics of a two-dimensional gas-fluidized bed. *Comput. Chem. Eng.*, 1993, 17 (8), 839-858
- Mark, W.J.: 3D Distance from a Point to a Triangle. Technical report CSR-5-95, Department of Computer Science, Swansea University, 1995, 1-5
- Masson S., Martinez J.: Effect of particle mechanical properties on silo flow and stresses from distinct element simulations, *Powder Technology*, 2000, 109, 164-178
- McKeen, T., Pugsley, T.: Simulation and experimental validation of a freely bubbling bed of FCC catalyst. *Powder Technology*, 129 (1-3), 139-152
- Nieuwland, J.J., Veenendaal, M.L., Kuipers, J.A.M., van Swaaij, W.P.M.: Bubble formation at a single orifice gas-fluidized beds. *Chem. Eng. Sci.*, 1996, 51 (17), 4087-4102
- Pougatch, K., Salcudean, M., McMillan, J.: Simulation of particle attrition by supersonic gas jets in fluidized beds. *Chem. Eng. Sci.*, 2010, 65 (16), 4829-4843
- Tsuji, Y., Kawaguchi, T., Tanaka, T.: Discrete particle simulation of two-dimensional fluidized bed. *Powder Technology*, 1993, 77, 79-87
- Tsuji, Y., Yabumoto, K., Tanaka, T.: Spontaneous structures in three-dimensional bubbling gas-fluidized bed by parallel DEM-CFD coupling simulation. *Powder Technology*, 2008, 184 (2), 132-140
- Ulbert, Zs., Hatano, H., Ohya, H., Endoh, S.: Computer simulation of gas-solid chemical reaction and particle motion in MERIT (Mediator Recirculation Integration Technology) circulating fluidized bed combustion system. The 6th SCEJ Symposium on Fluidization, Maebashi, Japan, 7-8 December, 2000, 189-196
- Wang, X., Jin, B., Zhong, W.: Three-dimensional simulation of fluidized bed coal gasification. *Chem. Eng. Proc.: Proc. Int.*, 2009, 48 (2), 695-705
- Yang, F., Thornton, C., Seville, J.: Effect of surface energy on the transition from fixed to bubbling gas-fluidised beds. *Chem. Eng. Sci.*, 2013, 90, 119-129
- Yang, S-C., Hsiau S-S.: The simulation and experimental study of granular materials discharged from a silo with the placement of inserts, *Powder Technology*, 2001, 120, 244-255

Zeng Y., Jia F., Zhang Y., Meng X., Han Y., Wang H.: DEM study to determine the relationship between particle velocity fluctuations and contact force disappearance, Powder Technology, 2017, 313, 112-121



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018**



**A glikoproteinek diagnosztikai analízise során használt
peptid-N-glikozidáz F enzim termeltetése és tisztítása**

Készítette: Kovács Noémi

Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka

Mérnöki Kar, Bio-Nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet

A pályamunka lezárásának dátuma: 2018.12.05.

Tartalom

177

1 Bevezetés.....	180
2 Rövidítések jegyzéke.....	181
3 Irodalmi áttekintés	182
3.1 A glikánok	182
3.1.1 Az N-glikánok és szerkezetük	184
3.2 A peptid-N-glikozidáz F (PNGase F) enzim	185
3.2.1 A peptid-N-glikozidáz F szerkezete, működése	185
3.2.2 A peptid-N-glikozidáz F termeltetése, előállítása	187
4 Célkütűzés	188
5 Felhasznált anyagok, eszközök és alkalmazott módszerek	189
5.1 Felhasznált anyagok, eszközök és berendezések	189
5.2 Alkalmazott módszerek	190
5.2.1 Rekombináns DNS technika, génsebészet	190
5.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR)	191
5.2.3 Nukleáz enzimek	193
5.2.4 Ligálás	194
5.2.5 Kompetens sejtek	194
5.2.6 Transzformálás	194
5.3 Bakteriális expresszió	195
5.4 Gélelektroforézis	195
5.4.1 Agaróz gélelektroforézis	196
5.4.2 Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	197
5.4.3 Affinitás kromatográfia	199
5.4.4 Dialízis.....	200
6 Az elvégzett kísérletek és azok eredményeinek kiértékelése	200
6.1 A 6His-TEV-PNGase F gén és fehérje felépítése, létrehozása.....	200
6.1.1 A pET17b-6His-TEV-PNGaseF plazmid létrehozása.....	201
6.1.2 A PNGase F gén felszorzozása PCR reakcióval.....	202

6.1.3	A pET17b vektor és a PNGase F PCR inzert restrikciós emésztése	203
6.1.4	Az emésztett pET17b vektor és PNGase F inzert összeépítése, ligálása	204
6.1.5	A pET17b-6His-TEV-PNGase F plazmid ellenőrzése.....	205
6.2	A 6His-TEV-PNGase F enzim expressziója <i>E.coli BL21</i> törzsekben	206
6.2.1	A 6His-TEV-PNGase F enzim termeltetése és tisztításának kísérlete	209
6.2.2	A 6His-TEV-PNGase F oldhatóságának vizsgálata	212
6.3	A 6His-TEV-PNGase F enzim termeltetése a <i>SHuffle</i> baktériumtörzsben.....	214
6.3.1	A 6His-TEV-PNGase F próbatermeltetése <i>SHuffle</i> baktériumtörzsben.....	215
6.3.2	A 6His-TEV-PNGaseF fehérje formájának vizsgálata a <i>SHuffle</i> törzsben	216
6.3.3	A 6His-TEV-PNGase F enzim tisztítása affinitás kromatográfiával:	217
6.4	A 6His-TEV-PNGase F aktivitásának meghatározása	219
6.4.1	A szabad enzimek aktivitásának vizsgálata.....	219
6.4.2	A rögzített enzimek aktivitásának összehasonlítása.....	221
7	Összefoglalás	224
8	Irodalomjegyzék	225
9	Köszönetnyilvánítás.....	228
10	Melléklet	229

1 **Bevezetés**

A fehérjék glikozilációja kulcsszerepet tölt be a biológiai folyamatokban, például a sejt-sejt kölcsönhatásokban, a sejtek felismerésében és differenciálódásában, valamint a sejtek és hormonok, baktériumok, vírusok közti kölcsönhatásban. A fehérjék glikozilációját végző enzimek expressziója függ a körülményektől, így a cukormintázat esetleges megváltozása egy adott betegségre is utalhat, melynek diagnózisát ennek ismeretében már a korai stádiumban fel lehetne állítani. Emellett a glikoziláció a biofarmakológiai alkalmazásokban is fontos szerepet tölt be, mivel befolyásolhatja a terápiás glikoproteinek hatását. Ennek köszönhetően a glikánok analízisének egyik fontos kutatási területe a glikánok biomarkerként való alkalmazása.

A fehérjék cukormintázat-változásának detektálásához nagy felbontású és érzékenységgű analitikai módszerekre van szükség, így például a tömegspektrometria (MS), a folyadékkromatográfia (LC), az NMR spektroszkópia és a kapilláris elektroforézis (CE) használható hatékonyan a komplex cukrok vizsgálatára. Az N-kötött (aszparagin aminosavhoz kötött) glikánok vizsgálatának első lépése a cukrok glikoproteinről való lehasítása. Ezt leggyakrabban a peptid-N-glikozidáz F (PNGase F) enzimmel valósítják meg, ami a fehérje szénhidrátkötő aszparagin aminosava és a trimannozil-kitobióz mag legbelső N-acetil-glükózaminja közti kötést bontja.

A PNGase F enzimet több gyártó is forgalmazza, azonban ezek a készítmények drágák, ami korlátot szabhat a glikánok vizsgálatát célzó alapkutatásoknak. Ez kiküszöbölhető az enzim előállítására alkalmazható gyors és olcsó módszer kifejlesztésével. Rekombináns DNS technológia segítségével az enzim akár szilárd hordozóra rögzíthető formára is alakítható, így rögzített felületre immobilizálva akár többször felhasználható, ezzel tovább csökkentve a költségeket.

Munkámat a BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017 és az OTKA NN117849 projekt támogatta.

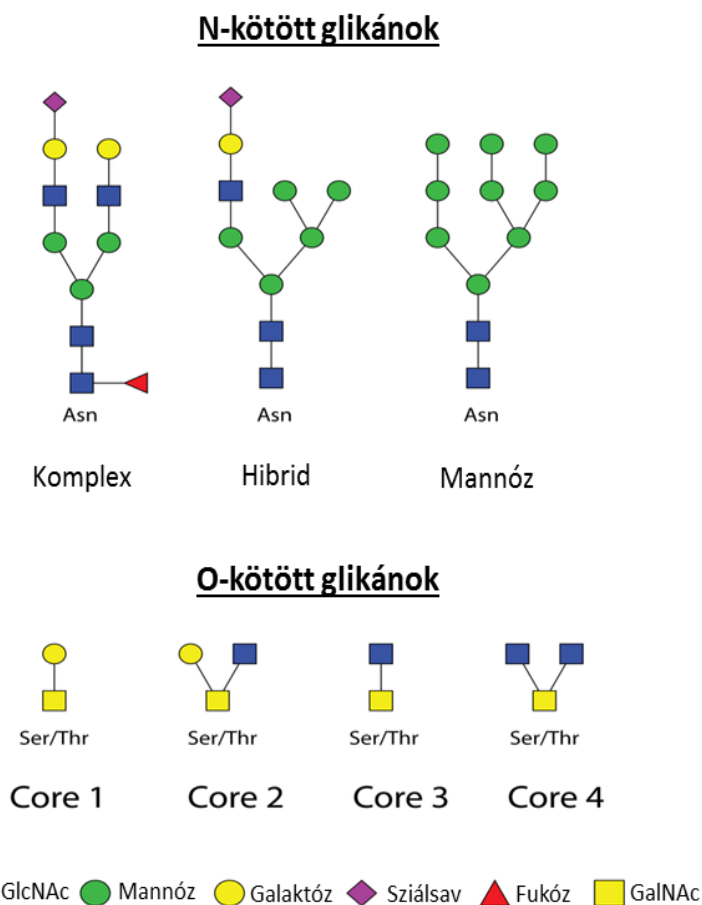
2 Rövidítések jegyzéke

PNGase F	peptid-N-glikozidáz F
GlcNAc	N-acetil-glükózamin
EC number	„Enzyme Commission number”, az enzimek osztályozására szolgáló rendszer
PCR	polimeráz láncreakció
SDV	0,20 µm-es pórusátmérőjű steril membránon szűrt nagytisztaságú víz
bp, kbp	bázispár, kilobázispár
LB/Amp	100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldat
LB/Tetr	15 µg/ml tetraciklint tartalmazó LB tápoldat
LB/Chl	30 µg/ml kloramfenikolt tartalmazó LB tápoldat
ON tenyésztés	a baktériumkultúrák egy éjszakán át történő tenyésztése
SDS PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
C+RIL	<i>BL21-CodonPlus-RIL</i> baktériumtörzs
IPTG	Izopropil-β-D-tiogalaktozid
MQ víz	kétszer ioncserélt, 0,20 µm-es pórusátmérőjű membránon szűrt víz
„A” puffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH=7,4 puffer
„B” puffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH=7,4 puffer
„C” puffer	100 mM K ₂ HPO ₄ , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH=8,0 puffer
„D” puffer	100 mM K ₂ HPO ₄ , 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol pH=8,0 puffer
CV	oszloptérfogat (column volume)
RFU	relatív fluoreszcens egység (relative fluorescence unit)
mU	milliUnit
U	Unit, egység, a PNGase F esetén 1 Unit az az aktivitás, amely során 1 µl <i>CarboClip</i> (az 500 U aktivitású liofilizált enzim 150 µl H ₂ O-ban feloldva) 1 mg Ribonukleáz B >95%-át bontja el <20 perc alatt
APTS	8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav, fluoreszcens festék

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A glikánok

A cukrok (más néven szacharidok) fontos szerepet töltenek be a biológiai rendszerekben, mivel strukturális, fizikai és metabolizmusbeli szerepük is jelentős. A különböző egyszerű cukrok, azaz monoszacharidok hidroxilcsoportjaikon keresztül glikozidkötésekkel sokféle módon, elágazó kötésekkel kapcsolódhatnak össze, így jönnek létre a glikánok vagy más néven poliszacharidok. Ezek a komplex cukrok a fehérjék poszttranszlációs módosulása során a proteinekhez kapcsolódhatnak (ez a glikoziláció), így létrejönnek a glikoproteinek, amik befolyásolják a sejt-sejt, receptor-ligandum kölcsönhatásokat, a fehérjék feltekeredését, stabilitását, illetve biológiai aktivitásukat [1,2,8]. Az emlős szervezetekben a glikozilációnak két fő típusa van, az N- és az O-glikoziláció. Az N-kötött glikánok az aszparagin aminosav (Asn) oldalcsoportjának nitrogénjéhez kapcsolódnak, míg az O-kötött cukrok a szerin (Ser) vagy treonin (Thr) oldalláncában a hidroxil-csoport oxigénjéhez kötődnek. Összetettségüket vizsgálva megállapítható, hogy az N-glikánok komplex, sokszor elágazó, míg az O-glikánok kisebb, egyszerűbb szerkezettel rendelkeznek (1. ábra) [3,5,4,9].



1. ábra: Az N- és O-glikánok szerkezetének sematikus ábrái [1. alapján]

A glikánok fehérjékhez kapcsolását különböző specifikus enzimek, például transzferázok, glikozidázok végzik. Ezek szekvenciája a genomban kódolt, azonban expressziójuk, aktivitásuk környezetfüggő, ezért bizonyos hatásokra bizonyos proteinek egyedi cukormintázata megváltozhat [10]. Ez a heterogenitás kialakulhat betegségek hatására is, ami lehetővé teszi, hogy a fehérjék, sejtek sajátos cukormintázatát biomarkerként használjuk fel, amelyek segítségével akár a korai stádiumú, hagyományos technikákkal még nem kimutatható betegségeket diagnosztizáljuk [7,8]. Mindezek mellett a glikozilációnak a fehérjealapú gyógyszerek esetén is jelentős szerepe van, hiszen a nem megfelelő cukormintázattal rendelkező készítmények akár egészségkárosodáshoz is vezethetnek, vagy növelhetik ezek hatását, aminek köszönhetően kevesebb hatóanyaggal is elérhető lehet a kívánt hatás [8].

A glikánok fent említett jelentősége miatt napjainkban a cukrok szerkezetének és összetételének vizsgálata az analitika egyik gyorsan fejlődő ágává vált [1]. A biokémiai

folyamatokban az N- és O-glikoziláció egyaránt fontos, azonban egyelőre csupán csak az N-glikánok vizsgálatára alkalmas enzimek állnak a rendelkezésünkre [5,6,8].

3.1.1 Az N-glikánok és szerkezetük

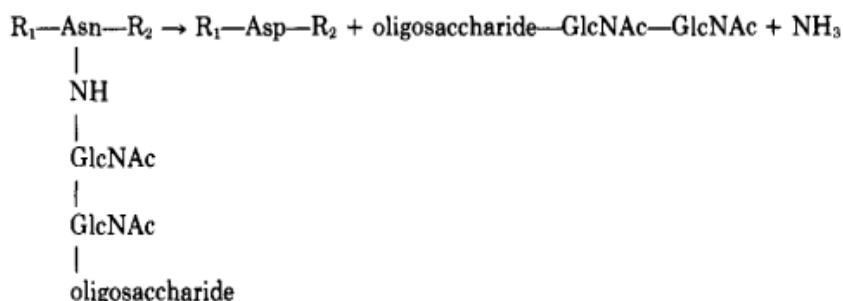
Az N-glikoziláció a fehérjék azon poszttranszlációs módosulása, mely során a glikánok a proteinek aszparagin aminosavának (Asn) oldalláncához kapcsolódnak kovalens kötéssel. Ez a kötés egy N-acetil-glükózamin (GlcNAc) monoszachariddal jön létre, ha az Asn-Xxx-Thr/Ser szekvencia jelen van, amiben az Xxx prolin kivételével bármilyen aminosav lehet [1,8,9].

Az N-kötött glikánoknak három típusát különböztetjük meg, melyek mind egy közös trimannozil-kitobióz alapstruktúrát vagy „core” (mag) struktúrát ($\text{Man}\alpha 1\text{-}3(\text{Man}\alpha 1\text{-}6)\text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}\text{Asn-X-Ser/Thr}$) tartalmazzák. Ehhez a két GlcNAc-ból és három mannózból álló maghoz kapcsolódnak a különböző monoszacharidokból felépülő, elágazó szénhidrát karok. A mannóz típusú N-glikánoknál a karokat mannóz egységek, a hibrid típus esetén a $\text{Man}\alpha 1\text{-}3$ kart komplex cukrok, míg a másik $\text{Man}\alpha 1\text{-}6$ kart csak mannóz építi fel. A harmadik, komplex típus esetén GlcNAc kapcsolódik antennaszerűen az alapstruktúrához. Emellett más cukrok is kapcsolódhatnak ehhez a struktúrához, például a mag mannóz szerkezetéhez fukóz, valamint a komplex glikánok esetén a lánchosszabító vagy lánczáró lépéseknél szíálsav vagy fukóz épülhet be a szerkezetbe [4,5,8,9] (3. ábra).

3.2 A peptid-N-glikozidáz F (PNGase F) enzim

A peptid-N-glikozidáz F (EC 3.5.1.52) az egyik leggyakrabban használt enzim a glikánok vizsgálatában. Feladata az analízis első lépésének megvalósítása, azaz az N-glikánok glikoproteinekről való lehasítása [8,11].

Az enzimet Elder és Alexander azonosította [12] endoglikozidázként (Endo F) a Gram-negatív *Flavobacterium meningosepticum* (*Elizabethkingia miricola*) baktérium tenyészetének felülúszójából [13,14]. Később azonban kiderült, hogy a fehérje preparátumában az amidáz aktivitású enzim, a peptide-N⁴-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine amidase F, azaz PNGase F enzim található. A fehérje a polipeptid lánchoz, a belső di-N-acetilkitobióz maghoz kötődik, majd hasítja az N-acetilglükózamin és az aszparagin aminosav közti kötést az N-glikánokban, így létrehozva egy aszparaginsavat, ammónia molekulát és szabad, redukált oligoszacharidot (2. ábra). A PNGase F további sajátossága, hogy az N-glikánok összes osztályát képes hidrolizálni glikoprotein és glikopeptid szubsztrátok esetén is, aminek köszönhetően az N-kötött cukrok vizsgálatának fontos eszközévé vált [15].



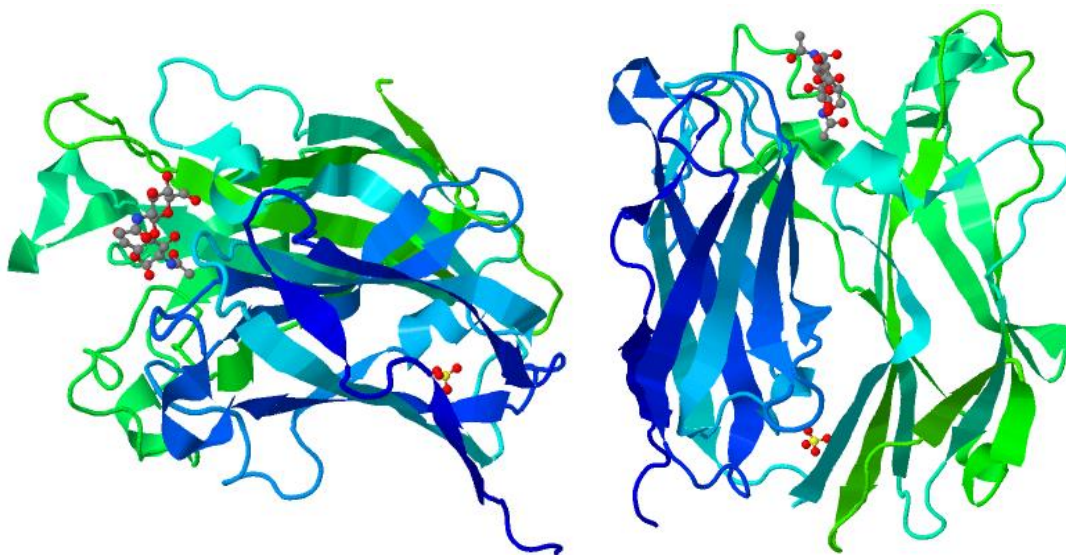
2. ábra: A PNGase F által katalizált reakció, ahol az R1 és R2 aminosavak [14]

3.2.1 A peptid-N-glikozidáz F szerkezete, működése

Szerkezeti tulajdonságait tekintve a peptid-N-glikozidáz F 354 aminosavból áll. A fehérje első 40 aminosava egy szignálpeptid, ami a szekréció során lehasad, így a fehérje funkcionális része a 314 aminosav hosszú 41-354 szegmens, melynek molekulatömege 34,8 kDa. A protein feltekeredése során két domént alakít ki, melyek egy-egy 8 szálú antiparallel β-szendvics motívummal rendelkeznek. Mindkét β-szendvicsben megtalálható egy-egy

parallel főtengely, amik párhuzamosan egymás mellett helyezkednek el. A domének között kovalens kötés létesít kapcsolatot a molekula csúcsán, valamint a domének az érintkezési felületük teljes hosszában kiterjedve hidrogén-kötések alakulnak ki. Kezdetekben az enzim aktív centrumát a domének érintkezési felületének három különböző területét feltételezték, melyek a molekula felületén egy körülbelül egy-egy 20 Å átmérőjű hidrofób mélyedést alakítanak [16,17,18] (3. ábra).

Később azonban azonosították az enzim katalitikus pontját (domének közti felületen egy mélyedés formájában), melyben az Asp-60, Glu-118 és Glu-206 aminosavak nélkülözhetetlenek a reakció lejátsszódásához. Az Asp-60 aminosav hidrogénkötéssel kapcsolódik a redukált végű GlcNAc-hez, valamint ez végzi az aszparagin N_δ atomjának az eltávolítását a szubsztrátban, ezért elsődleges fontosságú a reakcióban, hiánya az enzim aktivitásának teljes megszűnésével jár. A Glu-206 nincs közvetlen kapcsolatban a termékkel így feltehetően másodlagos szerepet tölt be, mint a köztitermék stabilizálása, vagy az aszparagin szubsztráttal való kölcsönhatás. A Glu-118 pedig a szubsztrát stabil megkötésében játszik fontos szerepet. Azonban mindezek ellenére a reakció, illetve ennek mechanizmusának pontos feltárása, leírása még további kutatásokat igényelnek [18].



3. ábra: A PNGase F 3D-s szerkezete N-acetil-glükózaminnal [21]

3.2.2 A peptid-N-glikozidáz F termeltetése, előállítása

A fehérje nagy mennyiségben történő előállítása a kezdetekben nehéz és időigényes volt, mivel az enzimet a *Flavobacterium* tenyészetének felülúszójából (50-60 liter) szűrővel tisztították. Az így kapott preparátumok kis mennyiségűek voltak, és a tenyészetben lévő proteázok néha degradálták az enzimet, ha nem használtak ellenük inhibitorokat [14]. A fenti problémák miatt az enzim utánpótlása limitált volt, ezért meghatározták az enzim aminosav és nukleinsav szekvenciáját, így lehetővé téve a fehérje egyszerűbb, rekombináns úton történő előállítását. Azonban mindezek ellenére az enzim intracelluláris termeltetése baktériumokban nehézkes, mivel az enzim 6 cisztein aminosavat tartalmaz, aminek köszönhetően könnyen aggregálódhat, inklúziós testeket vagy zárványokat képezve a sejtek citoplazmájában. Emiatt az aggregálódott, inaktív fehérjét gyakran a zárványok denaturálásával, majd renaturálásával hozzák aktív formába. Más megoldás lehet az intracellulárisan termelődő fehérje periplazmatikus térbe való kiválasztása, amikor a citoplazmában termelődő protein a membrán periplazmatikus terébe választódik ki. Így kis mennyiségű, de megfelelően feltekeredett aktív enzim állítható elő [13, 16]. Biológiai aktív PNGase F enzimet *E. coli* citoplazmájában Su és munkatársai 15 mg/l sejtkultúra mennyiségben tudtak előállítani, rekombináns DNS technikát alkalmazva [19,20].

A PNGase F enzim jelentőségét az is mutatja, hogy azt számos biotechnológiai cég forgalmazza (pl. Asparia Glycomics, New England Biolabs, Prozyme, QA Bio, Sigma, Promega, Clontech). Ezek közül több terméket N-terminális 6His toldalékkal látnak el, a könnyebb tisztíthatóság érdekében. Termékeik enzimaktivitását a különböző gyártók eltérő módszerrel határozzák meg, melyek közül néhány összehasonlíthatóságára a New England Biolabs egy konverziós táblázatot hozott létre [22]. Ezek az aktivitás adatok azonban minden esetben szabad, oldott enzimre vonatkoznak, pedig a tag-elt fehérjéknél lehetőség lenne rá, hogy a molekulákat a 6His toldalékuk segítségével rögzítve is használjuk, azonban az immobilizált PNGase F-re egy cég sem adja meg az enzimaktivitást.

Az eddigi eredményekből következik, hogy a PNGase F enzim aktív formában, nagy mennyiségben, olcsón történő előállítása, illetve többszöri felhasználhatósága továbbra is kihívás, miközben iránta az igény mind az alap kutatásban, mind a diagnosztikai alkalmazásban jelentős.

4 Célkitűzés

Az N-glikánok fontos szerepet játszanak a fehérjék feltekeredésében és biológiai funkciójában. A poszttranszlációs módosulások után a proteinek saját, specifikus glikánmintázattal rendelkeznek, amelyek akár biomarkerként alkalmazhatóak, mivel megváltozásuk egyes betegségekre utalhat. Emellett a glikolizációnak a biofarmakonok esetén is nagy jelentősége van, mivel a nem megfelelő cukormintázattal rendelkező molekulák befolyásolhatják a készítmény hatását.

A fehérjék cukormintázat-vizsgálatának első lépése a komplex cukrok leválasztása a fehérjéről a peptid-N-glikozidáz F (PNGase F) segítségével. Az enzimet több gyártó is forgalmazza, azonban ezek a készítmények drágák, ami korlátozza az enzim nagyobb mennyiségű felhasználását. Ugyanakkor a PNGase F termeltetéséről az irodalomban eddig publikált módszerek sem túl hatékonyak. Ezért munkám céljául tűztem ki egy olyan PNGase F variáns tervezését és létrehozását, mely bakteriális úton nagy mennyiségben, olcsón előállítható, könnyen tisztítható, valamint aktivitását megőrizve felületre vagy hordozóra rögzíthető, így elősegítve az enzim hosszabb távú felhasználását, és az analízis gazdaságosabbá tételét.

5 Felhasznált anyagok, eszközök és alkalmazott módszerek

5.1 Felhasznált anyagok, eszközök és berendezések

A tápoldatokat és az eszközöket Sanyo Labo autoklávban sterilizáltam. A primereket az Invitrogen VectorNTI programmal terveztem, majd az IDT, Integrated DNA Technologies cég szintetizálta. A PCR-hez a Strategene Pfu polimeráz enzimét, Pfu pufferét és a Novagen „2 mM each” dNTP oldatát használtam, a PCR készülék a Biometra gyártmánya. Az agaróz gélelektroforézist a Cleaver Scientific rendszerével végeztem. Az agaróz gél a Sigma agarózával a Biotium GelRed festékével készítettem el. A DNS agaróz gélből való izolálását az Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit-tel valósítottam meg. A nukleinsavak emésztéséhez a New England Biolabs enzimeit, a ligáláshoz a Fermentas T4 ligáz enzimét és ligáz pufferét használtam. A plazmidokat a Viogene Mini Plus Plasmid DNA Extraction System segítségével nyertem ki a sejtekből.

A 6His-TEV-PNGase F enzim tulajdonságait az ExPASy ProtParam [23] alkalmazásával határoztam meg. A baktériumok tenyésztéséhez használt LB, LB-agar tápanyagokat a Scharlau gyártotta, a szelektáláshoz használt ampicillin az AppliChem Panreac, a kloramfenikol a Sigma, a tetraciklin a Calbiochem terméke volt. A sejtek tenyésztéséhez a körülményeket az IKA^R KS 4000 i control inkubátor biztosította. A fehérje termeltetésének indukálását a Biosynth AG által gyártott IPTG-val valósítottam meg. A sejtek elválasztásához a Heraus Biofuge primoR centrifugáját és a Beckman Coulter OptimaTM MAX-E ultracentrifugáját használtam. A sejteket a Cole Parner Ultrasonic Processor szonikátorával tártam fel.

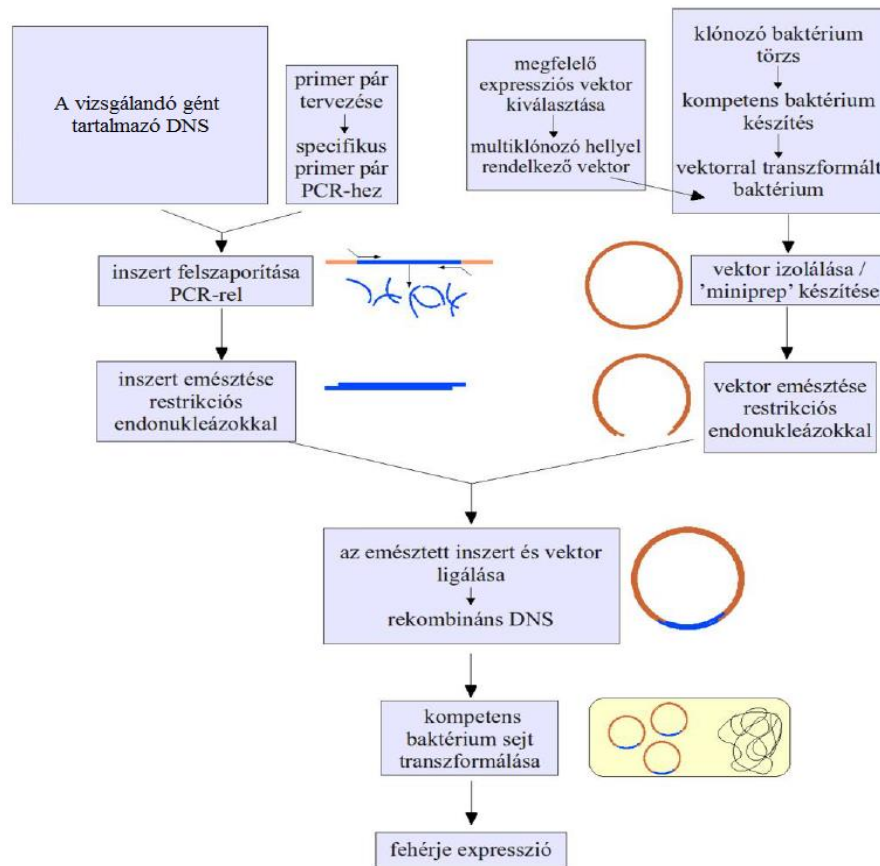
A proteázok ellen a Roche Complete EDTA-free Protease Inhibitor Coctail proteázgátlót használtam. Az affinitás kromatográfiás elválasztáshoz a GE Healthcare 5 ml térfogatú HiTrap Chelating oszlopa állt rendelkezésemre. A dialízishez a Sigma 1,6 in. 12400MWCO cellulóz dialízismembránját használtam. A sejtek optikai denzitásának és az enzim koncentrációjának meghatározását a Jasco V-630 spektrofotométerrel végeztem. Az SDS PAGE-hez használt géleket a BioRad 40%-os (37,5:1) akrilamid oldatából készítettem, fehérjék elektroforézissel való vizsgálatához a Thermo Scientific PierceTM Prestained Protein MW Marker-t és a BioRad Prestained Precision Plus markerét használtam. A fehérje mintáimat a Fluka BioChemika Lämmli pufferével készítettem el.

5.2 Alkalmazott módszerek

5.2.1 Rekombináns DNS technika, génszűrés

A génszűrés napjaink biotechnológiájának elengedhetetlen technikája, mellyel vizsgálható az élőlények egyes génjeinek működése, szerepe. Segítségével mutációkat hozhatunk létre ezekben, vagy akár teljes mértékben el is távolíthatjuk a genomból. Ezzel a technikával idegen géneket is vihetünk be az organizmusokba, hogy így vizsgáljuk pl. fehérjék termelődését, működését [29].

A génmanipulációhoz szükség van egy vektorra, ami egy hordozó DNS molekula, amibe be lehet építeni a vizsgálandó gént (inzeret). A folyamat röviden az alábbi lépésekből áll (4. ábra): Először az inzeret (vagy inzeret) mennyiségét felszaporítjuk, majd a vektort (általában plazmid) és az inzeret ugyanazzal a restriktációs endonukleázzal emésztjük, így a létrejövő DNS fragmentumok végei komplementerek lesznek egymással. Emésztés után a molekulákat megtisztítjuk a szennyezőktől (lehasított nukleotidok, enzimek, stb.), majd összekeverjük, megfelelően pufferált körülmények között ligáz enzimet adunk az elegyhez, ami a vektor és az inzeret egyesítésével létrehozza az új rekombináns DNS-t. Ezzel a molekulával valamilyen klónozó baktérium törzset (általában *Escherichia coli*) transzformálunk, melyben felszaporítható a nukleinsav. A sejtekből kinyerjük a rekombináns DNS-t, szekvenálással ellenőrizzük az összeépülés helyességét, majd egy fehérje termelő baktériumba juttatjuk be, és vizsgáljuk a gén által kódolt protein expresszióját, tulajdonságait [26,27,28,29].



1. ábra: A rekombináns DNS technika folyamata [29].

5.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR)

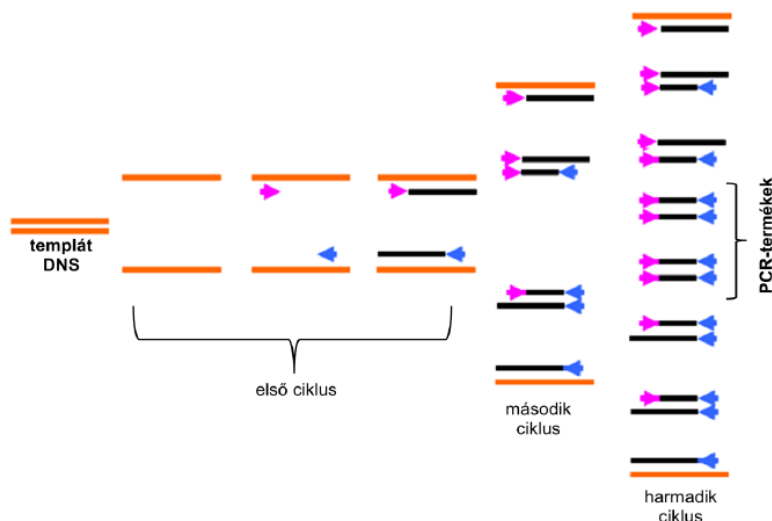
A polimeráz láncreakció, röviden PCR (polimerase chain reaction) a génsebészet egyik alapvető technikája. Segítségével *in vitro* módon, hatékonyan és specifikusan tudunk DNS szakaszokat felszaporozni. Elve nagyon egyszerű: a kétszálú DNS molekulákat hő segítségével denaturáljuk, majd miután a felszaporozandó DNS szakasz megfelelő végeihez hibridizálnak a polimerizáció kezdetét kijelölő primer oligonukleotidok, a DNS polimeráz enzim szintetizálja a komplementer szálakat. Ezt ciklikusan ismételve gyorsan, exponenciális módon felszaporíthatjuk a nukleinsav mennyiségét [28,29].

A PCR-hez szükséges anyagok:

- **Templát:** Az a kétszálú DNS, melynek egy adott szakaszát felsokszorozzuk a reakció során.
- **Primerek:** Szintetikus oligonukleotidok, melyekkel a DNS molekula felsokszorozandó szegmensét specifikusan kijelöljük. A szakasz 5' végét meghatározó primert „forward”-nak, a 3' végét kijelölt reverse”-nek hívjuk. A megfelelő tapadáshoz a primerek 3' vége teljes mértékben komplementere a templátnak, míg az 5' végük akár eltérhet a szekvenciájától, például nukleáz enzim vágóhelyeket is tervezhetünk ide.
- **Dezoxiribonukleotid-trifoszfátok (dNTP-k):** A komplementer szál létrehozásához szükséges dezoxiriboadenozin-trifoszfát (dATP), dezoxiribotimidin-trifoszfát (dTTP), dezoxiribocitidin-trifoszfát (dCTP) és dezoxiriboguanozin-trifoszfát (dGTP) molekulák.
- **Polimeráz enzim:** Azok a specifikus enzimek, melyek létrehozzák a komplementer DNS szálát az egymást követő nukleotidok kovalens összekapcsolásával.
- **Puffer:** Biztosítja a polimeráz enzim optimális működéséhez szükséges körülményeket, azaz a megfelelő pH-t és ionokat (pl. Mg^{2+} , K^{+}) [28,29].

A PCR az alábbi lépésekből áll:

1. **Denaturálás:** Ez a reakció kezdeti szakasza, mely során a reakcióelegyet felmelegítjük a denaturálási hőmérsékletre (92-98°C, ~0,5-1 perc). Hő hatására a DNS kettős hélixét összetartó hidrogénhid kötések felszakadnak, így a kétszálú láncok szétválnak. A keletkező DNS szálak a további lépések templátjaiként szolgálnak.
2. **Anelláció:** A denaturálást követően a reakcióelegyet lehűtjük a primerek tapadási hőmérsékletére (55-65°C-ra, ~0,5-1 percig), hogy azok a bázispárosodás alapján megtapadjanak a komplementer templát szakaszon.
3. **Elongáció vagy lánchosszabbítás:** A primerek megtapadásával létrejött kétszálú DNS szakaszhoz kapcsolódik a polimeráz enzim, majd a primerek 3' végétől kezdődően 5' - 3' irányban létrehozza a komplementer szálakat (70-96 °C, ~1 perc).
4. **Ismétlés:** A lánchosszabbítás után a folyamat a denaturációtól újratekődik. Ez a ciklus 20-30-szor ismétljük meg, a kívánt termék mennyisége exponenciálisan nő az egyes ciklusok alatt (5. ábra).



2. ábra: A PCR termék mennyiségének exponenciális növekedése: Az első ciklusban ún. félszálak keletkeznek, melyek 5' végét valamelyik primer határozza meg, míg 3' irányba a láncok tetszőleges hosszúságban szintetizálódnak, míg az elongáció tart. A következő ciklusban a megfelelő hosszúságú félegyeneseiken megtapad a másik primer, így már csak a primerek közti DNS szakasz fog szintetizálódni, ami a reakció célterméke [28].

5. Befejező lánchosszabbítás: Az elongáció hőmérsékletén hosszabb ideig (~10 percig) tartó inkubáció, mely lehetővé teszi minden folyamatban levő szintézis lezárulását [28,29].

5.2.3 Nukleáz enzimek

A nukleázok olyan enzimek, melyek katalizálják a nukleinsavak nukleotidokká, oligonukleotidokká való degradációját. Csoportosíthatjuk őket az alapján, hogy a nukleinsav mely részén hasítanak, így megkülönböztetünk exo- és endonukleázokat. Az exonukleázok a lánc két végéről, míg az endonukleázok a láncon belül képesek elhasítani az foszfodiészter kötések. Az enzimek vágási helye lehet aspecifikus, amikor a szál bármely pontján képesek hasítani, vagy specifikus (restrikciós endonukleázok), azaz csak egy adott szekvenciánál hasítanak. Az enzimek ún. tompa végeket (blunt end), illetve ragadós végeket (sticky end) alakíthatnak ki a szálak végein. A különbség, hogy a ragadós végeknél az egyik szálon egy rövid túlnyúló szakasz jön létre, míg tompa végek esetén mindkét szál egy adott bázispárnál, ollószerűen hasítják [28].

5.2.4 Ligálás

A ligálás a rekombináns DNS létrehozásának utolsó lépése, melynek során a ligáz enzim kovalens kötéssel összekapcsolja az egyik DNS molekula 5' végén lévő foszfátcsoportot egy másik molekula 3' végének hidroxilcsoportjával. A kötés kialakításához biztosítanunk kell az enzimnek az energiaforrást (ATP-t vagy NAD^+ -t) [27, 29].

5.2.5 Kompetens sejtek

Azokat a sejteket, melyek képesek a környezetükből DNS-t felvenni, kompetens sejteknek nevezzük. Ehhez a sejtek kompetenssé tehetők, azaz sejtmembránjuk átjárhatóvá válhat a DNS számára.

Kétféle kompetens sejtet különböztetünk meg, az elektrokompetens és a kémiai kompetens sejteket. Az elektrokompetens baktériumok esetén a transzformáció elektroporálással, azaz rövid idejű, nagyfeszültségű árammal történik. A kémiai kompetens baktériumok létrehozásához a sejteket Ca^{2+} -, illetve Mg^{2+} -ionokat tartalmazó jéghideg oldatokkal mossuk egymás után, így a mikrobák kompetenssé válnak, sőt a baktériumok sejtfalához kötődő Ca^{2+} -ionok a transzformálás során magukhoz vonzzák a negatív töltésű DNS-t, így az nagyobb valószínűséggel bejut a sejtekbe. Ezeket a baktériumokat (pl. *E. coli*) hősokkal transzformáljuk [28,29].

5.2.6 Transzformálás

A transzformálás a DNS baktériumokba való bejuttatását jelenti. Két fajtáját különböztetjük meg, a hősokkal való transzformációt és az elektroporációt.

Hősokk esetén a kompetens sejtekhez adjuk a vizsgálandó DNS-t, majd hagyjuk, hogy diffúzióval elkeveredjenek egymással, valamint a negatív töltésű DNS-molekulák a pozitív ionokkal kezelt sejtek felszínéhez asszociálódjanak. Ezt követően rövid időre hősokknak vetjük alá a baktériumokat, emiatt a sejtfalukba lévő pórusok kitágulnak, így a DNS molekula diffúzióval bejut a sejtekbe. Ez után a mikrobákat ismét jégen hűtjük, hogy a pórusok összehúzódjanak. A sejteket regeneráljuk, hogy elkezdődjön a bejuttatott DNS-ben kódolt

fehérjék (pl. az antibiotikum rezisztenciáért felelős proteinek) expressziója. A tenyészetet végül tápmezre szélesztjük, hogy a baktériumok elszaporodjanak [29].

5.3 Bakteriális expresszió

A rekombináns fehérjék előállításához általában a baktériumokat használunk, melyek segítségével gyorsan, olcsón nagy mennyiségű proteint tudunk termeltetni.

Az egyik gyakran használt organizmus a Gram-negatív *Escherichia coli* (*E. coli*). Nagy előnye, hogy a legtöbb vektorrendszerrel használható, gyorsan osztódik, így olcsón és egyszerűen fenntartható. Genomja teljesen ismert, aminek köszönhetően a génmérnökség segítségével a törzs számos változatát hozták már létre, amelyek a proteinek hatékonyabb termeltetését teszik lehetővé. A biotechnológiában, a kutatások során, valamint a proteinek expressziójához főként az *E. coli* BL21(DE3) vagy K12 altörzseket használjuk.

A fehérjék termeltetéséhez a baktériumtenyészetet a középső log fázisig ($OD_{600}=0,6-0,8$) tenyésztjük, ekkor a kultúra készen áll az indukcióra. Ekkor megfelelő mennyiségű induktort adunk a tenyészethez (általában IPTG-t), majd folytatjuk a sejtek tenyésztését a fehérjetermeléshez szükséges ideig az optimális hőmérsékleten [29].

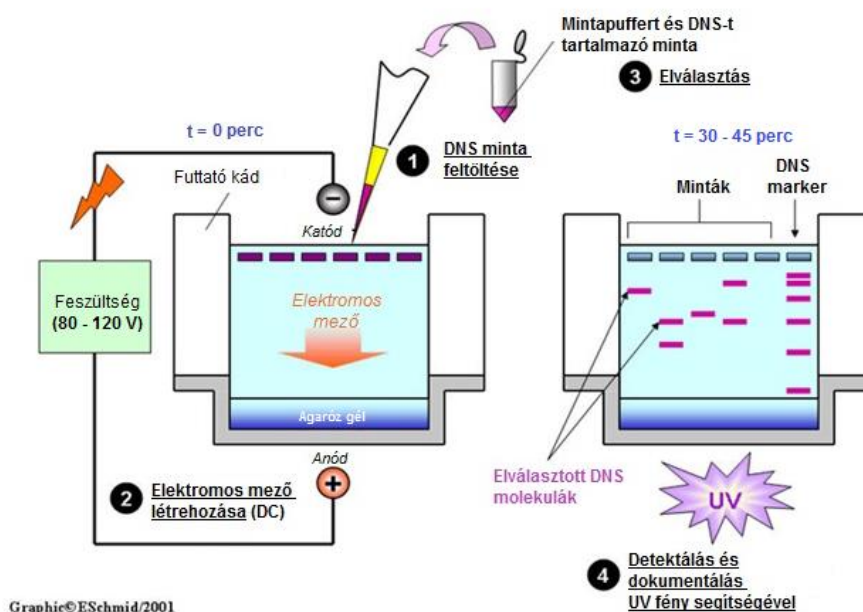
5.4 Gélelektroforézis

A gélelektroforézis az egyik leggyakrabban alkalmazott elválasztási módszer a molekuláris biológiában. Segítségével a töltéssel rendelkező biológiai makromolekulákat, például fehérjéket, nukleinsavakat tudjuk elválasztani méret, alak vagy töltés alapján. Lényege, hogy agarózból vagy akrilamidból térhálós szerkezetű gél készítünk, amiben megtörténik a molekulák elválasztása a beállított áramerősség vagy feszültség hatására [24,26].

5.4.1 Agaróz gélelektroforézis

Az elektroforézis e típusát általában nukleinsavak méretszerinti (néhány 10 bp-tól több 10 kbp-ig) elválasztására használjuk. A szeparáláshoz használt gél alapanyaga az agaróz, ami az agar-agar egyik alkotója, amit elválasztandó molekulák méretétől függően 0,7-4 %-ban (w/v) alkalmazunk.

A gél elkészítéséhez a por alapú agarózt TAE (Tris -Acetát-EDTA) vagy TEB (Tris-EDTA- Bórsav) pufferben forrásig melegítjük, aminek hatására az agaróz hidrolizálódik, így az oldat lehűlésével kialakul a másodrendű kötésekkel összetartott térhálós szerkezet. A meleg oldatba interkaláló fluoreszcens festéket keverünk, ami a nukleinsavak detektálását teszi lehetővé. Az elválasztás horizontális irányban történik. A mintákat és a molekulalétrát felvisszük a horizontális gélre, majd feszültséget kapcsolunk a futtatókádra, így elkezdődik a negatív töltéssel rendelkező nukleinsavak vándorlása a gélben a katód felől az anód felé, miközben a molekulák méret és konformáció (alak) alapján elválnak egymástól (6. ábra) [24,25,28].



3. ábra: Az agaróz gélelektroforézis folyamata: A minták mellett ún. DNS markert, avagy molekula létrát is viszünk fel a gélre. Ez olyan ismert nagyságú és mennyiségű nukleinsav molekulákat tartalmazó oldat, amely segítségével megbecsülhetőek az elválasztott fragmentumok méretei [30].

A nagyobb méretű, relaxált cirkuláris, illetve lineáris DNS molekulák lassabban, míg a kisméretű, szuperhelikális molekulák gyorsabban képesek haladni a pórusokban [19]. A gél UV fénnel megvilágítva a DNS-hez specifikusan kötött fluoreszcens festék gerjesztődik, így az elválasztás eredménye egyértelműen detektálható és a szükséges fragmentumok akár izolálhatóak [24,25,26,28].

5.4.2 Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

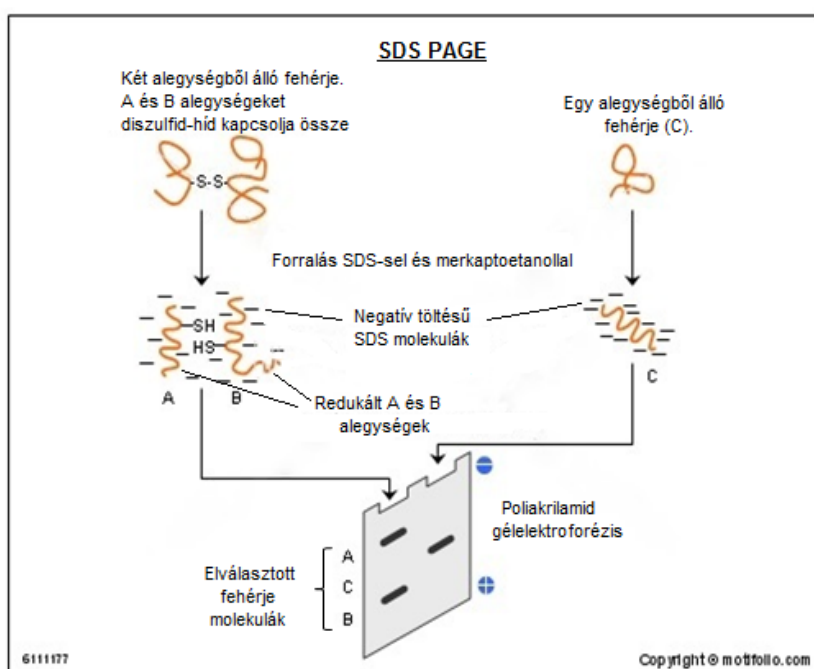
A poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE) általában a fehérjék méret, töltés vagy natív konformáció szerinti elválasztására használjuk. Az elnevezés azoknak az elektroforézis technikáknak a gyűjtőneve, melyek során az elválasztáshoz használt gél az akrilamid és a biszakrilamid polimerizációjának az eredménye. Ehhez a géleket akrilamid-bisakrilamid oldatból Tris-HCl pufferből és desztillált vízből készítjük, melyekhez a polimerizálásért felelős TEMED-et (tetrametilén-diamin), valamint APS-t (ammónium-perszulfát) adunk. Az APS vizes közegben spontán elbomlik, így szabad gyökök keletkeznek, amik katalizálják a TEMED elbomlását. A TEMED bomlásakor létező szabadgyökök pedig képesek elindítani az akrilamid és a bisakrilamid polimerizációját (iniciáció). A polimerizáció során a bisakrilamid keresztkötéseket alakít ki az akrilamid láncok között és azokon belül, ami a pórusok kialakulásához vezet.

A PAGE esetén az elválasztás vertikálisan történik egy vékony (0,75-1 mm) kétfázisú gélben. Az elválasztás a kisebb pórusméretű alsó fázisban (7,5-20% akrilamid koncentráció), a szeparáló/futtató gélben történik. A felső tömörítő/koncentráló gél a fehérjéket a két fázis felületén koncentrálja, így azok lényegében egyszerre lépnek be a szeparáló gélbe. Ebből a célból nagyobb pórusmérettel rendelkezik, akrilamid koncentrációja 4-5%. A kétfázisú gélhez először a szeparáló/ futtató gél készíttük el, majd megdermedése után erre polimerizáltatjuk a tömörítő/ koncentráló gél, amiben a minták felviteléhez szükséges zsebeket találjuk [28]. A szeparálást követően az eredményt a gél megfestésével vagy blottolással (antitestekkel való specifikus kimutatási eljárás) detektálhatjuk [24,25,28,29].

5.4.2.1 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS PAGE)

A poliakrilamid gélelektroforézisnek többféle változatát is kifejlesztették, melyek különböző célokra alkalmasak. A fehérjék méret szerinti elválasztására az SDS-poliakrilamid gél elektroforézist (SDS PAGE) használjuk.

Ennél a módszernél a gél készítéséhez és az elválasztáshoz használt pufferekhez nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) adunk, valamint a mintákat β -merkaptóetanol és SDS tartalmú mintapufferrel forraljuk. Az SDS egy detergens, ami a fehérjék hidrofób aminosavaihoz kötődik, és negatív töltéssel ruhazza fel az egyes molekulákat. A mintapufferben található merkaptóetanol egy redukálószer, ami képes redukálni a fehérjéken belüli, illetve a fehérjék közti diszulfid hidakat. Ezeknek köszönhetően a proteinek elveszítik natív szerkezetüket (denaturálódnak), így egységes alakot vesznek fel, és kizárólag a méretük alapján válnak el egymástól (7. ábra) [24,26,28].



4. ábra: Az SDS PAGE: Az ábrán látható az SDS és a merkaptóetanol denaturáló hatása, illetve a fehérjék elválasztása az akrilamid gélben [31].

5.4.2.2 Kapilláris gélelektroforézis (CE)

A kapilláris elektroforézist (CE) többek közt a nukleinsavak szekvenálásánál és glikánok vizsgálatához alkalmazzák. Az elektroforézis ezen típusánál az elválasztás nem vertikálisan vagy horizontálisan, hanem egy vékony kapillárisban történik, amiben egyidőben csupán egyetlen minta vizsgálata lehetséges. A molekulák szeparálása többféle módon történhet, például a fent említett elektroforézis technikákhoz hasonlóan a kapilláris is tartalmazhat gélmátrixot, ekkor kapilláris gélelektroforézisről beszélünk. Ezzel a technikával a különböző nagyságú és töltésű a molekulákat tudjuk hatékonyan, nagy felbontásban elválasztani, így például a nukleinsavak szekvenálásakor alkalmazzuk, hiszen az egy nukleotidnyi különbségű molekulákat is képesek vagyunk a segítségével szeparálni. Az elválasztás detektálása detektorral történik (pl. fluoreszcens, fénydetektor) [29].

5.4.3 Affinitás kromatográfia

A kromatográfia a molekulák minőségi és mennyiségi meghatározásának egyik módszere, mely az anyagok eltérő fizikai és kémiai tulajdonságán alapul. Elve, hogy az egyes komponensek különböző módon oszlanak meg egy álló és egy mozgó fázis között, így elválnak egymástól. A szeparációt a fázisok és a molekulák kölcsönhatása határozza meg [26,28].

A biológiában elterjedt változata az affinitás kromatográfia, mely a fehérjék elválasztásának egyik specifikus módszere. Lényege, hogy a mátrixhoz (állófázishoz) egy olyan anyagot rögzítünk, amely szelektíven megköti a tisztítandó fehérjét. Ilyen lehet például valamilyen antitest vagy enzimek esetén azok szubsztrátja, de akár olyan molekula is, ami a fehérjéhez fuzionált ún. „címék” (His-, GST-, MBP-tag) képes reverzibilisen megkötni. Az állófázison megkötött fehérjék eluálása általában az ionerősség, pH változtatásával, vagy kompetíció alapján (a proteint egy, a mátrixhoz jobban kötődő komponenssel választjuk le) történhet.

A rekombináns fehérjéket gyakran ún. címkékhez kapcsolják, melyek segítik a proteinek szelektív tisztítását. Ezek közül az egyik legelterjedtebb a 6-10 hisztidin aminosavból álló His-tag, ami a molekula valamely terminális végén található. Az elválasztás során a hisztidin aminosavak reverzibilis módon, nagy affinitással kötődnek a Ni^{2+} -ionhoz, mivel az egy-egy

koordinációs kötést alakít ki egy-egy hisztidin aminosav oldalláncának az imidazol gyűrűjével. Az így megkötött fehérje elúciója általában a kompetíció elvén alapszik, melyhez az oszlopot imidazol tartalmú (50-500 mM) pufferrel mossuk [28,29].

5.4.4 Dialízis

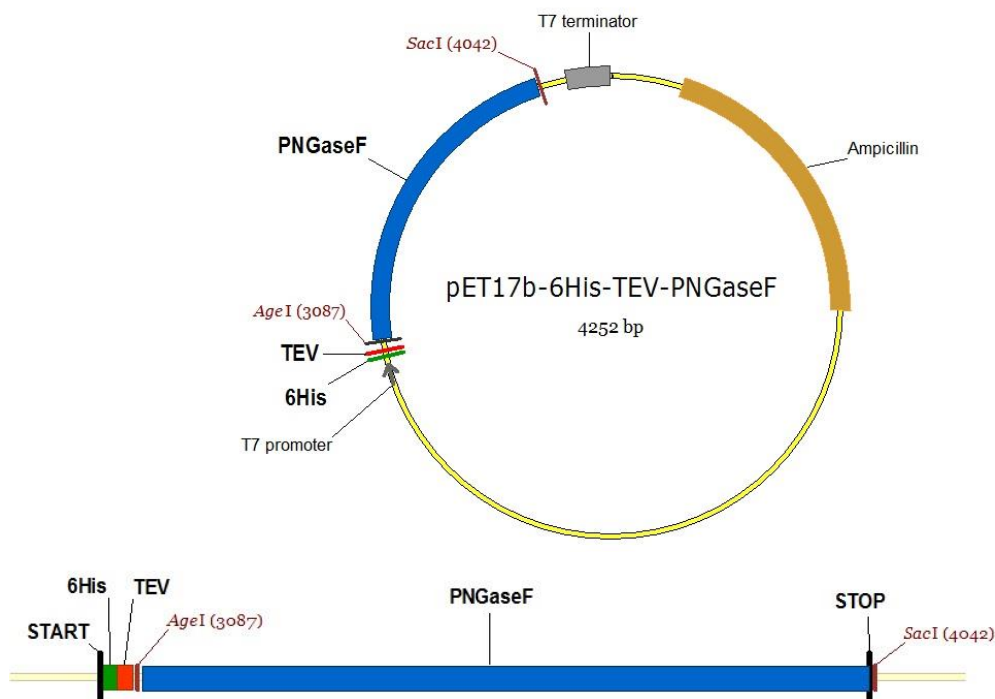
A dialízis a fehérjék (és más makromolekulák) kisméretű szennyezőktől, ionoktól való elválasztásának egyik módja. Lényege, hogy a fehérjét egy adott pórusméretű membránból készült dialízis zsákba, zacskóba töltjük, amit ezután az eltávolítandó komponenst nem tartalmazó pufferbe vagy oldatba helyezünk. Ekkor a koncentrációkülönbség hatására az eltávolítandó komponensek a dialízis oldatba diffundálnak, míg az egyensúly beáll a membrán két oldala közt. Ezt a módszert gyakran alkalmazzuk az oldatok sókoncentrációjának csökkentésére vagy a fehérjék renaturálásakor a denaturálószer eltávolításához [28].

6 Az elvégzett kísérletek és azok eredményeinek kiértékelése

6.1 A 6His-TEV-PNGase F gén és fehérje felépítése, létrehozása

Munkám célja egy olyan PNGase F enzim nagy mennyiségben és tisztaságban való előállítása volt, amely szilárd hordozóra rögzíthető, miközben megőrzi enzimaktivitását. Ehhez megterveztem a 6His-TEV-PNGase F fehérje génjét, melyből a protein bakteriálisan termeltethető, majd Ni^{2+} -affinitás kromatográfiával tisztítható. A fehérje az alábbi részekből épül fel (8.ábra):

- 6His: 6 hisztidin aminosavból álló címke, ami lehetővé teszi a fehérje affinitás kromatográfiával történő tisztítását a sejtlizátumból, illetve biztosítja a fehérje megfelelő felületre vagy hordozóhoz való rögzítését.
- TEV: A TEV proteáz enzim vágóhelyének szekvenciáját jelöli, amely segítségével szükség esetén eltávolítható a 6His címke a fehérjéről.
- PNGaseF: A peptid-N-glikozidáz PNGase F enzim szekvenciáját jelöli.



5. ábra: A pET17b-6His-TEV-PNGase F plazmid és a 6His-TEV-PNGase F gén felépítésének sematikus rajza

6.1.1 A pET17b-6His-TEV-PNGaseF plazmid létrehozása

A célfehérjét kódoló DNS konstrukció összeállításához a PNGase F génjét be kellett építenem egy pET17b vektorba, a benne kódolt N-terminális 6His affinitás címkét és TEV proteáz vágóhelyét kódoló szekvencia után (8. ábra), egy másik gén helyére. A klónozáshoz polimeráz láncreakcióval felsokszoroztam a PNGase F gént egy olyan templát plazmidról, mely az enzim szekvenciáját hordozta. A reakcióhoz szükséges primereket 5'-3' irányban terveztem és szintetizáltattam meg:

- PNGaseF AgeI fw primer:

5'- ACATACCGGTGCTCCGGCAGATAATACCGTAAATATTAAAACATTTCG- 3'

- PNGaseF SacI rev primer:

5'- TACAGAGCTCTTAGTTTTGTAACCTACCGGAGCACTAATAGGTGTATTAC- 3'

Az aláhúzott ACCGGT és GAGCTC szegmensek a klónozáshoz használt AgeI és SacI restrikciós endonukleázok vágóhelyeinek szekvenciái, melyek a PNGase F gén plazmidba építéséhez szükségesek. A dőlt betűvel jelzett ACAT és TACA bázisok a vágóhelyek szálon belüli, „endo” helyzetének kialakításához szükségesek, mivel ezek hiányában az endonukleázok nem képesek elvágni a DNS szálakat. A további nukleotidok a PNGase F génhez tapadó, annak megfelelő szálával komplementer szekvenciákat jelentik.

6.1.2 A PNGase F gén felsokszorozása PCR reakcióval

A primereket liofilizált formában kaptam meg, így először 100 µM törzsoldatokat készítettem belőlük SDV-zel, majd ezek kis térfogatát 10 µM oldattá hígítottam a PCR-hez.

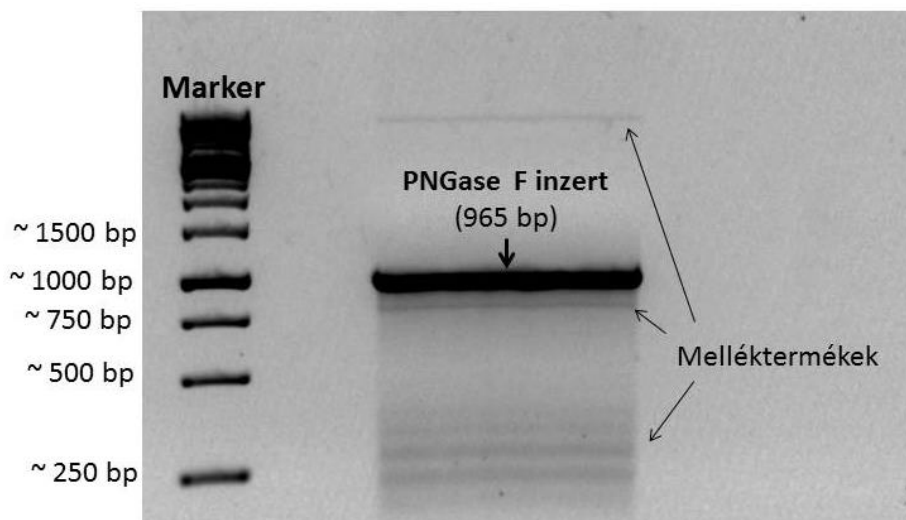
A reakcióhoz az alábbi elegyet állítottam össze:

- 36 µl SDV
- 5 µl 10x Pfu Buffer
- 5 µl 2mM each dNTP mix
- 1 µl 10xhíg (Viogene Mini Plus Plasmid DNA Extraction System-mel tisztított) pGEX-3x-PNGase F, templát plazmid
- 1 µl 10 µM PNGase F AgeI fw primer
- 1 µl 10 µM PNGase F SacI rev primer
- 1 µl Pfu Ultra HF polimeráz enzim (2,5 U/µl)

A reakcióhoz használt program a következő volt:

	Lépés	Hőmérséklet	Idő
1.	Iniciáció	95 °C	2 perc
2.	Denaturálás	95 °C	30 másodperc
3.	Anellálás	54,8 °C	30 másodperc
4.	Polimerizáció	72 °C	1 perc
5.	Ismétlés	2-4. Lépés ismétlése még 24-szer	
6.	Végső polimerizáció	72 °C	10 perc
7.	Reakció vége	4 °C	16 óra

A reakcióelegyet 1%-os agaróz gélen futtattam meg 100 V feszültséget alkalmazva, hogy a szintetizált PNGase F inzeret (PCR terméket) elválasszam a reakcióelegy többi komponensétől, mint az enzimtől, a megmaradt nukleotidoktól, puffertől.



6. ábra: A PNGase F gén PCR reakciójának gélképe

A 9. ábrán jól látható, hogy a PCR során nagy mennyiségű PNGase F inzeret képződött (965 bp), amit izoláltam a gélből.

6.1.3 A pET17b vektor és a PNGase F PCR inzeret restrikciós emésztése

A PNGase F gén plazmidba építéséhez a vektort és az inzeret ugyanazon restrikciós enzimekkel emésztettem meg, hogy azok komplementer ragadós végein keresztül a ligáz enzim segítségével összeépülhessenek. A klónozás során az AgeI és SacI restrikciós endonukleázokat használtam, és az alábbi emésztési elegyeket állítottam össze:

PNGase F inzeret

- 1 µl 10x CutSmart puffer
- 8 µl PNGase F PCR termék
- 0,5 µl AgeI HF enzim (20 000 U/ml)
- 0,5 µl SacI HF enzim (20 000 U/ml)

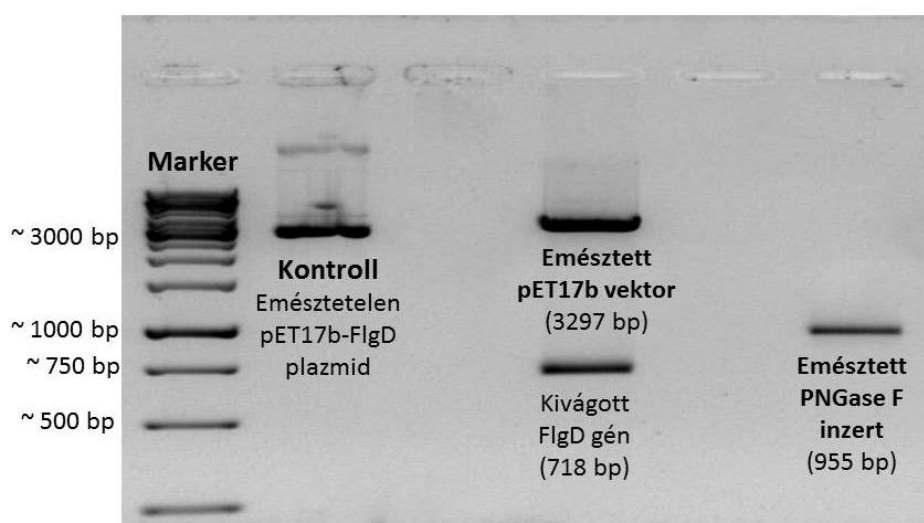
Vektor (pET17b-FlgD) plazmid

- 1,5 µl 10x CutSmart puffer
- 12,5 µl pET17b-FlgD plazmid
- 0,5 µl AgeI HF enzim (20 000U/ ml)
- 0,5 µl SacI HF enzim (20 000 U/m)

Negatív kontrollként, hogy ellenőrizsem a plazmid emésztését, összeállítottam egy olyan oldatot is, mely az alábbi összetevőket tartalmazta:

- 1 μ l 10x CutSmart puffer
- 1 μ l SDV
- 8 μ l vektor (pET17b-FlgD plazmid)

A DNS-ek enzimatisz emésztése 37 °C-on 1 órán keresztül tartott. Ezt követően az oldatokban lévő emésztett PNGase F inzertet és vektort 1,2%-os agaróz gélen választottam el a többi nukleinsavtól, illetve a nem emésztődött plazmidoktól (10. ábra).



7. ábra: A pET17b vektor és PNGase F gén emésztésének gélképe

A 10. ábrán az enzimatisz emésztés gélképe látható. A vektor esetén megfigyelhető, hogy az enzimek sikeresen kivágták a plazmidból az FlgD fehérjét kódoló ~718 bp-nyi gént, melynek helyére kell a PNGase F gént beépíteni. Az emésztett plazmidot és gént izoláltam az agaróz gélből.

6.1.4 Az emésztett pET17b vektor és PNGase F inzert összeépítése, ligálása

Az emésztett, ragadós, komplementer végű nukleinsavakat a T4 ligáz segítségével egyesítettem. Ehhez a következő oldatot állítottam össze:

- 2 µl 5x Rapid Buffer
- 6 µl emésztett PNGase F inzer
- 1 µl emésztett pET17b vektor
- 1 µl T4 ligáz enzim (500 U)

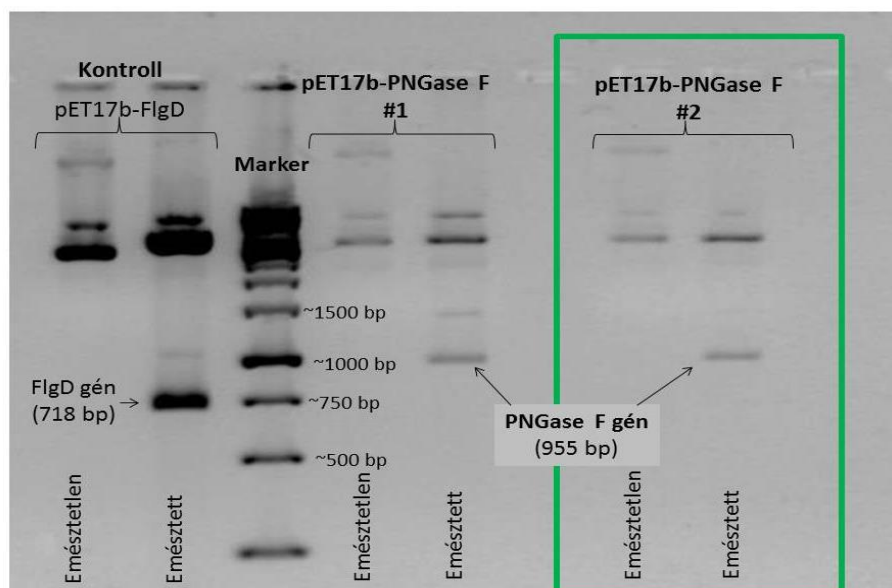
A ligálás 22 °C-on 10 percig tartott. Az így kapott, különböző nukleinsavakat tartalmazó oldattal 50 µl-nyi kompetens *E. coli TOP10* sejtet transzformáltam. A regenerált sejteket egy LB/Amp lemezre szélesztettem, amit aztán egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam.

6.1.5 A pET17b-6His-TEV-PNGase F plazmid ellenőrzése

A transzformált sejtek táplemezén számos egyedi kolóniát kaptam. Mivel a ligálási elegyben a szükséges plazmidon kívül más melléktermékek is keletkezhetnek (pl. több inzer is beépülhet egy plazmidba), ellenőriznem kellett, hogy a kiválasztott kolóniákból izolált plazmidok közül melyik tartalmazta az általam összeállítani kívánt konstrukciót. Ennek igazolásához leoltottam a lemezről 2 kolóniát 12 ml LB/AMP tápoldatba (tenyésztés: 37°C, ON, rázatás mellett). A felnőtt tenyészetekből 1-1 glicerines törzset készítettem, a megmaradó mennyiségekből pedig kitisztítottam a plazmidokat. A nukleinsavak jóságát a génsébeszet során használt AgeI, SacI restrikciós enzimekkel vizsgáltam. Kontrollként a konstrukció létrehozásához használt pET17b-6His-FlgD plazmidból is készítettem mintákat. Az ellenőrző restrikciós emésztéshez a következő oldatokat mértem össze:

Emésztetlen minták (koncentráció ellenőrzéshez és kontrollnak)	Emésztett minták (a plazmidok jóságának ellenőrzéséhez)
• 1 µl 10x CutSmart puffer • 2 µl plazmid • 7 µl SDV	• 1 µl 10x CutSmart puffer • 4 µl plazmid • 4,4 µl SDV • 0,3 µl AgeI HF enzim • 0,3 µl SacI HF enzim

Az emésztési elegyeket 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, majd 1%-os agaróz gélen választottam el (11. ábra).



8. ábra: A létrehozott plazmidok jóságának ellenőrzése 1%-os agaróz gélen

A 11. ábrán látható az ellenőrző emésztés eredménye. Az enzimek sikeresen kihalásították az FlgD és PNGase F gént a plazmidokból. A kontrollhoz viszonyítva megfigyelhető, hogy a génszűrés sikeres volt, a plazmidok a PNGase F enzim génjét tartalmazzák. A további munkámhoz a pET17b- 6His-TEV-PNGaseF #2 plazmidot választottam.

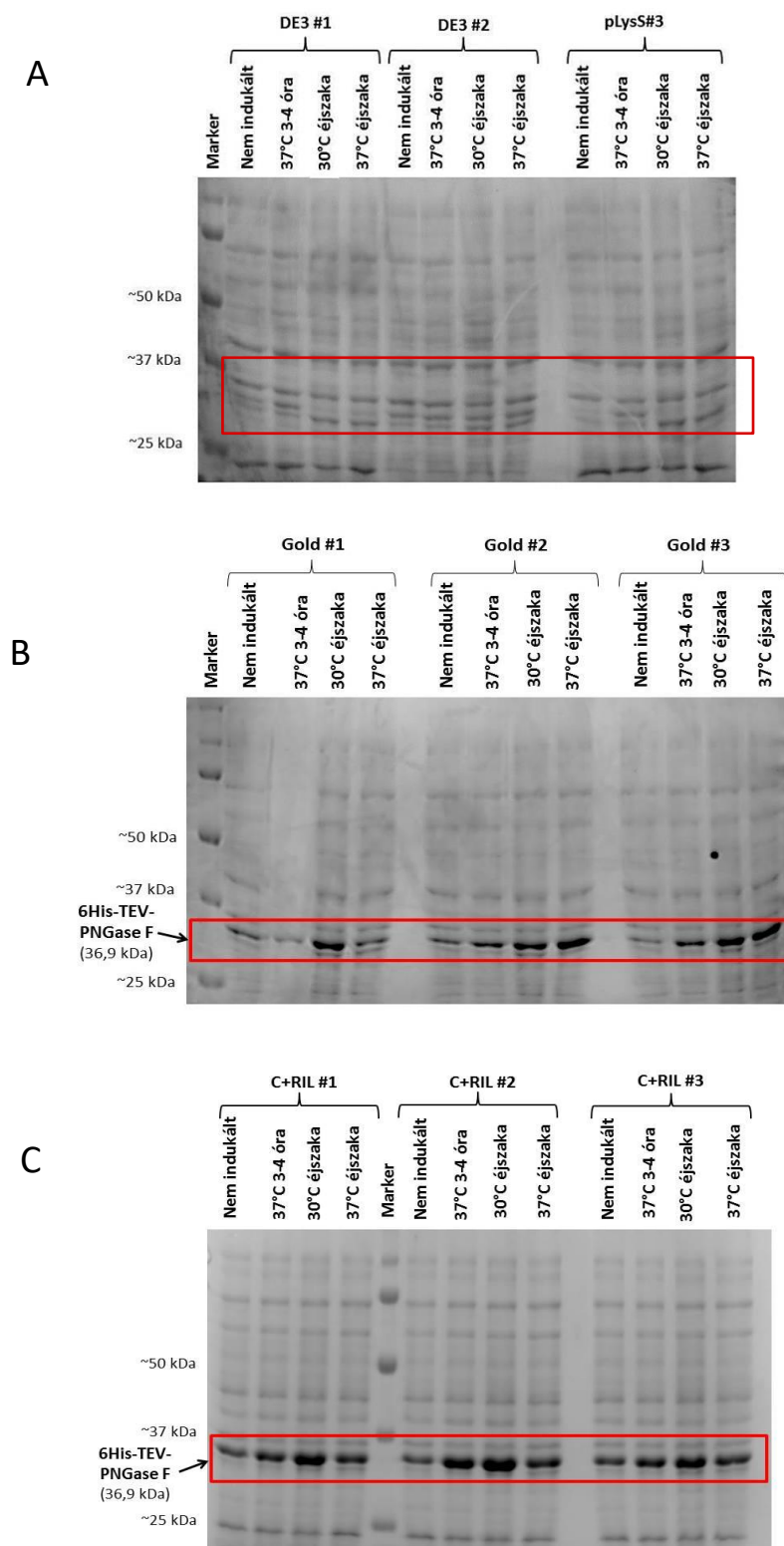
Mivel a génszűrés során mutációk is keletkezhetnek a nukleinsavak szekvenciájában, a plazmid szekvenciáját, különös tekintettel a PNGase enzim beépülési helyére szekvenáltatással is ellenőriztem. Az eredményként kapott szekvenciát az elméleti szekvenciával összehasonlítva az teljes egyezést mutatott, azaz sikeresen létrehoztam a pET17b-6His-TEV-PNGase F konstrukciót.

6.2 A 6His-TEV-PNGase F enzim expressziója *E.coli* BL21 törzsekben

A génkonstrukció létrehozása után a célom a fehérjetermeltes körülményeinek optimalizálása volt. A laboratóriumunkban négyféle *E.coli* BL21 B törzs, a DE3, Gold(DE3), Codon Plus-RIL (C+RIL) és pLysS állt rendelkezésemre, amelyeket az enzim termeltetéséhez

használhattam. Első lépésként mindegyik törzsből 50 µl-nyi kompetens sejtet 0,5 µl pET17b-6His-TEV-PNGase F #2 plazmával transzformáltam. A sejteket regenerálás után 1-1 LB/Amp lemezre szélesztettem, majd ezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltam, így számos egyedi kolóniát kaptam.

Hogy megtudjam, melyik törzs milyen mértékben képes szabályozott körülmények között a PNGase F enzimet termelni, próbaindukciós kísérletet végeztem. A vizsgálatához mindegyik törzsből 3-3 kolóniát választottam, és leoltottam a *DE3* lemezről 2-2 ml LB/Amp, a *GOLD*-ról 2-2 ml LB/Amp/Tetr, a *C+RIL*-ről és a *pLysS*-ről 2-2 ml LB/Amp/Chl tápoldatba (Tenyésztés: ON, 37°C, rázatás mellett). A *DE3*-as tenyészetek közül 1 kultúra, a *pLysS*-ok közül 2 sajnos nem nőtt fel. A tenyészetekkel beoltottam 4,1 ml LB/Amp tápoldatot (0,5% v/v innokulum), majd folytattam a tenyésztést 37°C-on rázatás mellett körülbelül 3 órán át, így a sejtek mennyisége elérte a fehérjetermeltetés indukálásához szükséges 0,6-0,8-as 600 nm-en mérhető optikai denzitás értéket. Ezután a tenyészetekből 3x1 ml-eket pipettáztam steril tenyészcsővekbe, majd ezekhez 0,5 mM végkoncentrációban IPTG-t adtam. A tenyészetek közül 1-1 IPTG-s és a kontroll, indukálószer nem tartalmazó tenyészeteket tovább tenyésztettem (37°C-on, 3-4 óra rázatás mellett) a többit hűtőbe tettem, majd 1-1 csövet 37 °C-on a többit pedig 30 °C-on inkubáltam rázatás mellett egy éjszakán át. A tenyésztéseket követően a kultúrákból mintát vettem SDS-poliakrilamid gélre, majd elektroforézissel elválasztva a mintáimat megkaptam a kísérlet eredményét (12. ábra).



12. ábra: Az *E.coli* (A) DE3 és pLysS, (B) Gold és (C) C+RIL tenyészetek próbaindukciós vizsgálata 12%-os poliakrilamid gélen

A 12. A ábrán a DE3 és pLysS próbaindukciója során vett minták gélképe látható. A gélkép alapján megállapítható, hogy a vizsgált tenyészetek nem képesek jelentős

menyiségben a 6His-TEV-PNGase F enzim előállítására. A 12. B és C ábrán a *Gold* és *C+RIL* törzs kultúráiból vett próbaindukciós minták láthatók, melyek szerint mindegyik kolónia képes termelni a fehérjét. A *Gold#1* és a *C+RIL* kolóniák 30 °C-on, egy éjszakán át történő tenyésztés során képesek produkálni a legtöbb fehérjét, míg a *Gold#2* és *Gold#3* esetén a 37 °C-on egy éjszakán át való indukálás bizonyult hatékonyabbnak. Mivel ez utóbbi törzsek képesek a 6His-TEV-PNGase F előállítására, ezért a *DE3* és a *pLysS* esetén nem ismételt meg a kísérletet.

6.2.1 A 6His-TEV-PNGase F enzim termeltetése és tisztításának kísérlete

A sikeres próbaexpressziós kísérlet eredményére alapozva megpróbáltam fehérjét termelni és tisztítani nagyobb térfogatú baktérium kultúrából. Ehhez a *C+RIL#2* kolóniából növesztettem egy 3,5 ml-s előkultúrát (tenyésztés 37°C, ON, rázatás mellett). Ezt követően a tenyészettel beoltottam 500 ml/Amp/Chl tápoldatot (0,5% v/v innokulum). A sejteket tovább növesztettem 37 °C-on rázatás mellett, amíg az OD₆₀₀ érték elérte a ~0,6-ot, ami megfelelő a fehérjetermelítés indukálásához, majd 0,5 mM végkoncentrációjú IPTG-t adtam a kultúrához. A lombikot hűtőbe tettem, hogy az indukció a próbakísérlet alapján, egy éjszakán át 30 °C-on történjen.

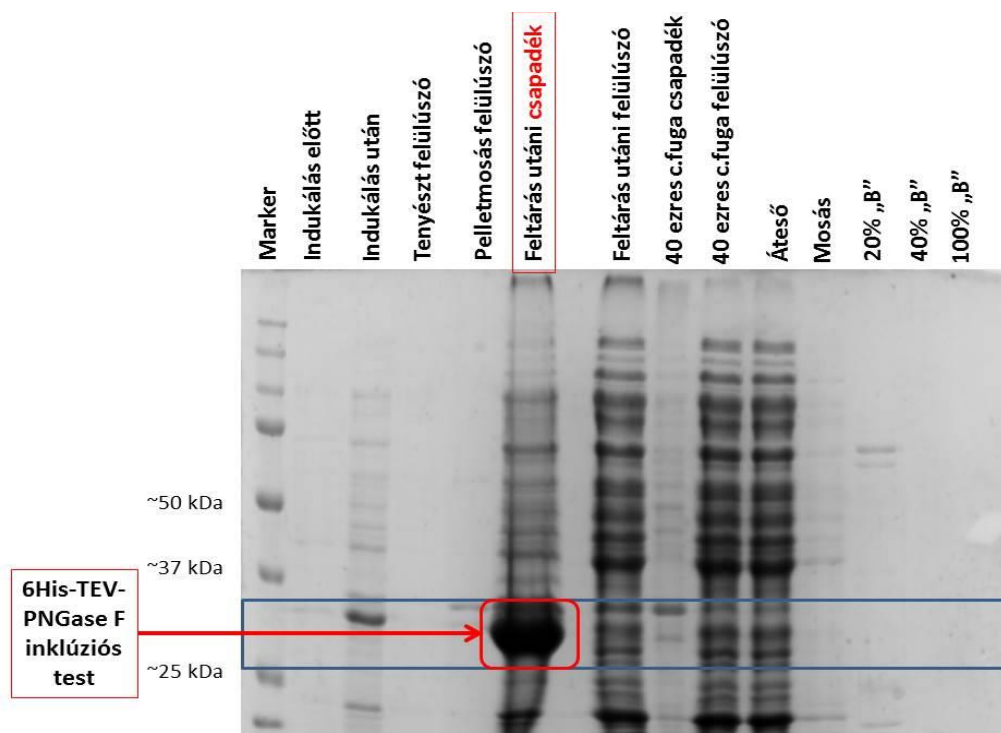
A tenyésztés során felszaporodott sejteket centrifugálással választottam el a tápoldatból (4500 rpm, 30 perc, 6 °C). Az így kapott sejtmentes felülúszót leöntöttem a baktérium csapadékról. A sejteket ezután 30 ml-nyi „A” (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH=7,4) pufferben felfuszpendáltam, majd újra centrifugáltam (8500 rpm-en 30 perc, 6 °C), hogy kimossam a sejtpelletben maradt tápoldatot. A felülúszó mentes csapadékot lefagyasztottam, így segítve a baktériumok feltárását. Ezt követően a pelletet 20 ml Rosche EDTA free proteázgátlót tartalmazó „A” pufferben szuszpendáltam fel, majd a szuszpenziót 1 órán át jégen hűtöttem, hogy a proteázgátló ki tudja fejteni a hatását. A sejteket ezután 2% (w/v) 0,5 mm átmérőjű üveggyöngy hozzáadása után ultrahanggal tártam fel. Ehhez 7-szer 1 percig szonikáltam a sejteket 7W teljesítménnyel, az egyes kezelések között 1 percig jégen hűtöttem az elegyet, így megelőzve az oldat felmelegedését, ami a fehérjék degradációjával, illetve a fokozódó Brown-mozgás miatt a szonikálás hatékonyságának csökkenésével járt volna.

A sejttörmelékeket, illetve a fel nem tárt sejteket centrifugálással választottam el a vízdoldható fehérjéket tartalmazó puffertől (8500 rpm, 30 perc, 6°C). A sejtízátumot ismét centrifugáltam (40000 rpm, 30 perc, 10°C), a felülúszót pipettával leszívtam, majd 0,45 µm pórusátmérőjű PES membránon szűrtem, így megkaptam azt a mintát, amit már felvihettem a Ni²⁺-affinitás oszlopra anélkül, hogy az oldatban lévő esetleges nagyobb részecskék blokkolnák az oszlopot. Az oldatot további felhasználásáig jégen tároltam.

Az affinitás kromatográfia során a GE Healthcare 5 ml-es HiTrap Chelating HP oszlopát használtam. Az elválasztáshoz először regeneráltam az oszlopot, azaz 5 CV (oszloptérfogat) MQ vízzel, majd 5 CV 50 mM EDTA-t tartalmazó „A” pufferrel mostam az oszlopot, így eltávolítva róla a kikötött Ni²⁺-ionokat és minden egyéb szennyeződést. Ezután újabb MQ vizes mosás következett, majd az oszlopra felvittem 3 ml 0,1 M NiSO₄ oldatot, így az oszloptöltetre újra felkötődtek a Ni²⁺-ionok. Végző lépésként 5 CV „A” pufferrel mostam át az oszlopot. Ezt követően felvittem a sejtízátumot. Az oszlopon átfolyt oldatot, mint „Áteső” frakciót gyűjtöttem. Az oszlopon fennmaradó szennyeződéseket, más fehérjéket 6 CV-nyi „A” pufferrel távolítottam el, majd következett az elúció:

1. 3 CV 80% „A” és 20% (v/v) „B” puffert tartalmazó oldattal („20% B” frakció)
2. 3 CV 60% „A” és 40% (v/v) „B” puffer összetételű oldattal („40 % B” frakció)
3. 5 CV „B” pufferes mosással („100% B” frakció) eluáltam a még oszlopon maradt fehérjéket

A tisztítás minden lépésénél mintákat vettem, majd ezek összetételét SDS PAGE-el vizsgáltam (13. ábra).



13. ábra: A C+RIL *E. coli* törzsben termeltetett 6His-TEV-PNGase F fehérje termeltetése és Ni^{2+} -affinitás oszlopon való tisztításának eredménye 12%-os SDS-poliakrilamid gélen

A 13. ábrán látható a sejtfeltárás és az enzim Ni^{2+} -affinitás kromatográfiás tisztításának gélképe. A gélen egyértelműen látható, hogy a fehérje a feltárást követő 8500 rpm-es centrifugálás csapadékában maradt, és az oszlopon egyáltalán nem kötődött ki a 6His-TEV-PNGaseF enzim. Ennek valószínűsíthető oka, hogy a fehérje aggregálódik a sejteken belül, így vízdíthatatlan inklúziós test, avagy zárványtest formájában van a citoplazmában. Ez a jelenség a ciszteint tartalmazó fehérjék esetén gyakran előfordul intenzív expresszió során. A nagy mennyiségben termelődő fehérje rosszul tekeredik fel, majd vízdíthatatlan zárványtestekké, aggregátumokká áll össze. Ez a jelenség PNGase F-nél sem meglepő, hiszen polipeptid lánc 6 ciszteint tartalmaz.

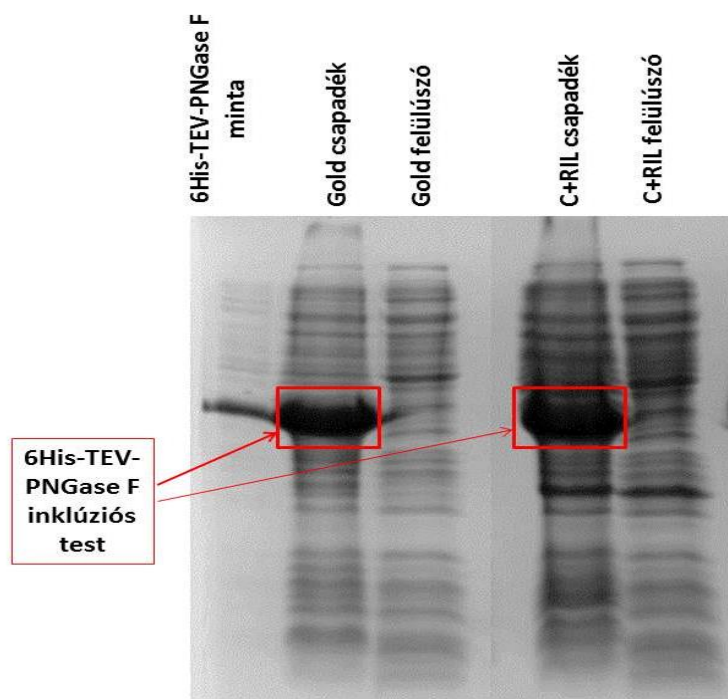
Az inklúziós testben lévő fehérjét az aggregátum denaturálásával, majd a denaturáló ágens eltávolításával a fehérje újbóli feltekeredésével, renaturálásával lehet újra funkcionális, vízdítható formába alakítani. Ez a módszer azonban nem mindig eredményez jól feltekeredett fehérjét, főleg a több ciszteint tartalmazó, illetve több doménből álló proteinek esetén, így ez valószínűleg PNGase F-re is igaz lehet, hiszen a benne lévő 6 cisztein aminosavnak köszönhetően a protein nagyon sok variációban alakíthat ki diszulfid hidakat. Emiatt az

inklúziós testből való fehérjetisztítást elvettem, helyette célravezetőbbnek találtam a fehérje termelését az oldható forma irányába eltolni az expresszió intenzitásának enyhítésével, például a tenyésztési hőmérséklet, idő, indukálószer mennyiségének csökkentésével.

6.2.2 A 6His-TEV-PNGase F oldhatóságának vizsgálata

A affinitás kromatográfiás tisztítás eredményéből látható, hogy a 6His-TEV-PNGase F enzim oldhatatlan formában halmozódik fel a *C+RIL* sejtekben. A 13. ábrán megfigyelhető, hogy a nem indukált sejtekben is van fehérje, ami arra utal, hogy a promóter nem szabályozza megfelelően a fehérje átíródását, így a protein indukálószer nélkül is termelődik kis mennyiségben. Ebben az esetben előfordulhat, hogy az így termelődő fehérje még oldott formában van a sejteken belül, ami megoldás lehet – bár kisebb mennyiségben – a megfelelően feltekeredett fehérje előállítására. Emellett még megvizsgáltam, hogy a *Gold* törzs milyen formában állítja elő a proteint.

A kísérletekhez egy-egy előkultúrával (*Gold*#3, *C+RIL*#3 kolóniákból) beoltottam 200-200 ml LB/Amp/Tetr és LB/Amp/Chl tápoldatokat. A *Gold* tenyészetet $OD_{600} = 0,78$ értéknél 0,5 mM IPTG-vel indukáltam, míg a *C+RIL*-t indukálás nélkül növesztettem még 3 órát 37 °C-on 255 rpm rázatással. A sejteket centrifugálással választottam le (4500 rpm, 30 perc, 6 °C), majd a baktérium csapadékokat lefagyasztottam. A pelleteket 5-5 ml proteázgátlót tartalmazó 20 mM NaH_2PO_4 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH= 6,3 pufferben vettem fel, majd hűtöttem 1 órát jégen. A szuszpenziókhoz 2% (w/v) üveggyöngyöt adtam, majd ultrahang segítségével feltártam a sejteket. A szonikálás során 30 másodpercig 7 W teljesítménnyel jégen tartam fel a sejteket, majd 1 percig jégen hűtöttem a csöveket. Ezt a *Gold* esetén 6-szor, a *C+RIL*-nél pedig 7-szer – a sejtpellet nagyobb mennyisége miatt – ismételt meg. Feltárás után a szuszpenziókat 40 ezer rpm-en 30 percig, 10°C-on centrifugáltam. Az így kapott oldott fehérjéket tartalmazó felülúszóból, illetve a csapadékokból mintát vettem és 15%-os SDS akrilamid gélen választottam el (14. ábra).



14. ábra: A *BL21 (DE3)* Gold és CodonPlus-RIL törzsekben termelődő 6His-TEV-PNGase F fehérje felhalmazódási formáját vizsgáló kísérlet eredménye SDS-poliakrilamid gélen

A gélen a *C+RIL* és *Gold* baktériumtörzs fehérjemintázata látható, amin megfigyelhető, hogy mindkét esetben a baktériumcsapadékban maradt a 6His-TEV-PNGase F enzim, míg a felülúszóban oldott fehérje nem detektálható számottevő mennyiségben. Az eddigi kísérleteim eredményei alapján kimondható, hogy a *Gold* és *C+RIL* baktériumtörzs feltehetően nem képes oldott állapotú 6His-TEV-PNGase F enzimet termelni, hanem a protein zárványtest formájában van jelen a sejtek citoplazmájában, amit nem lehet közvetlenül felhasználni.

Az eddigi tapasztalataim alapján úgy gondoltam, hogy valószínűleg a *DE3* és *pLysS* törzsek sem lennének képesek az enzimet aktív formában előállítani, ezért úgy döntöttem, inkább más, célravezetőbb megoldást keresek aktív PNGase F előállítására.

6.3 A 6His-TEV-PNGase F enzim termeltetése a *SHuffle* baktériumtörzsben

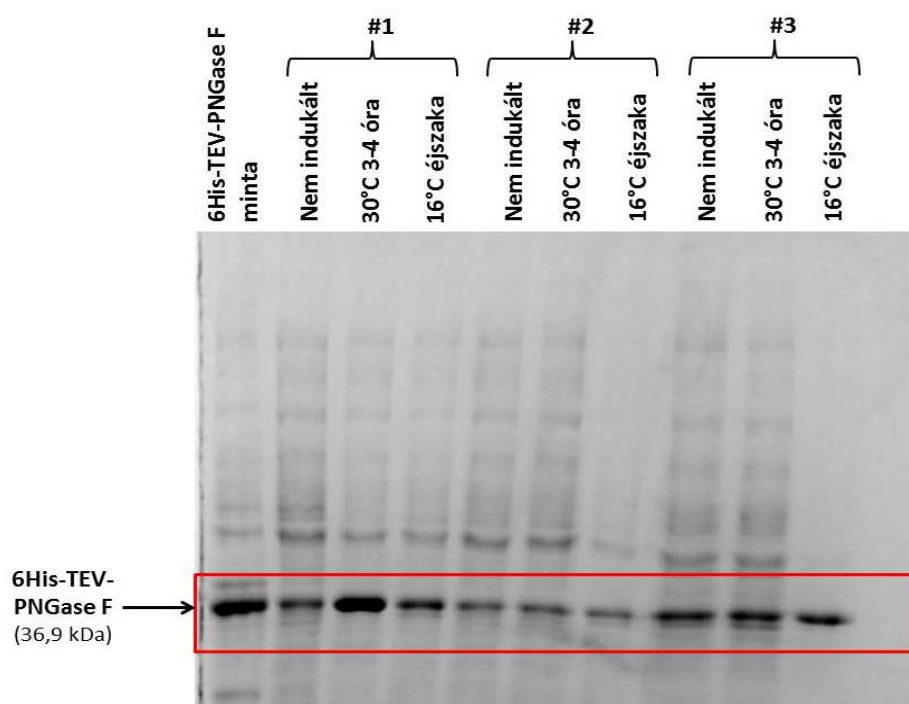
A több ciszteint tartalmazó fehérjék rekombináns termeltetése gyakran sikertelen, mivel ezek a proteinek aggregálódnak a sejtek citoplazmájában, azaz vízoldhatatlan inklúziós testeket, zárványokat alkotnak. Ezekből az aggregátumokból bonyolult funkcionális fehérjét létrehozni, így a gyakorlatban ezt a problémát többféleképpen próbálják orvosolni [29].

Az egyik lehetőség az expressziós körülmények optimalizálása, ami viszont gyakran sok alapanyag és idő befektetésével is csak kis mennyiségű funkcionális fehérjét eredményez. Emellett a proteint akár egy másik címkéhez is kapcsolhatjuk, mely növeli annak a citoplazmában való oldhatóságát, illetve segíti a helyes feltekeredését (pl. GST, MPB címkék). Ha egy fehérje helyes feltekeredéséhez diszulfid hidak kialakítására is szükség van, segíthet, ha azt a citoplazmánál oxidatívabb közeget biztosító periplazmában termeltetjük. Ebben az esetben a fehérjéhez egy szignál szekvenciát kapcsolunk, ami segítségével a fehérjék a sejtmembrán külső és belső membránja közti, ún. periplazmatikus térbe jutnak ki, ahol kedvezőbb a S-S hidak kialakulásának és így a helyes feltekeredés lehetősége. Harmadik esetben pedig használhatunk olyan génmérnökséggel létrehozott baktériumtörzseket vagy más organizmusokat, melyek képesek a cisztein tartalmú fehérjéket is oldott, funkcionális formában termelni, például a New England Biolabs által forgalmazott *E.coli* B altörzset, a *SHuffle*-t. Ez az organizmus a DsbC diszulfid izomeráz dajkafehérjét expresszálja, ami segíti a fehérjék jó feltekeredését a diszulfid-kötések megfelelő kialakításával, valamint kijavítja a már rosszul feltekeredett proteinek szerkezetét. Emellett a törzs deficiens a Lon és OmpT proteázokra nézve, így a termelt fehérjék nem bomlanak el a citoplazmában [32,33].

A munkám során együttműködő partnereink részére 6His címkével ellátott enzimet kellett előállítanom, hogy az későbbi felhasználása során ezáltal Ni^{2+} -affinitás felületre rögzíthető legyen, így nem állt módomban más – a helyes feltekeredést segítő – címkét használni. A periplazmatikus termeltetéshez szükséges eszközök sajnos nem álltak rendelkezésemre a laboratóriumban, ezért ezen a módon sem tudtam a PNGase F aggregálódását kiküszöbölni. Ráadásul a szakirodalomban több olyan közleményt találtam, melyekben az ezzel a stratégiával termeltetett PNGase F mennyisége meglehetősen csekély volt [13,20]. A laboratóriumunkban korábban már próbáltak diszulfid hidakat tartalmazó fehérjéket *SHuffle E.coli* törzsszel oldható formában előállítani és így ez rendelkezésre állt, megpróbáltam ezzel a 6His-TEV-PNGase F termeltetését.

6.3.1 A 6His-TEV-PNGase F próbatermeltetése *SHuffle* baktériumtörzsben

A kísérlet első lépéseként 0,5 µl pET17b-6His-TEV-PNGase F#2 plazmiddal transzformáltam 50 µl kompetens *SHuffle* sejtet. A baktériumokat regenerálás után egy LB/Amp lemezre szélesztettem, amit egy éjszakán át 30°C-on inkubáltam. A felnőtt kolóniák közül hármat leoltottam 2 ml LB/Amp tápoldatba (tenyésztés: 30°C-on, ON, rázás mellett). A felnőtt tenyészetekkel beoltottam 3,1 ml LB/Amp tápoldatokat (1% v/v innokulum). A sejteket 4 órán át 30 °C-on rázás mellett növesztettem, így elérték az indukáláshoz ideális optikai denzitást. A tenyészetekből 2x1 ml-eket pipettáztam steril tenyészcsövekbe, majd ezekhez 0,4 mM végkoncentrációban IPTG-t adtam. A nem indukált sejteket, illetve 1-1 IPTG-t tartalmazó kultúrát 250 rpm rázás mellett 30°C-on 3-4 órán át, míg a többi tenyészetet egy éjszakán át 16°C-on rázás mellett tenyésztettem tovább, így elősegítve az enzim termelését. A növesztéseket követően mintát vettem a kultúrákból, amiket 12%-os SDS-poliakrilamid gélen választottam el (15. ábra).



15. ábra: A 6His-TEV-PNGase F próbatermeltetése a *SHuffle* törzsben

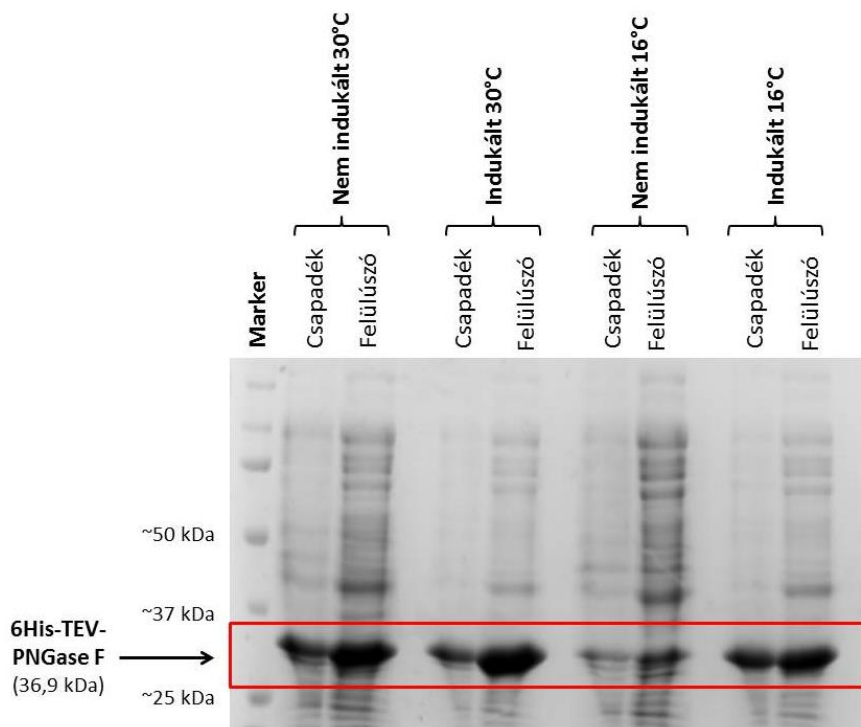
A 15. ábrán látható az enzim *SHuffle*-ben való próbaindukciójának eredménye. Megfigyelhető, hogy mindegyik tenyészet sikeresen termelte a fehérjét, a legjobbnak az #1

kolónia tűnik 30°C-os 3-4 órás indukálási körülmények között. Itt is megfigyelhető, hogy a promóter nem képes teljesen szabályozni a fehérje termelődését, ezért célszerűnek láttam megvizsgálni az indukált és a nem indukált tenyészet által produkált protein minőségét.

6.3.2 A 6His-TEV-PNGaseF fehérje formájának vizsgálata a *SHuffle* törzsben

A *SHuffle* által termelt fehérje tisztítása előtt meg akartam győződni arról, hogy az enzimet oldott formában képes előállítani a törzs. Ehhez a *SHuffle*-6His-TEV-PNGase F #1 tenyészetből származó glicerines törzsből leoltottam LB/Amp tápoldatba egy előkultúrát (tenyésztés: 30°C-on, ON, rázatás mellett). A reggelre felnőtt kultúrákkal továbboltottam 4-szer 200 ml LB/Amp tápoldatokat (0,5% innokulum). Folytattam a tenyésztést 30°C-on rázatás mellett, míg az egyik kultúra 600 nm-en mért optikai denzitása (OD₆₀₀) elérte a 0,62-es értéket. A tenyészetek közül kettőhöz 0,4 mM végkoncentrációban IPTG-t adtam, míg a másik kettőhöz nem. Ez utóbbiaknál az indukálószer nélkül termelődő fehérjét akartam megvizsgálni. Egy indukált és nem indukált kultúrát még 3-4 órát 30 °C-on rázatás mellett, míg a másik kettőt egy éjszakán át 16°C-on rázatás mellett növesztettem.

A tenyésztések után mintákat vettem gélre, majd a sejteket centrifugálással választottam el (8500 rpm, 30 perc, 6°C). Ezt követően a sejtsapadékokat lefagyasztottam. A pelleteket 5-5 ml proteázgátlót tartalmazó „C” (100 mM K₂HPO₄, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH=8,0) pufferben szuszpendáltam fel, majd egy óráig jégen inkubáltam. Ezután a sejteket szonikálással tártam fel **(6.2.1.fejezet)**, majd a szuszpenziókat 40 ezer rpm-en centrifugáltam le 10°C-on 30 perc alatt. A felülúszókból és pelletekből mintát vettem, majd összetételüket SDS PAGE-el vizsgáltam (16. ábra).



16. ábra: A *SHuffle* törzs által termelt 6His-TEV-PNGase F minőségi vizsgálatának eredménye

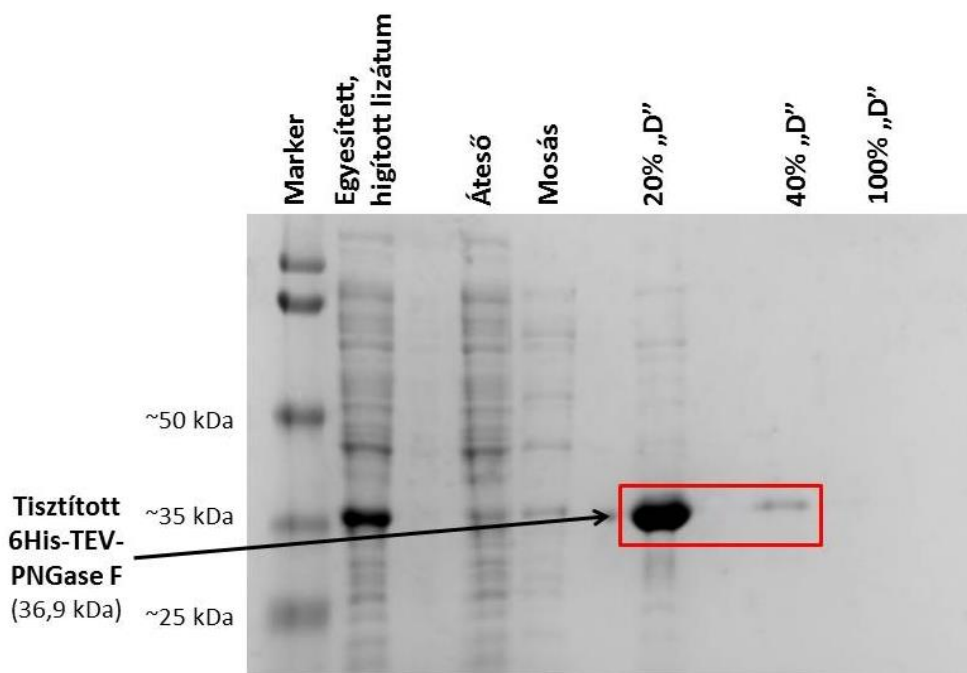
A 16. ábra alapján látható, hogy a *SHuffle* törzs képes nagy mennyiségben oldott formában termelni a 6His-TEV-PNGase F enzimet, így sikerült megoldanom a fehérje aggregációjának problémáját. A 16°C-on tenyésztett, nem indukált tenyészetén kívül a másik 3 esetén jelentős mennyiségű oldott enzim termelődik a sejtekben, ami valószínűleg jól feltekeredett, aktív formában van jelen a citoplazmában. Ez utóbbi oldatokhoz 50% (v/v) glicerint adtam, majd a sejtízátumokat lefagyasztottam a feldolgozásukig.

6.3.3 A 6His-TEV-PNGase F enzim tisztítása affinitás kromatográfiával:

Az enzim oldott formában való sikeres termeltetését követően kitisztítottam a fehérjét a lefagyasztott lizátumokból. Ehhez az oldatokat egyesítettem, majd körülbelül kétszeresére hígítottam „C” pufferrel, hogy csökkentsem a glicerinnel való viszkozitást. Az oldatot 0,45 µm-es fecskendőszűrőn átszűrtem, majd 45-50 ml-t felvittem az előkészített oszlopra (5.4.3. fejezet) („Áteső” frakció). Ezután 6 CV „C” pufferrel mostam az oszlopot („Mosás” frakció), majd eluáltam a fehérjét a következő gradienssel:

1. 3 CV 20% „D” – 80 % „C” oldattal („20% D” frakció)
2. 3 CV 40% „D” – 60% „C” pufferrel („60% D” frakció)
3. 3 CV 100% „D” pufferrel („100% D” frakció)

A frakciókból mintákat vettem, majd 12%-os SDS-poliakrilamid gélen választottam el a bennük lévő fehérjéket (17. ábra).



17. ábra: A 6His-TEV-PNGase F Ni^{2+} -affinitás kromatográfiás tisztításának eredménye

A 17. ábrán a tisztítás végeredménye látható. A gél alapján a „20% D” frakcióban nagy mennyiségű fehérjét sikerült tisztítanom, ezen kívül pedig még a „40% D” mintában volt jelen az enzim kis mennyiségben. A „20% D” enzim koncentrációját spektrofotométerrel mértem meg 280 nm hullámhosszúságon, majd a kapott értékből a Lambert-Beer törvény által határoztam meg a koncentrációt, ami alapján ~72 mg-nyi fehérjét sikerült tisztítanom 800 ml sejtenyészetből.

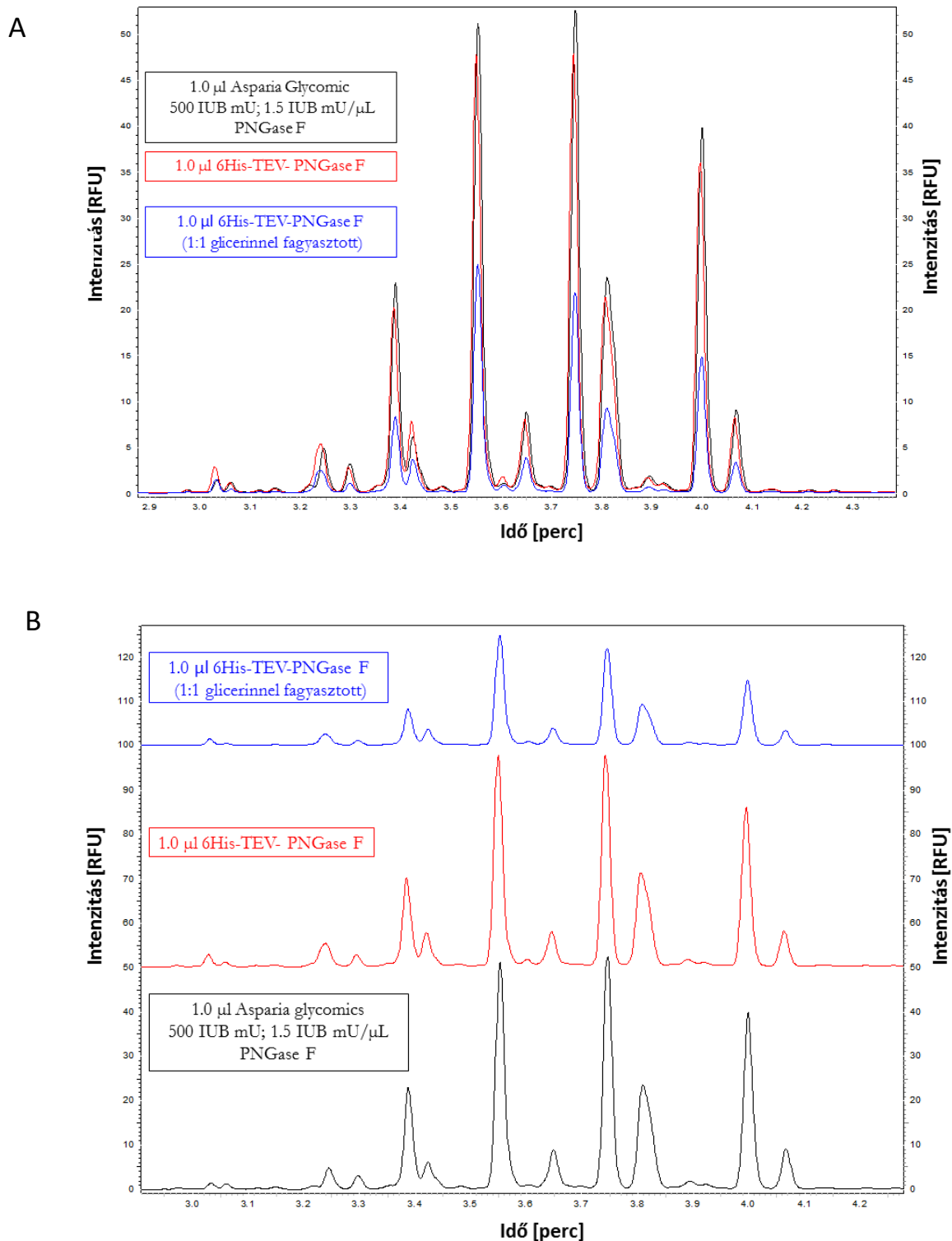
A tisztított fehérjét két porcióra osztva 2000 ml 20 mM Tris-HCL, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0 pufferben dializáltam, így egy 2,7 mg/ml-s (48,6 mg összesen) és egy ~3,4 mg/ml koncentrációjú (20 mg összesen) fehérjeoldatot kaptam. A felhasználásra alkalmas enzimoldatokat a továbbiakban hűtőben tároltam.

6.4 A 6His-TEV-PNGase F aktivitásának meghatározása

A munkám során előállított és tisztított 6His-TEV-PNGase F enzim (2,7 mg/ml-es koncentrációjú oldat) aktivitását a Pannon Egyetem Transzlációs Glikomika Kutatólaboratóriumának munkatársai segítségével határoztam meg. Referenciaként az Asparia Glycomics által gyártott PNGase F (*CarboClip*, 500 IUB mU, IUB International Union of Biochemistry), C-terminálisán 6His toldalékot hordozó enzimet használtam [34]. Az összehasonlítás során az enzimekkel szabad, illetve a rögzített formában végeztem a humán immunoglobulin G1 (hIgG1) antitesthez (100 µg) kötött N-glikánok specifikus lehasítását 50°C-on 20 perc alatt. A glikánokat ezután APTS fluoreszcens festékkel jelöltem, a feleslegben felhasznált festéktől mágneses mikrorészecskék alkalmazásával tisztítottam meg a mintákat. A glikánok analízisét kapilláris gélelektroforézissel végeztem (Fast Glycan Kit, Sciex), majd az így kapott elektroferogramok alapján becsültem meg a kétféle 6His-TEV-PNGase F aktivitását.

6.4.1 A szabad enzimek aktivitásának vizsgálata

A 6His-TEV-PNGase F szabad, oldatformában mérhető aktivitását az enzimoldatok 1-1 µl-ének felhasználásával lehasított glikánok mennyiségéből következtettem. Fontosnak tartottam, hogy a 6His-TEV-PNGase F a hosszabb távú felhasználás céljából fagyasztva is tárolható legyen, így glicerint adtam az enzim oldatához 1:1 térfogatarányban az esetleges fehérjekicsapódás megelőzése érdekében, majd vizsgáltam az enzim aktivitását több hónapnyi fagyasztás után (18. ábra).



18. ábra: A 6His-TEV-PNGase F és a CarboClip enzim által a hIgG1 antitestről lehasított glikánok elektroferogramjai

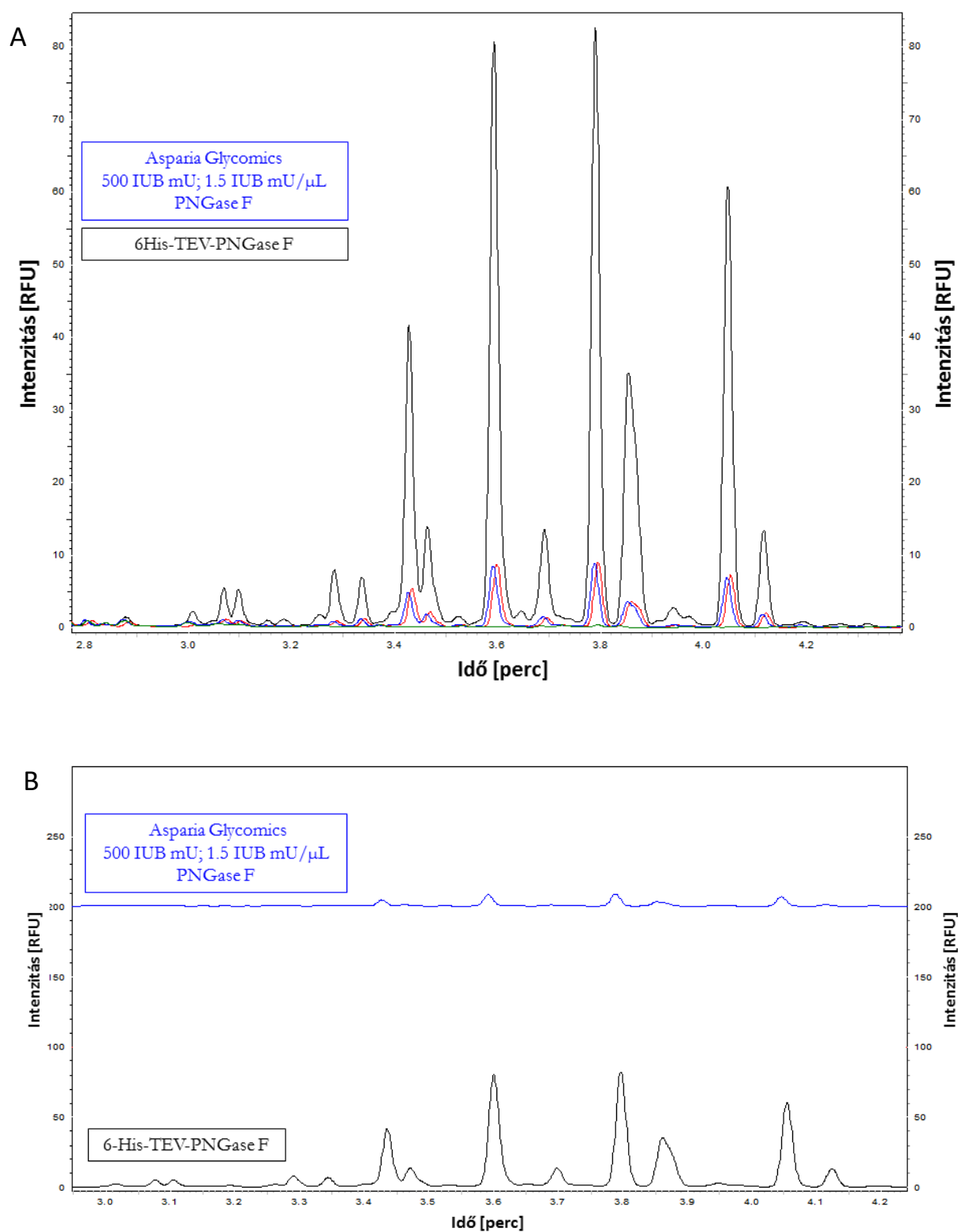
Az 18. ábrán a hIgG1 antitestről lehasított, majd kapilláris elektroforézissel elválasztott glikánok elektroferogramjain jól látható, hogy a munkám során előállított és

tisztított glicerinmentes 6His-TEV-PNGase F szelektivitása azonos, míg aktivitása szinte megegyezik az Asparia Glycomics által forgalmazott *CarboClip* (500 mU) enzimével. A glicerinnel fagyasztott enzim esetén – korrigálva a hozzáadott glicerinnel miatti kétszeres hígítást – megfigyelhető, hogy a fagyasztva tárolt enzim aktivitása és szelektivitása több hónap után sem változott meg jelentősen. A kísérlet eredménye alapján megállapítottam, hogy a 6His-TEV-PNGase F alkalmas a glikánok vizsgálatára.

Az elektroferogramokon látható nagyobb intenzitású csúcsok összehasonlításával a glicerinmentes 6His-TEV-PNGase F enzim aktivitását 1,37 IUB mU/μl, azaz 50,7 IUB mU/mg enzimre, míg a fagyasztott enzimét 1,25 IUB mU /μl, vagyis 46,3 IUB mU/mg enzimre becsültem.

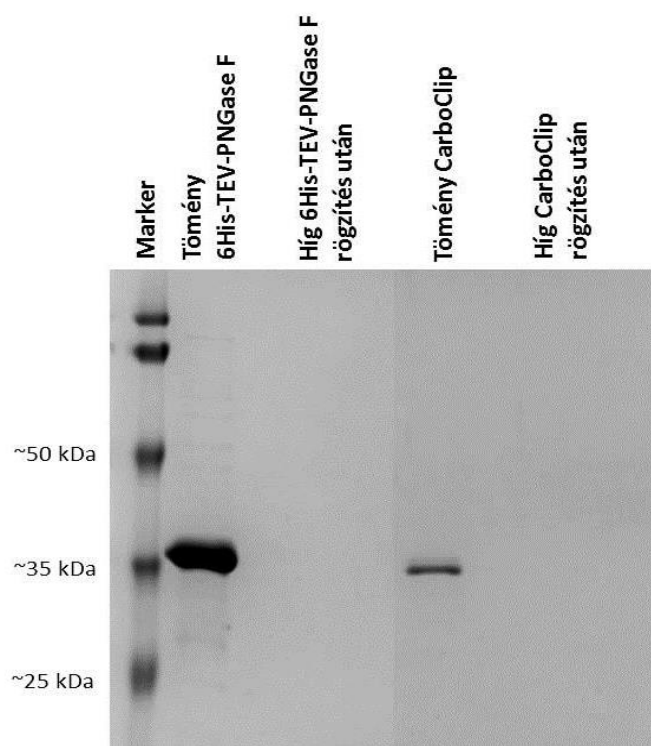
6.4.2 A rögzített enzimek aktivitásának összehasonlítása

Az enzimek rögzített formában történő összehasonlításához a fehérjemolekulákat PhyNexus Ni-IMAC (1000 μl-es pipettahegy, 80 μl gyantával) oszlopokra rögzítettem, a saját 6His-TEV-PNGase F-t az N-terminálisán, a *CarboClip* enzimet pedig C-terminálisán lévő 6His címke által. A felkötés során az enzimoldatok 2-2 μl-ei 100-100 μl pufferhez (Tris-HCl) adva kerültek felhasználásra (20 perc, szobahőmérséklet). Az összehasonlítást a szabad enzimes kísérletekkel azonos körülmények között végeztem, mind az emésztés körülményeit, mind a fluoreszcens jelölést és tisztítást, valamint a kapilláris gélelektroforézissel történő elválasztás paramétereit illetően. A kapott eredmények a 19. ábrán láthatóak.



19. ábra: A rögzített 6His-TEV-PNGase F és CarboClip által lehasított és kapilláris elektroforézissel elválasztott glikánok elektroferogramja

A 19. A és B ábrákon megfigyelhető, hogy a 6His-TEV-PNGase F felhasználása során kapott csúcsok intenzitása szignifikánsan nagyobb a *CarboClip*-éhez képest, ami eltér a szabad, oldatformában vizsgált enzimeknél tapasztaltaktól. Az eredmény mélyebb értelmezése céljából a tömény enzimoldatokat, valamint a felkötés utáni maradékokat SDS-polakrilamid gélen futtattam meg (20. ábra).



20. ábra: A tömény enzimoldatokból és a rögzítés után maradt oldatokból vett minták 12%-os SDS-poliakrilamid gélen

A 20. ábrán az aktivitásméréshez használt tömény, illetve a belőlük készített (~50-szeres hígítással) enzimoldatok rögzítés utáni fehérjetartalma látható. A tömény mintákból kapott jeleket tekintve megállapítottam, hogy a 6His-TEV-PNGase F fehérje-koncentrációja sokszorososa volt a *CarboClip*-ének, a rögzítés utáni futtatások alapján pedig elmondható, hogy az enzimek mindkét esetben maradéktalanul megkötődtek a Ni-IMAC oszlopokon.

Feltehetően ez lehet a jelintenzitás különbség fő oka, hogy a 6His-TEV-PNGase F oldat a benne lévő nagyobb mennyiségű enzim miatt jobban telítette az oszloptöltet, míg a hígabb *CarboClip* erre nem volt képes, ezért kaphattunk kisebb jeleket a gyári enzimmél. A koncentráció-különbség mellett a másik magyarázat a rögzítésben keresendő. Feltételezhető,

hogy a 6His-TEV-PNGase F szerkezete stabilizálódik rögzítéssel, így a fehérje aktivitása megnő. Emellett a rögzítéssel lehetséges, hogy az N-terminálisú 6His toldalékkal megkötődő 6His-TEV-PNGase F aktív centruma hozzáférhetőbb a szubsztrátok számára, mint a C-terminálisú 6His címkével megkötődő *CarboClip*. A rögzített enzimek aktivitása alapján megállapítottam, hogy a kísérlet során beállított körülmények között a 6His-TEV-PNGaseF alkalmasabb volt a glikánok vizsgálatára, mint a forgalomban kapható *CarboClip* enzim.

7 Összefoglalás

A fehérjékhez kapcsolódó N-glikánok vizsgálatának fontos eszköze a peptid-N-glikozidáz F (PNGase F) enzim, amely a cukrok proteinről való eltávolítását végzi. A kereskedelmi forgalomban hozzáférhető PNGase F enzimek drágák, ami korlátozza felhasználásukat. Ezért munkám célja egy olyan PNGase F variáns létrehozása volt, amely nagy mennyiségben, olcsón, bakteriális úton előállítható, valamint szilárd hordozóra rögzíthető és így többször felhasználható.

Munkám első lépéseként megterveztem, majd létrehoztam a 6His-TEV-PNGase F génkonstrukciót, amelyről a fehérje termeltethető és az enzim N-terminálisán lévő 6His toldaléknak köszönhetően Ni^{2+} -affinitás kromatográfiával tisztítható és rögzíthető. Az enzim szabályozott előállítását először négyféle *E.coli BL21* törzzsel próbáltam meg. Próbaindukciós kísérletekből kiderült, hogy a proteint a *Gold(DE3)* és *CodonPlus-RIL* sejtek képesek termelni. Az legígéretesebbnek tűnő *CodonPlus-RIL* kolónia tenyészetéből megkísértem az enzim tisztítását Ni^{2+} -affinitás kromatográfiával, azonban kiderült, hogy a protein inklúziós test formájában halmozódik fel a sejtek citoplazmájában. A problémát többféle módon próbáltam megoldani, végül a *SHuffle* baktériumtörzsben termeltetve sikerült jól feltekeredett, oldott aktív enzimet előállítanom. A kitermelés hatékonysága (90 mg tiszta PNGase F/l sejtenyészet) az irodalomban eddig közölt baktériumban termelt legnagyobb kitermelést többszörösen felülmúlja.

Az így előállított enzim aktivitását Szigeti Márton (PE Transzlációs Glikomika Kutatólaboratórium) segítségével teszteltük, szabad, illetve rögzített formában a PNGase F (*CarboClip*, Asparia Glycomics) enzim aktivitásához hasonlítva. A kísérlet során mindkét enzim lehasította a hIgG1 antitesthez kötött glikánokat, melyeket kapilláris gélelektroforézissel választottunk el. Az eredményként kapott elektroferogram alapján egyértelműen kiderült, hogy az általam tisztított enzim aktivitása a szabad fehérjék esetén

közel azonos a referencia enzimével. Ezen kívül a fagyasztva tárolt enzim aktivitása és szelektivitása több hónap után sem változott meg jelentősen. A rögzített enzimek közül a 6His-TEV-PNGase F szignifikánsan nagyobb aktivitást mutatott, mint a gyári. Ennek egyik oka az enzim rögzítéséhez használt oldat nagyobb koncentrációja, másrészt a rögzítéshez használt 6His toldalék eltérő pozíciójában keresendő. Ezek alapján elmondható, hogy a 6His-TEV-PNGase F enzim mind szabad, mind rögzített formában kiválóan használható az N-kötött glikánok vizsgálatához.

8 Irodalomjegyzék

1. A.Varki: In Essential of Glycobiology, Cold Spring Harbor 2009
2. S. Shrima, N.A. Cherepanova, R. Gilmore: Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmatic reticulum, Semin. Cell. Dev. Biol., 2015. p: 71-80
3. Drickamer, M.E.T.a .K. Introduction of Glycobiology, 2011. Third Edition
4. K. Marino, A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. Nat. Chem. Biol., 2010, 6:713-23.
5. Butters: Introduction: Glycobiology understanding the language and meaning of carbohydrates, Chemical Reviews, 2002. 102(2): 283-284.
6. K. Angata, Cellular and molecular analysis of neural development of glycosyltransferase gene of knockout mice, Methods Enzymol, 2006. 471: p. 25-37.
7. J. Axford: Glycobiology and medicine: an introduction . J R Soc Med, 1997. 90 (5): p 260-264.
8. Kovács Zsuzsanna: Myeloma multiplexgliko-biomarkerek azonosítása kapilláris elektroforézissel, Phd értekezés 2018
9. Imre Tímea: Fehérjék nemkovalens komplexképzésének és glikozilációjának tömegspektroszkópiás vizsgálata, Phd értekezés 2009.
10. H. Lodish, S. L. Zipursky, P. Matsudaria, D. Baltimore, J. Darnell: Molecular Cell Biology (4th edition), 2001., p: 126-133.
11. P. Kuhn, A. L. Tarentino, Thomas H. Plummer, Jr.,and Patrick Van Roey: Crystal Structure of Peptide-N⁴-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine Amidase F at 2.2-Å Resolution. Biochemistry 33, 11699-11706, 1994

12. J. H. Elder, S. Alexander: Endo-beta-N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Aug;79(15):4540-4.
13. T. Loo, M. L. Patchett, G. E. Norris, and J.S. Loo: Using Secretion to Solve a Solubility Problem: High-Yield Expression in *Escherichia coli* and Purification of the Bacterial Glycoamidase PNGase F, *Protein Expression and Purification* 24 90-98, 2002
14. A. L. Tarentino, G. Quinones, A. Trumble, L.-M. Changchien, B. Duceman, F. Maley, and T. H. Plummer, Jr.: Molecular Cloning and Amino Acid Sequence of Peptide-N⁴-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine Amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.*, Vol.265, No.12, 6961-6966, 1990
15. G. D. Barsomian, T. L. Johnson, M. Borowski, J. Denman, James F. Ollington, S. Hirani, D. S. McNeilly, and J. R. Rasmussen: Cloning and Expression of Peptide-N⁴-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine Amidase F in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, Vol.265, No.12, 6967-6972, 1990
16. D. Lemp, A. Haselbeck, and F. Klebl: Molecular Cloning and Heterologous Expression of N-Glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*, *J. Biol. Chem.*, Vol.265, No.26, 15606-15610, 1990
17. G. E. Norris, A. J. Flaus, C. H. Moore and E. N. Baker: Purification and crystallization of the endoglycosidase PNGase F, a peptide:N-glycosidase from *Flavobacterium meningosepticum*, *J. Mol. Biol.*, 241, 624-626, 1994
18. G. E. Norris, T. J. Stillman, B. F. Anderson and E. N. Baker: The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*, *Structure* 2:1049-1059, 1994
19. Y.S. Su, S.J. Wang, P. Wang, Q.S. Qi: High level expression of PNGase F in *Escherichia coli* and its bioactivities. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao (Chin. J. Biotech.)*, 21 (2005), pp. 911-915
20. L. Hua, X. Gao, X. Yang, D. Wan, Ch. He, J. Cao, H. Song: Highly efficient production of peptides: N-glycosidase F for N-glycomics analysis, *Protein Expression and Purification*, 97: p. 17-22.
21. PNGase F 3D szerkezet: Protein Data Bank: 1PNF azonosítóval
22. New England Biolabs: Glycobiology Unit Conversion Chart,
<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/glycobiology-unit-conversion-chart>

23. ExPASy ProtParam alkalmazás: <https://web.expasy.org/protparam/>
24. Gy. Hegyi, J. Kardos, M. Kovács, A. Málnási-Czizmadia, A. Micsonai, L. Nyitray, G. Pál, L. Radnai, A. Reményi és I. Venekei: Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet, 2013 ELTE
25. Tamás László, Dr. Fodor Ferenc, Dr. Nyitrai Péter, Dr. Oszvald Mária, Dr. Rudnóy Szabolcs, É. Sárvári, Á. Solti, Z. Szigeti és G. Tóth: Növényélettani vizsgáló módszerek, 2013 ELTE
26. Szeberényi József: Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus Kiadó, 2014
27. Bálint Miklós: Molekuláris Biológia I-II.: Műszaki Könyvkiadó, 2006
28. Wunderlich Lívius: Molekuláris biológiai technikák, Typotex Kiadó, 2014
29. Alexa Anita, Fodor Krisztián, Garai Ágnes, Glatz Gábor, Radnai László, Rapali Péter, Szakács Dávid, Várkuti Boglárka, Zeke András: Géntechnológia és fehérjemérnökség, Szerkesztette: Nyitrai László, ELTE, 2013
30. Az ábra a <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab12%20-%20Biol210.html> alapján készült
31. Az ábra a <http://www.motifolio.com/6111177.html> alapján készült
32. Az általam használt, NEB által forgalmazott *SHuffle* törzs:
<https://www.neb.com/products/c3029-shuffle-t7-express-competent-e-coli>
33. J. Lobstein, Ch. A Emrich, Ch. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, M. Berkmen: SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm, *Microbial Cell Factories* 2012, 11:56.
34. Az általunk referenciaként használt PNGase F enzim:
<https://aspariaglycomics.com/product/pngase-f/#1498486081716-201b52ef-b634>

9 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Jankovics Hajnalkának a kísérleteim során és a dolgozatom megírásában nyújtott segítségével. Hálával tartozom Dr. Vonderviszt Ferencnek, hogy tanácsaival segítette munkám megvalósulását, valamint Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium munkatársainak, akikhez mindig fordulhattam kérdéseimmel.

Köszönettel tartozom Szigeti Mártonnak és a Transzlációs Glikomika Kutatólaboratórium munkatársainak az enzimaktivitás-mérésben nyújtott segítségükért.

10 Melléklet

A 6His-TEV-PNGase F gén szekvenciája

atgcatcaccaccaccatcacgaaaacgtgtattttcaggggaagtcacaccggtgctccggcagataataccgtaaatattaaaacattc
gacaaagtaaaaaatgcctttgggtgacggattgtcccaaagtcagaaggaacctttacatttcggcagatgtaacaactgtaaaaacg
attaagatgttcatcaaaaatgaatgtcctaataaaacctgtgatgaatgggatcggtatgccaatgtttatgtaaaaataaaacaacagg
agaatggatgaaataggacgctttattactccatattgggtgggtacggaaaaattacctcgtggactggaaattgatgttaccgatttca
aatctttactgtccggaatacagaacttaaaatttatacggagacttgggtggccaaaggaagagaatacagtgtagactttgatattgtat
atggtacaccggattataaatattcggcagtagtacctgtaaccaataataacaaatcatccattgatgggtgtccttatggtaaagcacata
cactgggattaaaaaagaatattcagttaccaacaaacacggaaaaagcttatcttagaactactatttcggatggggacatgccaaagc
catatgatgcgggaagcaggggctgtgcagaatgggtccttcagaacacatactatagcaataaataatgcaataactttccaacaccag
ctgggtgctttaggatgttcagaaacctattaataatcagagtccgggaattgggctcctgacagagcaggggtgttccgggaat
ggcagtgccaacacgtatagatgtgtgaataactcttaacgggtagtacttttagttatgaatataagtccagagttggacaaacaacg
gaaccaatggagatgcttttatgcaatttcagttttgtattgcaaaaagtaatacacctattagtctccggtagttacaaactaa

A 6His-TEV-PNGase F enzim tulajdonságai (ProtParam alkalmazással [23] meghatározva)

A 6 His-TEV-PNGase F enzim szekvenciája:

mhhhhhhhenlyfqgshgpadntvniktfdkvknafgdglsgsaegtftfpadvttvktikmfiknecpnktcdewdryanvy
vknkttgewyeigrfitpywvgtelprgleidvtdfksllsgntelkiytetwlakgreysvdfdivygtptykysavvpviqynk
ssidgvpygkahtlglkknipntekaylrrtisgwghakpydagsrgcaewcfrthtiainnantfghqlgalgcsanpinnqsp
gnwapdragwcpgmavpridvlnnsltgstfsyeykfqswtngngdafyaissfviaksnptisapvvt*

A 6 His-TEV-PNGase F enzim tulajdonságai ExPASy ProtParam alkalmazással meghatározva

- Aminosavak száma: 332 (+ STOP)
- Molekulatömeg: 36,9 kDa
- Izelektromos pont (pI): 7,65
- Extinkciós koefficiens, a cisztein aminosavak cisztein formája esetén: $75205 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Extinkciós koefficiens, redukált cisztein aminosavak esetén: $74830 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018.**



**Arzén(III) megkötésére kifejlesztett flagelláris fehérjék létrehozása és
jellemzése bioszenzorikai alkalmazásra**

Készítette: Szekér Patrik

Témavezető: Dr. Jankovics Hajnalka

Mérnöki Kar, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés	233
1.1. A bakteriális flagellum	233
1.1.1. A filamentum és monomere a flagellin jellemzése	234
1.2. Metalloproteinek	237
1.2.1. Transzkripció fémregulátor fehérjék	238
1.2.2. Az ArsR represszor fehérjék	239
1.3. Az arzén előfordulása a természetben	241
1.4. A módosított flagellin alapú bioszenzorokban rejlő lehetőségek	242
2. Célkitűzés	243
3. Felhasznált anyagok és módszerek	244
3.1. Rekombináns DNS technológia	244
3.2. Alkalmazott enzimek	244
3.2.1. Restrikciós endonukleázok	244
3.2.2. DNS ligázok	245
3.3. Plazmid DNS izolálás	245
3.4. Alkalmazott gélelektroforetikus technikák	245
3.4.1. Agaróz gélelektroforézis	246
3.4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	246
3.5. Transzformálás	247
3.6. Elektroporálás	247
3.7. A fermentáció alapjai	248
3.8. Izotermális titrációs kalorimetria	249
3.9. Elektronmikroszkópia	250
3.10. Ciklikus voltammetria	252
4. Elvégzett kísérletek	253
4.1. A módosított flagellin kódot kódoló génkonstrukciók előállítása	253
4.1.1. Cirkuláris plazmid vektor kiválasztása és felszaporítása	253
4.1.2. Plazmid DNS izolálása sejtekből	254
4.1.3. Oligo tervezés	255
4.1.4. Oligók anellálása	256
4.1.5. A plazmid restrikciós emésztése	257
4.1.5.1. Emésztett termék kinyerése	258
4.1.6. Ligálás és transzformáció	258
4.1.7. Génkonstrukciók ellenőrzése	259
	231

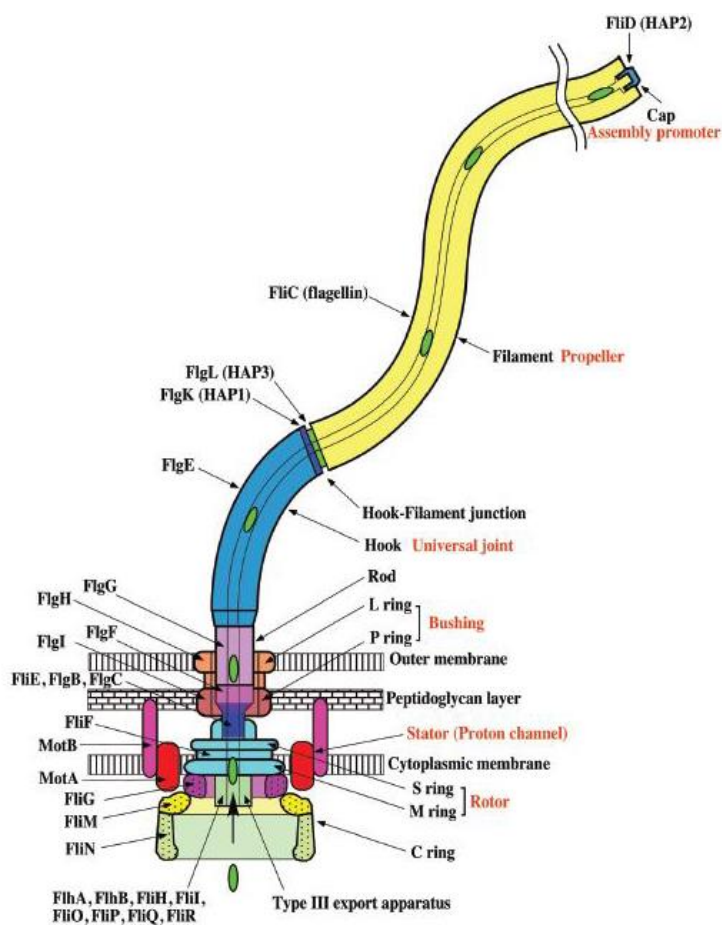
4.2.	Módosított plazmidok bejuttatása Salmonella baktériumokba	260
4.3.	In vivo polimerizációs képesség vizsgálata.....	260
4.4.	Arzén(III)-kötő flagellinek termelődésének és felhalmozódási helyének meghatározása, probaexpresszió	262
4.5.	Nagy mennyiségű fehérje termeltetés és tisztítás, mint aerob fermentáció	263
4.5.1.	Az elvégzett aerob fermentáció „UPSTREAM” szakasza	263
4.5.2.	Az elvégzett aerob fermentáció „DOWNSTREAM” szakasza.....	264
4.6.	FliC-ArsR9-As(III) kölcsönhatás vizsgálata izotermális titrációs kalorimetriával	266
4.7.	FliC-ArsR9-As(III) kölcsönhatás vizsgálata elektronmikroszkópos elemanalízissel	268
4.8.	Filamentumok rögzítése szenzorikai chip felületen gyakorlati alkalmazáshoz	268
5.	Eredmények és azok kiértékelése	270
5.1.	A módosított flagellinek kódoló génkonstrukciók előállításának eredményei.....	270
5.1.1.	A plazmid izolálás és az emésztett termék kinyerésének eredménye.....	270
5.1.2.	Enzim vágóhelyek ellenőrzésének eredményei	270
5.1.3.	A szekvenálás eredményei.....	272
5.2.	Az <i>in vivo</i> polimerizációs képesség vizsgálatának eredménye	273
5.3.	Arzén(III)-kötő flagellinek termelődésének és felhalmozódási helyének meghatározása, probaexpresszió eredménye	277
5.4.	Nagy mennyiségű fehérje termeltetés és tisztítás eredménye	278
5.5.	Az izotermális titrációs kalorimetriás mérések eredményei.....	281
5.6.	Az elkészített chippek és a ciklikus voltammetriás mérés eredménye.....	283
5.7.	Elektronmikroszkópok elemanalízis eredményei.....	283
6.	Összefoglalás.....	286
	Köszönetnyilvánítás	287
	Irodalomjegyzék.....	289

1. Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben részletesen bemutatásra kerül a munkám tárgyát képező szupramolekuláris rendszer szerkezete és szerepe, valamint a felhasználási lehetősége.

1.1. A bakteriális flagellum

A bakteriális flagellum (ostor) egy sokrétű funkcióval rendelkező sejtszervecske. Korábban úgy gondolták, hogy e mozgásszervek feladata kizárólag a motilitás biztosítása, azonban az elmúlt évtizedekben fény derült egyéb összetett funkciójukra is, mint az adhéziós képesség, a biofilmmé történő differenciálódás és a szövetekbe történő penetráció mellett a fagocitózis aktiválása is. A flagellumok elhelyezkedése és szerkezeti elemei különböző baktériumfajok között bizonyos mértékben eltérőek, ezért szerkezetük ismerete segít egyes baktériumok azonosításában. A *Salmonella typhimurium* peritrich eloszlásban épít flagellumokat, melyeket 26 féle fehérje építi fel [1]. A teljes mozgásszerv három részből áll, egy sejtmembránba ágyazott motorból (bazális test), egy helikális filamentumból, valamint a kettőt összekötő kampóból, melyet az 1.1. ábra szemléltet [2].

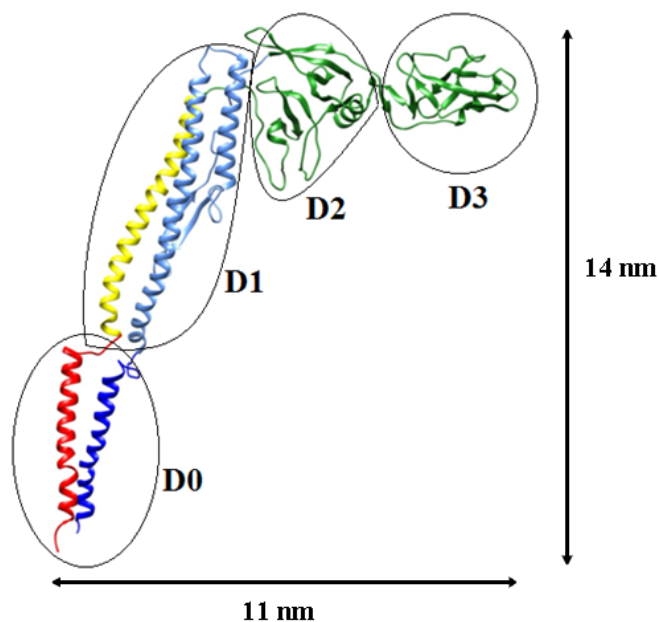


1.1. ábra: A bakteriális flagellum felépítése [2]

Ezen apró molekuláris gépezetek több szempontból is figyelemre méltóak: a mindössze 50 nm átmérőjű protonok által hajtott motor akár 90 ezres percenkénti fordulatszámot is elérhet, a flagellin monomerekből felépülő filamentum pedig polimorfikus és önszerveződő képességgel rendelkezik. A kampó 130 db hook fehérjéből áll, mely kardáncsuklóként funkcionálva lehetővé teszi a forgástengely irányának megváltoztatását, így a baktérium pillanatszerű irányváltoztatását. Ezt a motor mobilis részének az óra járásával megegyező és ellentétes forgási képessége, illetve a filamentumoknak a motorra nagyjából merőleges, saját hossz tengelyük körüli forgása teszi lehetővé. A flagellumot alkotó fehérjekomponensek a citoplazmában szintetizálódnak. Morfológiai szempontból feloszthatók az elsősorban motort alkotó gyűrű alakú képződményekre és egy úgynevezett axiális struktúrára, ami magába foglalja a motor tengelyét alkotó ötféle rod fehérjével (FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG) együtt a hook, HAP, illetve flagellin fehérje alegységeket. A gyűrű alakú rész belsejében helyezkedik el a flagelláris exportrendszer, ami képes a filamentumot alkotó fehérjemonomerek felismerésére és azok szűk, 3 nm átmérőjű csatornán keresztüli kijuttatására. A szerkezet jellemzése során szót kell ejteni a HAP (hook associated proteins) fehérjéről is. Közülük két fajta, a HAP1 és a HAP3 néhány kópiája rövid kapcsolórészt képez a kampó és a filamentum között, míg a HAP2 fehérje molekuláris sapkaként végigkísérve biztosítja a teljes szál *in vivo* felépülését [3].

1.1.1. A filamentum és monomere a flagellin jellemzése

Az akár 15 μm hosszúságot is elérő flagelláris filamentumok szerkezetét flagellin alegységek alakítják ki önszerveződő, melyek közötti erős kölcsönhatások stabilizálják a nagyjából 23 nm átmérőjű struktúrát [4]. A velük rendelkező baktériumok úszása úgy valósul meg, hogy, a sejtestük mögött ezekből a filamentumokból a motor forgásának következtében létrejön egy propellerként funkcionáló köteg [5, 6]. A különböző fajokból származó flagellinek molekulatömege széles határok között mozog. A centrális régió méretének nagymértékű változékonysága következtében előfordulnak 28, de akár 65 kDa nagyságú fehérjék is [7]. Ezzel ellentétben a különböző organizmusokból származó flagellinek polipeptidlánc végei nagyfokú szekvenciális homológiát mutatnak. Ezek a konzerválódott részek nagyjából 180 N-terminális és a 100 C-terminális aminosavat érintenek.



1.2. ábra: A flagellin szalagmodellje. D0, D1, D2 és D3 jelöli a fehérje négy doménjét

A vad típusú *Salmonella typhimurium* (SJW1103) származó flagellin polipeptidláncát 494 aminosav alkotja, melynek szerkezetét a 1.2. ábra mutatja [8]. Röntgendiffrakciós és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal vertikálisan 14 nm, horizontálisan nagyjából 11 nm a fehérje mérete [2]. Másodlagos szerkezeti elemeket tekintve meglehetősen változatos a molekula, melyet a 1.3. ábra szemléltet.

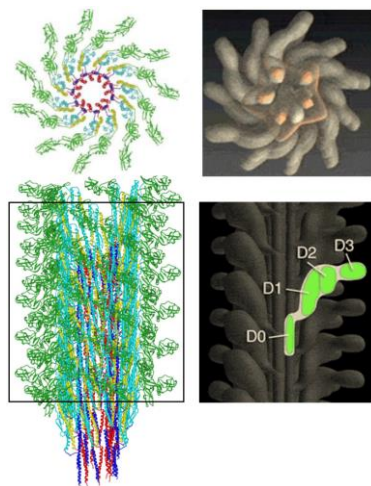


1.3. ábra: A másodlagos szerkezeti elemek elhelyezkedése a flagellin polipeptid láncában.

Zöld színnel jelezve a β -szálak, kézzel a hélixek, rózsaszínnel pedig a kanyarok. A szürke színű szakaszok nem mutatnak másodlagos szerkezeteket [9]

A teljes polipeptid lánc négy doménra osztható (D0, D1, D2, D3). A **D0** magába foglalja az N-terminális végtől induló első 43 és a C-terminális végig terjedő utolsó 40 aminosavat. Itt található egy szupermásodlagos struktúra, nevezetesen az α -helikális kétláncú szuperhélix (coiled coil), amely a monomer fehérjében oldatban nem mutat kompakt, stabilis térszerkezetet. A következő szerkezeti egység a 44. aminosavtól 176-ig és a 406-tól 454-ig tartó szegmenseket tartalmazó **D1**. Fellelhetők benne másodlagos struktúrák, mint például három α -hélix (57-99, 104-126, 406-447), valamint egy egyedülálló β -kanyar (131-134) / β -hajtű (140-160) / α -hélix (163-168) motívum. Az utóbbi domén hasonló hidrofób belső magot alakít ki a középső tengely mentén, mint egy α -hélixből álló köteg, azzal a különbséggel, hogy itt a hidrofób oldalláncok pakoltsága meglehetősen laza [3]. A **D2**-t (Lys177-Gly189,

Ala284-Glu405) főként β -szálak alkotják, kivéve egy rövid 310-hélixet (288-298) és egy α -hélixet (284-298). Ezek a β -szálak egyedi hajtúket és béta lemezeket hoznak létre, melyek hidrofób régiói által további két kompakt szubdoménre oszthatók (D2a, D2b). Valószínűleg a két szubdomén kölcsönhatásának fontos szerepe van a **D2** és a soron következő **D3** egymás közötti viszonyában. A centrális régióba tartozó hipervariábilis **D3** domén (190-283) a filamentum külső felszínén helyezkedik el. Ez a rész, habár szerepe van a **D1** és **D2** domének, így a fehérje és a teljes filamentum stabilizálásában [3,10], a szomszédos alegységekkel nincs kapcsolatban. A D3 egy különleges β -hordó szerkezetű domén, amely tartalmaz egy sor β -hajtú által kialakított úgynevezett β -folium struktúrát és egy rövid helikális szakaszt, ami így 15 hidrofób oldalláncot foglal magába [11].



1.4. ábra: A flagellin fehérjék és doménjeinek egymáshoz képesti elrendeződése a filamentumban [8]

A különböző fajokból származó flagellinek centrális és terminális régiók változékonysága közötti különbség abból adódik, hogy a filamentum képzésben csupán a terminális régiók vesznek részt hidrofób aminosavak hetes ismétlődése által létrehozott α -helikális kötegeket képezve. Ezzel szemben a centrális részt alkotó D3 domén változékonysága szelekciós előnyt biztosít a baktérium számára azzal, hogy az 1.4. ábrán látható, legkönnyebben hozzáférhető részének karakterisztikája módosulhat, amivel elkerülheti adott esetben a gazdaszervezet immunválaszát [11]. Mivel ezen domén az önszerveződő képesség megzavarása nélkül szabadon változtatható, jó célpontot nyújt a génsebészeti beavatkozások számára. Már létrehoztak olyan flagellin deficiens baktériumokat is, melyek genomja nem rendelkezik flagellin fehérjét kódoló génnel. Ilyen az SJW2536 *Salmonella* törzs, amelybe egy megtervezett és létrehozott plazmid bejuttatását követően a számunkra kívánatos módosított flagellin termeltethető.

1.2. Metalloproteinek

Metalloproteineknek hívjuk azokat a fehérjéket, melyeknek fémionokra van szükségük, funkciójuk betöltéséhez és/vagy szerkezetük kialakításához [12]. A természetben fellelhető fehérjék nagyjából fele sorolható ide. A metalloproteinek katalizálják a legfontosabb biológiai reakciókat, például a fotoszintézist, respirációt, víz oxidációt, molekuláris oxigén redukciót és a nitrogén fixációt [13]. Tároló és transzport funkciókat tölthetnek be, valamint egyes fémkötő fehérjéknek fontos szerepük van fertőzőes betegségek lefolyásában is. A fémionok koordinációs kötéssel kapcsolódnak általában a fehérjék struktúráját alkotó aminosavak oldalláncainak oxigén, nitrogén és kén atomjaihoz. Egyes esetekben a főlánc is biztosít donor atomokat, de ezek száma és jelentősége jóval kisebb. Habár jóformán az összes aminosav képes bizonyos mértékben fémek koordinációjára, egyeseknek mégis kiemelt a fémkötő hajlama. Ilyen például az imidazol oldallánccal rendelkező hisztidin, a tiol csoportot tartalmazó cisztein, valamint a karboxil csoporttal bíró aszparaginsav és glutaminsav [14]. Az evolúció során kialakult, kifinomult érzékelési mechanizmusok segítik a fémionnak a fehérje aktív centrumához kötését, melyben kulcsfontosságú a fémion vegyértéke és a donor atomokat biztosító aminosavak pozíciója. A fémkötő fehérjék feladata sokszor egy meghatározott vegyértékű fém specifikus és erős kötésén keresztül biztosítani egy összetett biokémiai folyamat végbemenetelét. A fémek fehérjékhez való kötődése bizonyos esetekben nem kívánt folyamat, különösen, ha nehézfémekről van szó. Bár egyes betegségek kezelésében létezik terápiás felhasználásuk és néhány állatnak is szüksége van ezekre a növekedéshez, általában negatív hatásokról számol be az irodalom [15].

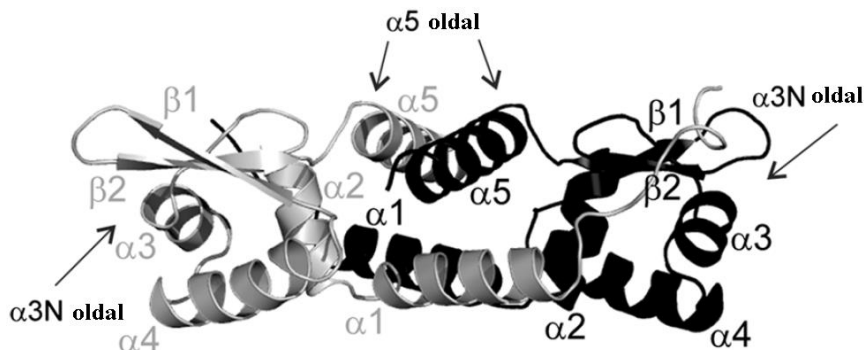
Az arzénről, kifejezetten a három vegyértékű szerves és szervetlen formáiról már régóta ismert, hogy képesek fehérjékhez kötődni. Ezt a tulajdonságát már az első világháborúban is kihasználták, először 1904-ben szintetizált lewisitet (2-klóretenilarzénessav-diklorid) vetettek be pusztító vegyi fegyverként. Egészségkárosító hatását a fehérjékben lévő cisztein aminosavak szulfidril csoportjaival szembeni nagy affinitása okozza [16]. A kötődés szerkezeti változásokat indukál, melyek hatására a protein nem tudja betölteni eredeti funkcióját, ami a DNS és teljes anyagcsere folyamatok károsodását is okozhatja. E hatások elkerülése érdekében szinte minden sejt rendelkezik szabályozó mechanizmusokkal, melyek segítségével bizonyos határok között tudják tartani az intracelluláris térben lévő fémionok koncentrációját. Ezt a feladatot szolgálják például a különböző metallotioneinek, metallochaperonok, metalloenzimek és transzpricipciós regulátor fehérjék is.

1.2.1. Transzkripciós fémregulátor fehérjék

Fém-érzékelő transzkripciós regulátor fehérjék az élővilág több ágában is előfordulnak. Jelen vannak élesztőgombákban, baktériumokban, archeákban, de állati szervezetekben is felfedeztek már egyet [17]. Funkcionális diverzitásuk abban rejlik, hogy míg bizonyos proteinek csak egyfajta fémeket, addig más fehérjék többféle fémiont is képesek kötni eltérő szelektivitással, ezáltal különböző fiziológiás feladatokat látnak el az adott organizmus homeosztázisának fenntartásához. A legintenzívebben kutatottak a bakteriális és archea eredetű transzkripciós fémregulátor fehérjék. Ezek között megkülönböztetünk de-represszorokat (ArsR/SmtB, CsoR/RcnR, CopY, TetR, PerR, MarR), ko-represszorokat (Fur, NikR, DtxR, LysR) és fém aktivátorokat (MerR). A szerepük, rendkívüli érzékenységet kihasználva, érzékelni a citoszolban lévő fémionok koncentrációját. Ezek a fehérjék a szükséges membránfehérjék, intracelluláris kelátorok, fém detoxifikáló enzimek, metallotioneinek és bakterioferritinek szintézisének szabályozásán keresztül fémionokat távolítanak és különítenek el az intracelluláris térből [18, 19]. A szenzorcsaládok meghatározott fémek érzékelésére és olyan gének expressziójának szabályozására specializálódtak, melyek néha különböző organizmusokban azonos funkciót látnak el. Ez a tulajdonság valószínűleg a horizontális géntranszfernek és a konvergens evolúciónak köszönhető. A fehérjék sokszor többféle fémiont is képesek megkötni, specifikusságuk abban rejlik, hogy ezek közül általában csak egy képes előidézni azt a szerkezeti változást, melynek hatására a fehérje disszociál a DNS-ről [18].

Az ArsR /SmtB család képviseli a transzkripciós fémregulátor fehérjék legintenzívebben tanulmányozott és legnépesebb csoportját. Jóformán minden baktérium genomja kódol legalább egyet közülük, ahol az organizmust terhelő két- és többértékű nehézfém ionok detoxifikálásában és exportálásában játszanak szerepet. Ezek az 1.5. ábrán szemléltetett, átlagosan 100-150 aminosavból álló homodimer szerkezetű fehérjék megfelelő operonok promóter régióját fizikailag átfedő operátor régióhoz kapcsolódnak, aminek következtében gátolják a downstream gének transzkripcióját. Amennyiben a sejt citoplazmájában az adott fém/félfém koncentráció (pl: As(III)/Cd(II) stb.) eléri egy bizonyos értéket, kötődik a represszorhoz és az általa indukált konformációváltozás hatására disszociál a DNS-ről. Az indukált de-represszió lehetőséget ad az operon génjeinek átírására és az így szintetizálódott fehérjék közreműködésével a méregtelenítésre [20]. Minden ilyen fehérjében található egy szerkezeti jól elkülöníthető DNS-kötő, és egy fém-érzékelő rész, ami alapján idáig 13 féle egyedi fém-érzékelő motívumot sikerült azonosítani ($\alpha 3$, $\alpha 3N$, $\alpha 5$, $\alpha 3N$ - $\alpha 5$, $\alpha 5c$, $\alpha 53$, $\alpha 4c$,

$\alpha 4c2$, $\alpha 3N-2$, $\alpha 5-4$, $\alpha 55$, $\alpha 2-$ $\alpha 52$, $\alpha 3-4$). Ezek elnevezése a koordinációs kötés létrehozásában szerepet játszó aminosavak, $\alpha 1-$ $\alpha 2-$ $\alpha 3-$ $\alpha 4-\beta 1-\beta 2-$ $\alpha 5$ elrendezésű másodlagos szerkezeti elemeiben elfoglalt helye alapján történik [21].



1.5. ábra: *ArsR/SmtB* család homodimer represszorának általános szerkezete [21]

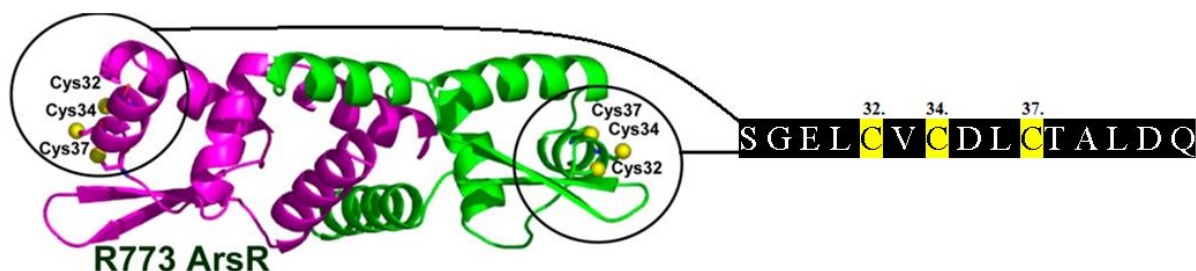
Egyes tagok virulencia faktorokat, biofilm képződést, biolumineszcenciát szabályoznak, valamint két fémkötésre nem alkalmas motívumon keresztül ($\alpha 2-\alpha 3, \alpha 33$) redox kapcsolásokkal is képesek lehetnek a transzkripció kontrollra. A több mint 82 000 tagot számláló *ArsR* /*SmtB* család sokféle fémion érzékelésére képes, mint például az As, Sb, Bi, Cd, Zn, Pb, Co, Ni, Cu és Ag [21].

1.2.2. Az *ArsR* represszor fehérjék

Az *ArsR* /*SmtB* család egyik névadója az *Escherichia coli* R773 plazmidjának *arsRDABC* operonja által kódolt *ArsR* fehérje, mely az As(III), Sb(III), és Bi(III) citoszolbeli koncentrációjának érzékelésére alkalmas, az $\alpha 3$ hélixben elhelyezkedő Cys³²-Val-Cys³⁴-Asp-Leu-Cys³⁷ motívummal rendelkezik [22]. Ezzel megegyező kötőmotívumot tartalmaz az *Escherichia coli* R46 plazmidja és a kromoszómája által kódolt *ArsR* protein is azzal a különbséggel, hogy itt csak az *arsRBC* operon áll rendelkezésre. A három protein szerkezete szinte azonos, bár az aminosavak sorrendjében helyenként eltérnek, a kromoszómális eredetű például négy egységgel rövidebb is a másik kettőnél.

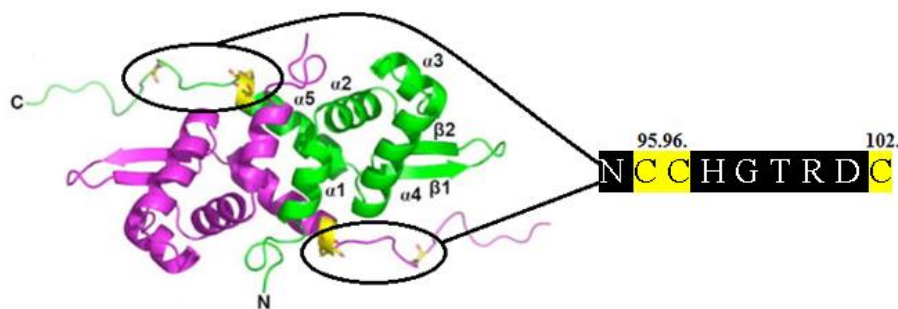
Az R773 *ArsR* (1.6. ábra) egy 117 aminosavból álló homodimer szerkezetű fehérje. Az érzékelésért a polipeptidlánc egy kisebb szakasza felelős, melyben a konformációváltozás szempontjából a 32-es és a 34-es cisztein aminosav esszenciális, a 37-es nem. Tehát legalább a 32. és 34. aminosavval kötést kell létesíteni az arzén-ionnak ahhoz, hogy a DNS-ről való leválás után az RNS polimeráz meg tudja kezdeni a transzkripciót. A transzláció eredményeként létrejövő négy fehérje, az *ArsA*, *ArsB*, *ArsC* és *ArsD* végzi a baktérium detoxifikálását, melyek közül az *ArsD* egy metallochaperon, ami az *ArsA* és az *ArsB* felé

történő transzportért felelős. Utóbbi kettő egy efflux rendszert képezve végzi a tényleges eltávolítást, az ArsC pedig az arzenát As(V) redukcióját katalizálja arzenitté As(III) [20].

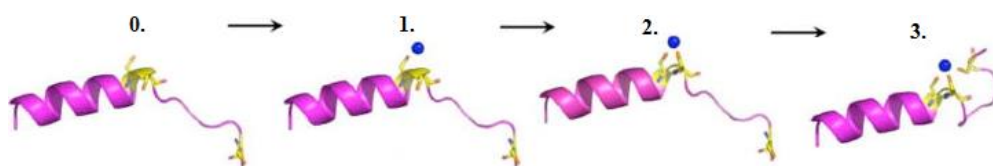


1.6. ábra: Az *Escherichia coli* R773 ArsR fehérje dimer szerkezete és az As(III)-kötésért felelős motívum aminosav szekvenciája [23]

A különböző baktériumokból és archeákból származó három vegyértékű arzén érzékelésére és kötésére alkalmas motívumok főként a DNS kötő hélix-hurok-hélix domén első $\alpha 3$ nevű hélixében foglalnak helyet, de előfordulnak olyan ArsR fehérjék is, ahol $\alpha 3N$, $\alpha 3N-2$, $\alpha 55$, és $\alpha 5-4$ elrendezésben találhatók [20]. Ilyen az *Acidithiobacillus ferrooxidans* proteobaktérium 118 aminosavból felépülő ArsR represszora (1.7. ábra) is, ahol az érzékelő motívum már $\alpha 5-4$ elrendezésben szerepel. Ez azt jelenti, hogy két cisztein aminosav található az $\alpha 5$ hélixben egymás mellett a 95. és 96., egy pedig tőlük öt aminosav távolságra a 102. pozícióban. Ezzel az irodalomban atipikusnak nevezett CCX₅C kötő motívum elrendezéssel egyedi, az 1.8. ábrán szemléltetett háromlépéses mechanizmus útján történhet az As(III) koordináció [24].



1.7. ábra: Az *Acidithiobacillus ferrooxidans* ArsR fehérje dimer szerkezet és a kötésért felelős motívum aminosav szekvenciája [24]



1.8. ábra: Az *Af* ArsR fehérje As(III) koordinációjának lépései [24]

Az *arsCRBH* operon génjeinek expresszióját szabályozó fehérjéhez az arzén első lépésként a Cys⁹⁵ vagy Cys⁹⁶-hez kötődik, ezt követően a hélix eltekeredése lehetővé teszi a második cisztein csatlakozását, majd végül a Cys¹⁰² is kölcsönhatásba lép az As(III)-al

1.3. Az arzén előfordulása a természetben

Az ATSDR - Toxikus Anyagok és Megbetegedések Nyilvántartási Ügynökségének listáján is első helyen tartják számon az arzént, mint a létező legveszélyesebb elem [25]. A földfelszínen található arzén koncentrációja nagyjából 5 ppm-re tehető. Allotróp módosulatai közül a fényes, szürke színű törékeny, hatszögű kristályrendszert alkotó formája tekinthető stabilnak. Ezenkívül jóval kisebb mennyiségben ugyan, de előfordul molekulárcsos szerkezetű sárga és atomrácsos fekete módosulat is. Különböző természeti jelenségek, mesterséges tevékenységek és a mineralizáció következtében bizonyos helyeken kijuthat és felhalmozódhat a környezetben [23]. Az elemi arzén vízben oldhatatlan és az emésztőrendszeren keresztül sem tud felszívódni, azonban a természetben főként szerves és szervesetlen molekulák formájában van jelen, melyek közül az utóbbiak okozzák a legnagyobb egészségügyi kockázatot. Gyanútlanul kerülünk velük kapcsolatba, például bizonyos ételek fogyasztása, dohányfüst és a kipufogógázok belégzése során, de az ivóvízen keresztül is. Míg a táplálékkal felvett arzén általában szerves, addig a vizekben előforduló főként oldott, szervesetlen formában van jelen. Ezen belül vegyértékétől függően sokféle molekulát képezhet, oxidatív környezetben az arzenát As(V), redukáló körülmények között az arzenit As(III) alak a domináns. A három vegyértékű arzénnel képzett vegyületek sokkal mérgezőbbek, mint az öt vegyértékűek, ugyanis sokkal jelentősebb kovalens reaktivitást mutatnak a tiolcsoportok iránt [26]. Az élő szervezetekbe jutott As(V) molekulákból meglehetősen instabil észterek és anhidridek képződnek, de mérgező hatásukat mégis az anyagcsere-folyamatok során képződő As(III) metabolitokon keresztül fejtik ki [27]. A táplálékkal felvett arzén nagyrészt a növényeken keresztül jut el hozzánk, ettől azonban nem igazán kell tartani, ugyanis a felhalmozott arzén számukra is végzetes, ezért elpusztulnának mielőtt ránk is veszélyes koncentrációk alakulhatnának ki [28]. A Föld különböző részein eltérő mértékben ugyan, de világszerte több mint 200 millió embert érintenek az arzénnel szennyezett ivóvizek fogyasztásának kockázatai [29]. Számos betegség kialakulásával hozhatók összefüggésbe, mint például a tüdő-, húgyhólyag- vagy a bőrrák. Szintén fontos kockázati tényezőt jelent többek között kardiovaszkuláris betegségek, diabétesz és a gyerekek mentális retardációja esetében. Kifejezetten a rákos megbetegedéseknél 30-300-szor nagyobb kockázati tényezőnek

számít bármely más ivóvizekben fellelhető karcinogénnél [30]. Az ivóvizek minőségére a világ minden táján szigorú követelmények vonatkoznak. A fejlett országokban az ivóvíz arzén koncentrációjára vonatkozó határérték 10 µg/l, ezért kiemelkedő fontosságú az egyre újabb és pontosabb meghatározási módszerek kidolgozása és fejlesztése. A természetes vizekben jelenlévő arzén koncentrációjának mérésére számos megoldás létezik, melyek közül mindegyiknek megvannak a maga előnyei és hátrányai. Az analitikai módszerekre általánosan elmondható, hogy rendkívül kis kimutatási határral dolgoznak, azonban meglehetősen drágák, lassúak és bonyolultak, ezért manapság a klasszikus kémiai meghatározások mellett egyre nagyobb teret nyer a bioelektronika és a bioszenzorika [31].

1.4. A módosított flagellin alapú bioszenzorokban rejlő lehetőségek

A szenzorok két szerkezeti egységből épülnek fel, az érzékelő elemből és a jelátalakítóból. A szenzoroknak sokféle követelménynek kell megfelelniük, mint például a nagy érzékenység, hordozhatóság, kis mintaigény és a könnyű, gyors használhatóság. Biológiai aktív anyagból nehéz érzékelőelemet létrehozni és azt optimalizálni. Biológiai aktív anyagok alatt enzimeket, oligonukleotidokat és teljes sejteket értünk. Ide tartoznak egyszerű fehérjék is, például a mesterséges fémkötő tulajdonságú flagellinekből felépülő filamentumok ugyancsak kitűnő alternatívául szolgálhatnak [31].

A géntechnológia folyamatos fejlődésével rutin feladattá vált az egyes tulajdonságokat meghatározó gének azonosítása, jellemzése és manipulációja. Ugyanakkor egy fehérje módosítása a meghatározott célra a mai napig nem triviális feladat. Habár a bioinformatika és a tapasztalati megfigyelések nagy segítséget nyújtanak, a proteinek pontos szerkezetének kialakulása még mindig nem teljesen tisztázott folyamat. Ez különösen fontos abban az esetben, amikor specifikus kötő motívumokat tervezünk bizonyos fehérjék meghatározott részeire, ami által új funkcióval kívánjuk őket felruházni, miközben biztosítani akarjuk az eredeti fehérjeváz kulcselemeinek szerkezeti intaktságát. Fontos az is, hogy a létrehozott fehérjéket megfelelő mennyiségben és tisztaságban lehessen előállítani (fermentálni), egyszerűen, idő és költséghatékony módon. Amennyiben sikerül bizonyítani a fehérje kötési tulajdonságát, az érzékelő elemek felvihetők chipek felületére, ahol különböző elektrokémiai és spektroszkópiai módszerekkel vizsgálható az protein–ligandum kölcsönhatás.

A mesterséges flagellin alapú filamentumok érzékelő elemként történő használatának nagy előnye, hogy a fehérjék a baktériumok feltárása nélkül nagy mennyiségben termeltethetők, továbbá nincs szükség bonyolult rögzítési módszerekre se a filamentumok

chip felületén történő megkötéséhez, miközben nagy kötőhely sűrűség biztosítható általuk [32].

2. Célkitűzés

A baktériumok flagelláris filamentumait felépítő flagellin fehérje D3 doménje a filamentáris szerkezet kialakításában nem játszik szerepet. A flagellin e doménjének helyettesítése megfelelő oligopeptidekkel kitűnő lehetőséget nyújthat átmeneti fémek és nehézfémek erős és szelektív megkötésére képes receptor fehérjék létrehozására. Az így módosított fehérjékből az önszerveződő képesség gátlása nélkül akár 10-15 μm hosszú filamentáris nanoszerkezetek készíthetők, melyek rendkívül nagy kötőhelysűrűséget biztosítva bioszenzorok érzékelő eleméül szolgálhatnak.

Munkám során olyan flagellin génkonstrukciók megtervezését és létrehozását tűztem ki célomul, melyek a fehérje D3 doménje helyett As(III)-kötő motívumokat kódoló DNS szakaszokkal rendelkeznek. Ehhez génsebészeti eljárások alkalmazásával, egy D3 nélküli flagellint termeltető plazmid (pKOT-del-mcs-short) MCS (többszörös klónozóhely) régiójába, a D3 helyére terveztem beépíteni az *Acidithiobacillus ferrooxidans* ArsR represszor fehérjéből származó 10 aminosavból álló oligopeptidet (ArsR10) és az *Escherichia coli* ArsR 15 aminosavból álló arzén-kötő, ciszteinek tartalmazó motívum rövidített változatait (ArsR6/7/9) kódoló DNS szakaszokat.

A DNS-konstrukciókat génbeviteli eljárásokkal, flagellin deficiens salmonella baktériumokba terveztem bejuttatni, majd azok expresszióját követően a létrehozott fehérjék *in vivo* és *in vitro* polimerizációs képességét vizsgálni. A vizsgálatot követően célom a legígéretesebb variáns kiválasztása volt, melyre annak cisztein tartalmát is figyelembe véve optimalizálni kívántam egy fehérje termelési és tisztítási protokollt, amit egy másik módosított változat nagy mennyiségű előállítására is terveztem alkalmazni.

A legígéretesebb variáns As(III)-kötő képességét izotermális titrációs mikrokolorimetriával és elektronmikroszkópos elemanalízissel kívántam vizsgálni.

További céljaim között szerepelt a legígéretesebb változat chip felületre rögzítése, majd az As(III) kötés vizsgálata ciklikus voltammetriával.

3. Felhasznált anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben részletesen szót szeretnék ejteni a felhasznált anyagokról és módszerekről.

3.1. Rekombináns DNS technológia

A különböző élőlények teljes genetikai állományát ismerve meghatározott helyeken könnyedén létrehozhatunk mutációkat, de akár teljes géneket távolíthatunk el és vihetünk be az organizmusokba. Baktériumokba bevitt speciális idegen DNS szakaszt (inzert) tartalmazó hordozó DNS molekulák (vektor) felsokszorozásával és expressziójával a különböző iparágak számára hasznos termékek állíthatók elő, mint például az inzulin vagy egyéb gyógyszer hatóanyagok. A hordozó molekulaként alkalmazott cirkuláris plazmid vektorok olyan extrakromoszómális elemek, melyek az organizmus enzimrendszerét felhasználva, a baktériumsejtekben önálló replikációra képesek. A megtervezett és elkészített rekombináns DNS molekuláris klónozásán belül megkülönböztethetünk *in vivo* (pl. *E.coli*-ban) és *in vitro* (pl. PCR-el) módszereket [33].

3.2. Alkalmazott enzimek

Egy rekombináns fehérje létrehozásához az első lépés, hogy a szükséges DNS molekulákat megfelelő formába kell hozni. Erre a célra általánosan alkalmazott, különböző mikroorganizmusokból származó enzimek funkciójukat tekintve három fő csoportra oszthatók. Egyes fajtáik a DNS másolását hajtják végre, mások DNS szálak szétvágását katalizálják, harmadik csoportjuk pedig azok összekapcsolását teszik lehetővé.

3.2.1. Restrikciós endonukleázok

A baktériumoktól kezdve a vírusokig számos élő és élettelen rendszerben találhatók restrikciós endonukleázok. Ezek az enzimek extrém pontossággal ismernek fel meghatározott szekvenciákat a DNS kettős szálon és egy meghatározott pozícióban hidrolizálják a foszfodiészter kötéseket. A csoportba tartozó enzimek közül a II-es típusú, Mg^{2+} -ot igénylő restrikciós endonukleázok olyan enzimek, melyeket a prokarióták termelnek bakteriofágok elleni védekezéshez [34]. A felismerő helyük általában egy nagyjából 4-8 bázispárból álló palindrom szekvencia. A kettős szálú DNS hidrolízisének eredménye hasítóhelytől függően, lehet ragadós vagy tompa vég. Ezen tulajdonságok felismerése tette lehetővé a célzott génszűrés kialakulását. A módosítani kívánt DNS szekvenciájában lévő vágóhelyek

ismeretében lehetőség nyílik annak emésztésével más organizmusokból származó inzertek beépítésére. Ehhez a több mint 4000 tagot számláló csoporthoz tartozik az XhoI, SacI, AgeI is.

3.2.2. DNS ligázok

A DNS ligázok feladata foszfodiészter kötések kialakítása. Ehhez az energiaigényes folyamathoz a bakteriális DNS-ligázoknak NAD^{+} -ra, az eukariótákból, bakteriofágokból és vírusokból származóknak pedig ATP-re van szüksége a megfelelő működéshez. Az egyik legszélesebb körben alkalmazott enzim a **T4-igáz**, amely egy T4 bakteriofággal fertőzött *Escherichia coli* baktériumból izolált enzim. Különleges tulajdonságai közé tartozik, hogy eredetével ellentétben ATP-t használ kofaktorként. Ez az enzim kiválóan alkalmas egyaránt tompa és ragadós végek összeillesztésére. Stabil működéséhez pH 7,8-re van szükség.

3.3. Plazmid DNS izolálás

A legtöbb baktériumokkal végzett géntechnológiai kutatómunka, ami új génkonstrukciók létrehozásán alapul, plazmid DNS izolálással kezdődik. A kereskedelembe már számos kit megvásárolható, amelyek segítségével nagy tisztaságban és mennyiségben nyerhető ki a plazmid DNS. Például az általam is használt **Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System** kittel nagyjából 1-40 μl plazmidot (koncentráció sejttömeg függő) lehet kinyerni 1-5 ml baktérium tenyészetből. A régebbi DNS tisztítási módszerekkel ellentétben ezek az alkalikus lízis után következő fenolos extrakciós lépés helyett egy szilikát tartalmú oszlopon (jelen esetben membránon) történő tisztítást alkalmaznak. Különböző centrifugálási lépések eredményeként létrejövő plazmidot tartalmazó felülúszót az oszlopra juttatva centrifugálás segítségével nagy ionerősségnél megkötjük, ezt követően magas etanol tartalmú oldatokkal mossuk, majd végül steril desztillált vízzel eluáljuk és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk.

3.4. Alkalmazott gélelektroforetikus technikák

A gélelektroforézis lényege, hogy két elektród között (anód, katód) elektromos potenciálkülönbséget hozunk létre, és ennek hatására a tartályok között kapcsolatot létesítve elektronok kezdenek el vándorolni a katód felé, akárcsak a negatívan töltött DNS molekulák. Az elektroforézishez használt gélek gyakorlati haszna, hogy a molekulák mozgásával szemben nagyobb ellenállást biztosítanak, csökkentik a diffúzió mértékét és megakadályozzák a hőmérsékletkülönbségek hatására kialakuló folyadékáramlásokat. A futtatott minta ismert vagy becsült méretét figyelembevételével összeállított géleknek számos követelménynek kell

megfelelniük. Hordozniuk kell töltéseket, kémiaiilag stabilnak, fizikailag ellenállónak és átlátszónak kell lenniük reakcióképesség nélkül.

3.4.1. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz egy lineáris agarobióz diszacharid az 1,3 kapcsolt β -D-galaktopiranóz és 1,4 kapcsolt 3,6-anhidro- α -L-galaktopiranóz összekapcsolódásából áll. A DNS UV fény alatti detektálásához interkaláló fluoreszcens festék hozzáadása is szükséges. A horizontális elrendezésű agaróz gélelektroforézis, a használt gélek relatíve nagy pórusméreténél fogva a biomolekulák közül a nagyobb méretű nukleinsavak (100bp-10kbp) töltés vagy alak szerinti szétválasztására alkalmas módszer. Pufferként használható Trisz-bórsav-EDTA vagy Trisz-acetát-EDTA, melynek ionerőssége és az alkalmazott feszültség meghatározó az elektroforetikus mobilitás szempontjából. Az elválasztandó mintákhoz hozzáadott festőoldat glicerint, EDTA-t és kétféle festéket tartalmaznak, megfelelően pufferált körülmények között. 1 %-os gélben a brómfenolkék 300 bp, a xilén-cianol kb. 4 kbp méretű lineáris DNS-sel azonos sebességgel fut. Ha az anód és a katód között elektromos potenciálkülönbséget (feszültséget) hozunk létre, akkor a zsebekbe betöltött DNS minták negatív töltésük nagysága, méretük és alakjuk függvényében meghatározott sebességgel vándorolnak a pozitívan töltött anód irányába, majd a gélen elválasztott DNS-ek UV fény alatti vizsgálhatók.

3.4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

Az akrilamid megfelelő iniciátor (tetrametil-etiléndiamin) és katalizátor (peroxo-diszulfát) jelenlétében gyökös polimerizációval lineáris polimerré, poliakrilamiddá alakul. *N,N'*-metilénbiszakrilamid és megfelelő pH értékű pufferoldat hozzáadása után kovalens keresztkötések kialakulásával térhálós szerkezetű gél jön létre, melynek pórusmérete széles tartományok között változtatható. A vertikális elrendezésű PAGE-t általában fehérjék és kisebb nukleinsavak elválasztásához használják. Mivel a különböző fehérjék eltérő izoelektromos ponttal rendelkezhetnek, ezért különösen fontos az optimális pH beállítása. A puffer nem csak a kémhatást stabilizálja, hanem ionjai segítségével biztosítja az áramvezetést is. Ideális esetben a fehérjék az áramvezetésben csak csekély mértékben vesznek részt, ez azonban optimálisnál alacsonyabb puffer koncentráció esetén megnövekszik, és elkenődött sávokat eredményez. Ellenkező esetben a diffúzió felerősödhet. Diszkontinuus rendszernél két különböző koncentrációjú gél és három eltérő puffer összetételt használunk. Utóbbit úgy állítjuk össze, hogy a 8,8-9,0 pH-jú szeparáló („lower”) gél tetejére polimerizáltatjuk a 6,5

pH-jú koncentráció gélét. A felső gél feladata az elválasztó gél előtt koncentrálni a mintákat, a jobb felbontás érdekében, ugyanis itt az alacsony akrilamid koncentráció miatt az elválasztás még nem kezdődik meg. A harmadik puffer pedig a futtatókád feltöltésére szolgál és lúgos kémhatásánál fogva deprotonálja a fehérjék oldalláncait, ezáltal negatív töltésűvé teszi azokat. A fehérjék elválasztására használt **SDS-PAGE** lényege, hogy mindhárom puffer tartalmaz nátrium-docecil-szulfátot, ami aspecifikusan kötődik és kitekeri a fehérjéket, majd azoknak, ionos tulajdonságának köszönhetően méretükkel arányos fajlagos negatív töltést biztosít. A mintákhoz SDS mellett redukáló szert is adunk, melyek melegítés közben redukálják a fehérjén belüli diszulfidhidakat. A „lower” gélben, a natív térszerkezet teljes megszűnése által kizárólag molekulatömeg szerinti sebességgel fognak vándorolni a komponensek. A fehérjesávok láthatóvá tételéhez érzékenysége miatt általában Coomassie Brilliant Blue R-250 festéket szokás alkalmazni, ami a fehérjékhez kötődve akár 0,1 µg mennyiséget is képes detektálhatóvá tenni.

3.5. Transzformálás

A transzformálás a génbeviteli eljárások egyik fajtája, melynek segítségével baktériumokba tudunk bejuttatni és sokszorozítani mesterséges plazmidokat. Az *Escherichia coli* K-12-es törzsébe tartozó egyik leggyakrabban használt altörzs, az XL1-BLUE könnyen kompetenssé tehető és rendkívül jól transzformálható. A kompetensé tett baktériumok képesek a környezetből a plazmid DNS molekulákat felvenni. E baktériumok szuszpenziók 4 °C-ról 42 °C-ra (0,5-1 percig) melegítése a sejtmembránjukat fluidabbá teszi, ami által a DNS be tud jutni a citoplazmába. Ezután a sejteket friss tápoldat hozzáadása után hagyjuk regenerálódni (45-60 percig), majd végül a megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajra szélesztjük őket. A transzformációs hatékonyság kiszámítható a kb. 1 ng plazmid transzformálása után felnőtt kolóniák megszámlálásával. A kapott számértéket 1 µg-ra vonatkoztatva kiderül, hogy milyen mértékű kompetenciát sikerült elérni ($>10^7$ telep/µg plazmid nagynak számít).

3.6. Elektroporálás

A cirkuláris DNS baktériumokba juttatásának egyik leghatékonyabb módszere az elektroporáció. A módszer elve, hogy pár ms-ig, rendkívül nagy feszültséget (2-100 ezer V/cm) adva a baktérium szuszpenzióra hirtelen megnő a térerősség, és átmenetileg lyukak képződnek a sejtmembránon, amiken keresztül a vektor be tud jutni a citoplazmába. Miután a

membrán töltöttsége hirtelen megszűnik, a foszfolipid kettősréteg ismét bezárul és a DNS bent marad a sejtben. A feszültség ráadásának időtartama függ az elektroporálandó sejtek minőségétől és mennyiségétől is. A transzformáláshoz használt kémiaiailag kompetens sejtek helyett itt elektrokompetens baktériumokra van szükség. Előállításukhoz a kiválasztott vad törzset tartalmazó tápoldatot desztillált víz és glicerín elegyére cseréljük. A glicerín biztosítja a sejtek fagyálló képességét, (fagyasztva, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolhatóak), valamint nem ionos anyag lévén, nincs hatással az ionkoncentrációra. Amennyiben túl magas ez az érték, elektromos kisülések hatására, nagymértékű sejtpusztulást idézhet elő.

3.7. A fermentáció alapjai

A fermentáció olyan biotechnológiai folyamatokat és műveleteket jelent, melyek során élő sejteket tenyésztünk adott termék előállítása, vagy adott anyag lebontása érdekében, de az is lehet, hogy a sejt maga a termék. Attól függően, hogy milyen élő sejtekkel dolgozunk, eltérő körülményeket kell biztosítani, az optimális működés érdekében. A kiválasztott mikroorganizmus szükségletei alapján kell beállítani a hőmérséklet, pH, tápanyag viszonyokat, ami mellett kiemelten fontos a steril munkavégzésre való odafigyelés és az esetleges inhibitorok kizárása. Az optimális hőmérséklet alapján megkülönböztetünk pszichrofil ($<20^{\circ}\text{C}$), mezofil ($20\text{--}45^{\circ}\text{C}$), termofil ($>45^{\circ}\text{C}$) mikroorganizmusokat. A pH-t tekintve elmondható, hogy míg a baktériumok általában a semleges/enyhén lúgos, addig a gombák a gyengén savas körülményeket kedvelik. Anyagcsere típusok alapján elkülöníthetünk fototróf és kemotróf változatokat, és ezeken belül is lehet tovább csoportosítani az elsődleges elektron donorok alapján. Az organotrófok szerves molekulákat, a litotróf mikroorganizmusok pedig szervetlen molekulákat használnak elsődleges elektron donorként. A végső elektron akceptor alapján pedig (szervetlen esetben) lehetnek aerob és anaerob légzők. A légzési típusokat lehet az alapján is csoportosítani, hogy a baktériumok hogyan viselkednek az oxigénnel szemben. Ez alapján el lehet különíteni obligát aerob, obligát anaerob, fakultatív anaerob, mikroaerofil és aerotoleráns egyedeket, amit a tápoldatban való elhelyezkedés jól szemléltet.

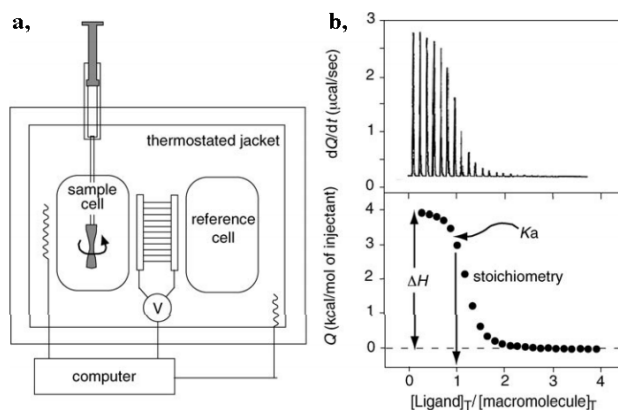
A *Salmonella typhimurium* törzs például egy, a gamma-proteobaktériumok osztályába tartozó, Gram-negatív, mezofil, fakultatív anaerob baktérium, tehát az optimális tenyésztéséhez szükség van levegőztetésre. Légzésüknél fogva a tápoldatban egyenletesen helyezkednek el, ami nagy sejttömeg elérését teszi lehetővé. Tápanyag igényüket tekintve viszonylag egyszerű közegre van szükségük, kizárólag citrátot használnak fel

szénhidrátforrásként, a glükózt pedig fermentálják, ezért úgynevezett minimál (semi defined) táptalajok elegendőek a számára. Ilyen például a sörgyártásból hátramaradt élesztő szárított-porlasztott változata az élesztőkivonat (YE) is, ami nyers (komplex) nitrogénforrásként funkcionál amellet, hogy szerves foszfort és egyéb mikro anyagokat is tartalmaz. A tápoldat kiválasztásánál több szempontra is oda kell figyelni, melyek néha ellentmondásban vannak egymással. Egy fermentációs folyamatban a sejt növekedésén, szaporodásán túl segíteni kell a termék képződését, miközben olcsónak kell lennie és nem szabad megnehezítenie a fermentáció műveletti lépéseit, mint például a levegőztetés, a sterilizálás és a legfontosabbat a termék tisztítását.

3.8. Izotermális titrációs kalorimetria

A fehérje-ligand kölcsönhatás vizsgálatára számos megoldás létezik, például az affinitás kromatográfia, a voltammetria, a Western blot analízis, különböző spektroszkópai módszerek, és a kalorimetria.

Az izotermális titrációs kalorimetria egy direkt mérési módszer, melynek lényege, hogy közvetlen reakcióhő mérésen keresztül vizsgálhatók vele az oldatban lejátszódó exoterm vagy endoterm kémiai reakciók.



3.1. ábra: (a) Az izotermális titrációs kaloriméter felépítése és a (b) titrálási görbe, a belőle kinyerhető adatokkal [35]

A titrálás során mért reakcióhők ismeretében meghatározhatóak a 3.1. ábrán látható termodinamikai paraméterek, mint például az entalpia, szabadentalpia, entrópia és az állandó nyomáson mért hőkapacitás különbségek, emellett az egyensúlyi állandóról és a kötőhelyek számáról is információhoz jutunk. Mérés közben a műszer a benne lévő referenciacellát folyamatosan nagyon kis teljesítménnyel fűti, miközben a mintacellát ezred celsius fokos pontossággal azonos hőmérsékleten tartja. Ha a mintacellában nem játszódik le reakció, akkor

azt értelemszerűen ugyanazzal a teljesítménnyel fűti ($\mu\text{kcal/s}$). Exoterm reakció lejátszódása esetén kevésbé, míg endoterm reakció esetében jobban kell fűteni a mintacellát a megegyező hőmérséklet fenntartása érdekében. A mérési folyamat közben, a titrálás után mért hőváltozás egyenesen arányos a ligandum kötődés mértékével. A mérés nyers adataiban kirajzolt csúcsok alatti terület adja az injektlásokhoz tartozó reakcióhőt, amiből az entalpia és az egyensúlyi állandó az alábbi egyenlettel számolható.

$$Q = V_0 \Delta H_b [M]_t K_a [L] / (1 + K_a [L]) \quad (3.1.)$$

(Ahol V_0 a cella térfogata, ΔH_b 1 mol ligandum kötődéséhez tartozó entalpiaváltozás, $[M]_t$ a teljes makromolekula koncentráció a cellában, K_a a kötési állandó, $[L]$ a szabad ligandum koncentrációja.)

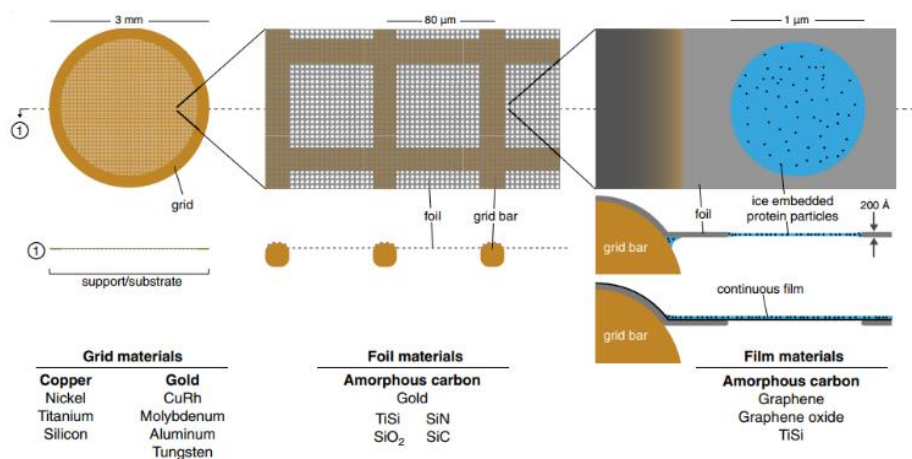
A módszer kimutatási határa 10^{-8}W teljesítményben, az egyensúlyi állandót tekintve pedig $10^2\text{-}10^9 \text{ dm}^3/\text{mol}$. A módszer egyik előnye, hogy a mérést oldatban lehet elvégezni, ahol nem okoz problémát a turbiditás és a fényelnyelés. Fenntartási költségei alacsonyak és egyszerű a mérés. Hátránya a viszonylag nagy anyagigény és az esetleg felmerülő oldhatósági problémák, valamint hogy bizonyos ligandumok (pl. vas-ionok) esetén a műszer anyaghasználata miatt nehézkes lehet a tisztítása. A módszer nagy előnye, ami fehérje munkánál kiemelt fontossággal bír, hogy nincs szükség immobilizálásra és nem kell jelölést használni, vagy egyéb módosítást végezni a komponenseken. Ez nagyban megkönnyíti a mérési előkészítést, mondjuk egy affinitás kromatográfiával szemben.

3.9. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálat alkalmas biológiai minták sejtszintű tanulmányozására alkalmas. Segítségével kiküszöbölhető a fénymikroszkópia felbontóképességi korlátja, ami lehetővé teszi a μm -es tartományba eső baktériumok és azok felszíni képződményeinek megfigyelését is. A megfelelően elkészített mintákat így fény helyett elektronsugárral lehet vizsgálni, aminek az anyaggal való kölcsönhatása alapján megkülönböztethetünk átvilágító (transzmissziós) és pásztázó (scanning) üzemmódot. A két üzemmód manapság már egy készülékben is megvalósítható, sőt vannak olyan mikroszkópok is melyekben anyagösszetétel meghatározást is végre lehet hajtani. Míg a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) gyenge áthatolóképességű elektronjai miatt a vékony, 50-100 nm vastag minták analízisére, addig a scanning elektronmikroszkópia (SEM) a vastagabb minták vizsgálatára is alkalmas. Fő részeik az elektronforrás, elektrongyorsító, vákuumszivattyú, megvilágító lencserendszer és a képalkotást biztosító eszközök. Alapvető

különbség a kettő között, hogy a SEM-ből hiányzik a képalkotó optika, ugyanis ez a módszer, az anyag-elektronsugár kölcsönhatás vizsgálatára nem alkalmas. A kölcsönhatás megnyilvánulhat rugalmasan és rugalmatlanul szóródott elektronok formájában, de kis energiájú másodlagos elektronok és röntgen fotonok is keletkezhetnek. A rugalmasan szóródott elektronokra jellemző, hogy energiájuk megtartása és az eredeti irányuk nagymértékű megváltozása mellett továbbhaladnak, vagy visszaszóródnak. A TEM képalkotás lényege, hogy a rugalmasan szóródott elektronokat kirekesztjük miközben a rugalmatlanul szóródókat detektáljuk, így a mintában lévő nagy rendszámú elemek árnyékot adnak, miközben a kis rendszámú elemek helyén világos részek keletkeznek a kapott képen. Pásztázó üzemmódban ezzel szemben a másodlagos elektronok mennyiségüktől és kilépési irányuktól függően bonyolultabb összefüggések mentén szolgáltatnak információt a minta felületi topográfiájáról.

Egy elektronmikroszkópos minta előkészítése több lépésből áll. A vizsgálni kívánt anyagot rögzíteni, mosni, vízteleníteni, szükség esetén beágyazni és faragni is kell. Az előkészítési lépések után a minták tárgytartóra, a 3.2. ábrán szemléltetett mikrorostélyra (grid) kerülnek. Sokféle kialakítású és anyagból készült grid létezik, a rutin vizsgálatokra használtak többnyire rézből készülnek, vékony szén hártával a felületükön.

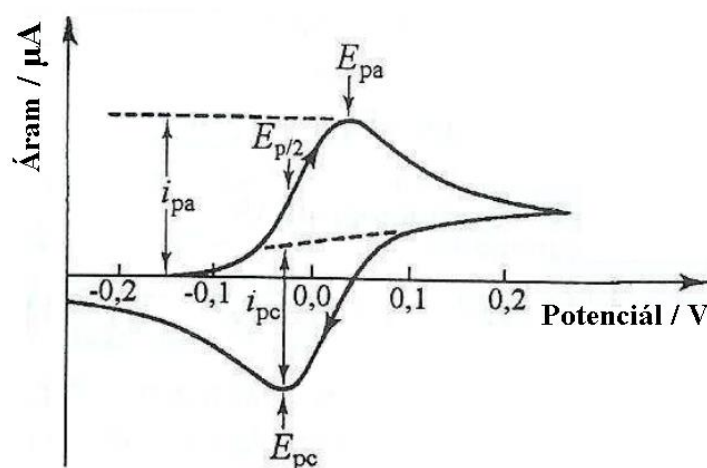


3.2. ábra: A grid kialakítása és lehetséges szerkezeti anyagai [36]

A biológiai minták meglehetősen transzparensnek, és önmagukban gyengén kontrasztosak ezért a megfelelő képalkotáshoz általában negatív festésre van szükség. Ez nehézfém sók használatával érhető el, mely a vizsgált anyaghoz/sejthez nem kötődik, környezetét viszont elektronszóróvá teszi.

3.10. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetria egy olyan potenciosztatikus elektrokémiai módszer, mely elektrokémiaailag aktív (oxidálható vagy redukálható) komponenseket tartalmazó oldatok jellemzését és redoxi, valamint kinetikai tulajdonságainak vizsgálatát teszi lehetővé. A mérés lényege, hogy meghatározott polarizációs sebességgel lineárisan változtatjuk a munka elektródon a potenciált egy meghatározott végpotenciál értékig, majd onnan vissza a kiindulási értékig. Eközben pedig mérjük a cellán átfolyó áram nagyságát. Ha a vizsgált oldat elektrokémiaailag aktív összetevőket tartalmaz, potenciálváltozás hatására töltésátlépés játszódhat le. Az elektronátlépési reakció csak akkor megy végbe, ha a potenciál értéke eltér az egyensúlyi potenciáltól. Ekkor áram fog átfolyni a rendszeren. A mérés során kapott áramerősség értékeket a potenciál függvényében ábrázolva, reverzibilis reakció esetén megkapjuk a 3.3. ábrán látható voltammogramot.

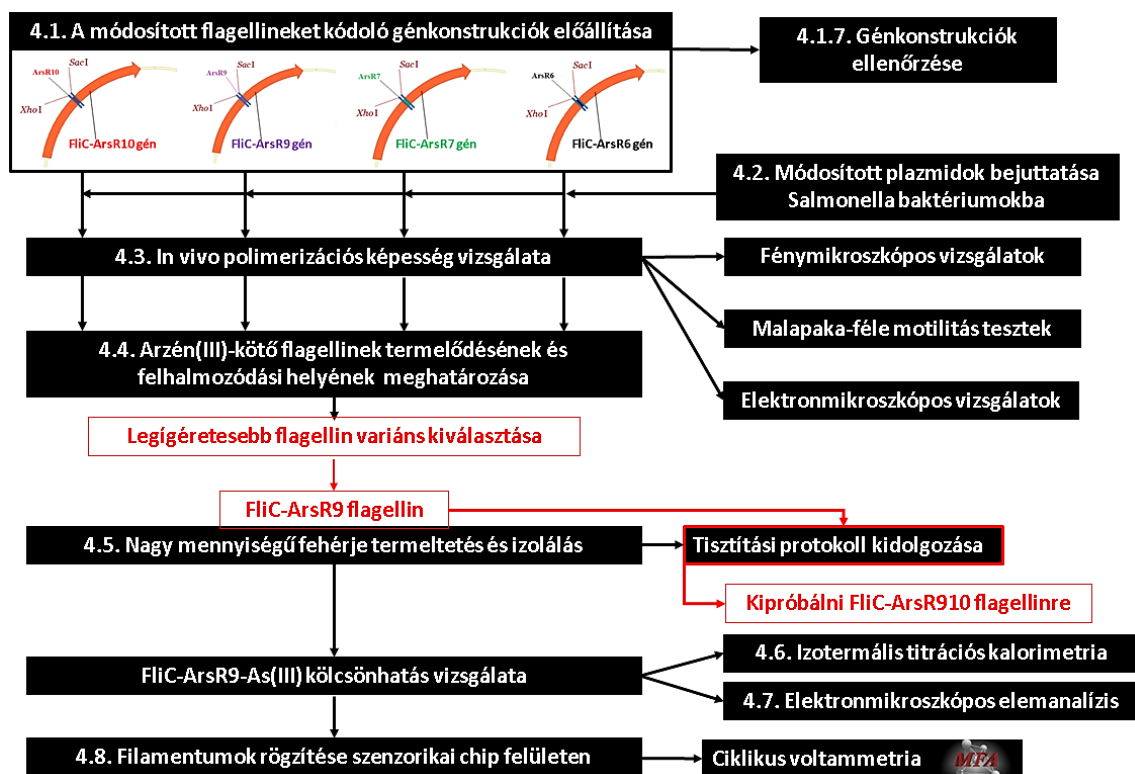


3.3. ábra: Ciklikus voltammogram E_{pa} : anódos csúcs (potenciál);
 E_{pc} : katódos csúcs (potenciál); i_{pa} : anódos áram; i_{pc} : katódos áram [37]

A kaptott voltammogramról leolvashatjuk a csúcsáramok nagyságát, a csúcspotenciálok értékeit és az anód-katód csúcsáram arányát, amikkel számításokat végezhetünk az oldatban zajló reakcióra vonatkozóan. A katódos csúcsonál folyó reakció a redukció, azaz az elektronfelvétel (katódos áram, negatív áram), az anódos csúcsonál pedig az oxidáció zajlik (ekkor kapunk anódos áramot, ami pozitív áram).

4. Elvégzett kísérletek

A következő fejezet a munkám során elvégzett kísérleteket mutatja be DNS-szintről indulva a fehérje- ligandum kölcsönhatás méréséig.



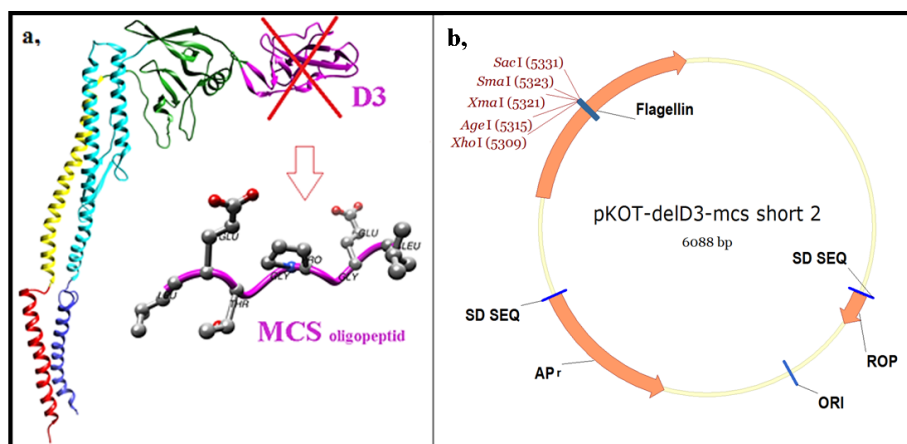
4.1. ábra: A elvégzett kísérletek folyamatábrája

4.1. A módosított flagellinek kódoló génkonstrukciók előállítása

Alábbi fejezet a FliC-ArsR6, FliC-ArsR7, FliC-ArsR9, FliC-ArsR10 fehérjék termeléséhez szükséges DNS szakaszok létrehozásának folyamatát mutatja be.

4.1.1. Cirkuláris plazmid vektor kiválasztása és felszaporítása

A replikálódni képes, rekombináns DNS-ek létrehozásához szükség volt egy hordozó DNS molekulára. Választásom a pBR322 alapú pKOT-delD3-mcs short klónozó vektorra esett (4.2.(a) ábra), melyben megtalálható többek között a *Salmonella typhimurium*-ra jellemző replikációs origó, egy hiányos (D3 nélküli) flagellin fehérjét kódoló génszakasz és annak promótere, egy ampicillin rezisztencia gén, valamint az rop gén, melynek terméke a plazmid replikációját szabályozza.



4.2. ábra: (a): Flagellin fehérje, (b): Módosított pBR322 vektor

A „hiányos flagellin” elnevezés azt jelenti, hogy a polipeptidlánc D3-as doménjét kódoló DNS szakasz hiányzik a flagellin fehérje génjéből (4.2.(b) ábra). Korábbi kutatások megállapították, hogy e domén eltávolítása, a filamentum önszerveződő képességét nem gátolja, így a baktérium képes marad a filamentum építésre [10]. A kitörölt DNS szakasz helyén egy úgynevezett Multiple Cloning Site (MCS), magyarul többszörös klónozó hely található. Ez egy olyan 24 bázispárból álló DNS szakasz, ami közvetve lehetővé teszi egy általunk választott oligopeptid beillesztését, melynek segítségével molekuláris felismerő funkcióval ruházhatók fel az átíródó fehérjék. A laboratóriumban rendelkezésemre állt egy *Salmonella typhimurium* baktérium törzs (NT045), mely tartalmazza a pKOT-delD3-mcs short plazmidot. A vektor felszaporításának céljából lamináris áramlású fülke alatt 5 ml folyékony LB tápoldathoz hozzáadtam 5 µl ampicillint és NT045 inokulumot, majd az elkészített oldatot 16 órára rázó inkubátorba helyeztem 37 °C-ra, 275 rpm-es rázatás mellett. Az antibiotikum hozzáadása biztosítja a szelektivitást, ugyanis csak azok az egyedek lesznek életképesek, melyekben megtalálható a fentebb említett vektor DNS.

4.1.2. Plazmid DNS izolálása sejtekből

A következő lépés célja a felnövesztett mikroorganizmus módosított pBR322 vektorának kinyerése volt. Ezt **Mini Plus Plasmid DNA Extraction System** segítségével hajtottam végre, amely alkalmas kis mennyiségű plazmid DNS alkalikus lízisen alapuló kivonására. A hatékonyság szempontjából fontos volt, hogy a sejtek inkubálása ne tartson 16 óránál tovább, mivel a túlnőtt sejtek elpusztulnak és DNS-ük kikerül a felülúszóba. A kész baktérium szuszpenziót 2 percig centrifugáltam 15600 xg-n, majd eltávolítottam a felülúszót. Hozzáadtam 200 µl MX1 puffert és fel-le pipettázással addig szuszpendáltam a sejteket, míg

teljesen homogén lett. További 250 µl MX2 puffert pipettáztam a csövekbe és óvatos 8-10-szeri fejre fordítást követően 4 percig szobahőmérsékleten állni hagytam őket. Eközben megtörtént a sejtfaluk roncsolása következtében a sejtek lízise. Az így keletkező tiszta és viszkózus lizátumhoz 350 µl MX3 puffert adtam. Ennek hatása, hogy neutralizálja a lizátumokat és a sejtalkotók DNS kivételével fehér csapadék formájában kiválnak. A második centrifugálást 15600 xg-n, 10 percig végeztem. DNS-kötő oszlopra töltöttem a felülúszót. Újabb centrifugálási lépések következtek, amik során először 7500 xg-n, 1 perc alatt a plazmid DNS az oszlopra kötődött. A következő lépésben 0,5 ml WN pufferrel, majd 0,7 ml WS pufferrel mostam az oszlopokat, ezután 7500 xg mellett 3 percig centrifugálva eltávolítottam az oszlopon maradt mosópuffert. A WN és a WS puffer is tartalmaz etanolt, ezért ennek teljes eltávolítása érdekében további 13000-es percnkénti fordulatszámon (15600 xg) 3 percet centrifugáltam az oszlopokat tartalmazó kollektor csöveket. Az oszlopokat áthelyeztem egy új 1,5 ml-es centrifugacsőbe és 55 µl steril desztillált vízzel szobahőmérsékleten, 8 perc nedvesedés után 15600 xg-n eluáltam a plazmid DNS-t az oszlopról. A kinyert DNS-t -20 °C-on tároltam. 1%-os agaróz gélen ellenőriztem a kinyert DNS-t. Gél készítéséhez 35 ml TEB (Trisz-Bórsav-EDTA) puffert és 0,35 g agarózt Erlenmeyer lombikba mértem, majd mikrohullámú sütőben melegítve feloldottam az agarózt. Miután hidegvíz alatt 50 °C-ra hűtöttem, hozzáadtam 3,5 µl **GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water** nevű fluoreszcens festéket és gyorsan átvittem a géllöntő formába. Fél óra állás után a megdermedt géllel behelyeztem a TEB pufferrel feltöltött futtatókádba. Markerként **Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder** nevezetű DNS létrát használtam, a többi zsebbe pedig külön-külön 3 µl desztillált vizet, 2 µl mintát és 1 µl **6xOrange DNA Loading Dye** festéket tartalmazó folyadékelegyet pipettáztam. Az elektroforézist 100 V-os feszültségen végeztem, majd körülbelül 20 perc futtatás után leállítottam.

4.1.3. Oligo tervezés

A helikális formát építő flagellint kódoló plazmid többszörös klónozó helyére beépítettem az arzén-kötő oligopeptideket kódoló DNS szakaszokat XhoI és SacI restrikciós endonukleázok segítségével. Mivel a kiválasztott fehérjék arzénkötő polipeptidláncai rövidek (6-10 aminosav), ezért a hagyományos PCR-el végzett beépítés helyett egy úgynevezett oligo anelláláson alapuló inzert előállítását alkalmaztam. A D3 domén helyére szánt négy oligopeptid közül az egyik az *Acidithiobacillus ferrooxidans* ArsR represszor fehérjéből

származó 10 aminosavból álló (ArsR10), a többi pedig az *Escherichia coli* ArsR 15 aminosavból álló As(III)-kötő, ciszteineket tartalmazó motívum rövidített változatai, az ArsR6, ArsR7 és az ArsR9 voltak. A dezoxiribonukleinsav szálak tervezéséhez VECTOR NTI programot alkalmaztam, melynek segítségével (aminosav szekvencia ismeretében) *Salmonella typhimurium*-ra optimalizáltan megterveztem a szükséges bázissorrendet. A PCR primerként megrendelt, oligopeptideket kódoló gének forward és a reverse szálát 5'→3' irányba felírva a 4.3. ábra szemlélteti.

ArsR6 oligok

fw. 5' **TCGAG**TGCGTGTGCGATCTGTGC**GAGCT** 3'
 rev. 5' **CACGCACACGCTAGACACGC** 3'

ArsR7 oligok

fw. 5' **TCGAG**CTGTGCGTGTGCGATCTGTGC**GAGCT** 3'
 rev. 5' **CGACACGCACACGCTAGACACGC** 3'

ArsR9 oligok

fw. 5' **TCGAG**GGCGAACTGTGCGTGTGCGATCTGTGC**GAGCT** 3'
 rev. 5' **CCCGCTTGACACGCACACGCTAGACACGC** 3'

ArsR10 oligok

fw. 5' **TCGAG**AACTGCTGCCATGGCACCCGCGATTGCGCG**GAGCT** 3'
 rev. 5' **CTTGACGACGGTACCGTGGGCGCTAACGCGCC** 3'

4.3. ábra: Az elkészített oligok szekvenciája (sárgával kiemelve a vágóhelyek)

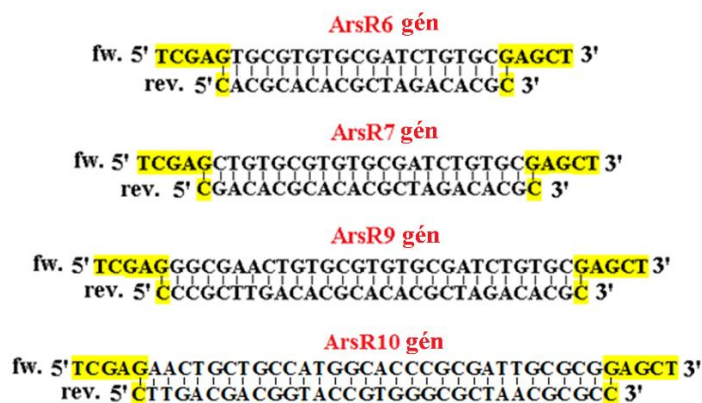
4.1.4. Oligok anellálása

A tervezés alapján megrendelt DNS szakaszok összeillesztéséhez belőlük hígítással 0,1 M koncentrációjú primer törzsoldatokat készítettem. A reakcióelegy elkészítéséhez minimum 2 µg-ot kellett rakni mindkét DNS-szálból (forward, reverse), ekvimoláris koncentrációban. Ezt követően az így összeállított oldatokat ki kellett egészíteni, úgynevezett anellációs pufferrel (10 mM Trisz, pH=7,5-8, 50 mM NaCl) 50 µl-re.

ArsR6 fw.: M=8,668 g/mol ; n=26 nmol 0,1M $\leftarrow$ +260 μ l SDV	260 μ l $\rightarrow$ 0,22 mg = 220 μ g 2,364 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	} 3,33 μ l fw. + 3,33 μ l rev. + 43,34 μ l A. puffer
ArsR6 rev.: M=6,041 g/mol ; n=26,6 nmol 0,1M $\leftarrow$ +266 μ l SDV	266 μ l $\rightarrow$ 0,16 mg = 160 μ g 3,325 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	
ArsR7 fw.: M=9,5902 g/mol ; n=22,2 nmol 0,1M $\leftarrow$ +222 μ l SDV	222 μ l $\rightarrow$ 0,21 mg = 210 μ g 2,114 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	} 2,92 μ l fw. + 2,92 μ l rev. + 44,16 μ l A. puffer
ArsR7 rev.: M=6,973 g/mol ; n=23,3 nmol 0,1M $\leftarrow$ +233 μ l SDV	233 μ l $\rightarrow$ 0,16 mg = 160 μ g 2,9125 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	
ArsR9 fw.: M=11,493 g/mol ; n=28,3 nmol 0,1M $\leftarrow$ +283 μ l SDV	283 μ l $\rightarrow$ 0,33 mg = 330 μ g 1,6969 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	} 2,26 μ l fw. + 2,26 μ l rev. + 46,48 μ l A. puffer
ArsR9 rev.: M=8,777 g/mol ; n=24,8 nmol 0,1M $\leftarrow$ +248 μ l SDV	248 μ l $\rightarrow$ 0,22 mg = 220 μ g 2,2545 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	
ArsR10 fw.: M=12,299 g/mol ; n=23,6 nmol 0,1M $\leftarrow$ +236 μ l SDV	236 μ l $\rightarrow$ 0,29 mg = 290 μ g 1,63 μ l $\rightarrow$ 2 μ g	} 2 μ l fw. + 2 μ l rev. + 46 μ l A. puffer
ArsR10 rev.: M=9,827 g/mol ; n=18,1 nmol 0,1M $\rightarrow$ +181 μ l SDV	181 μ l $\rightarrow$ 0,18 mg = 180 μ g 2,01 μ l $\leftarrow$ 2 μ g	

4.4. ábra: A számolás menete az oligok anellálásához

A 4.4. ábrán kékkel jelzett térfogatok összemérése után a csöveket lezártam és **95 C°**-on fűtőblokkban 5 percig inkubáltam. A blokkot kikapcsoltam és hagytam lassan lehűlni 50 percig. Lehűlés közben a 4.5. ábrán látható módon kialakulhattak a szálak közötti hidrogénkötések és így a tapadós végekkel rendelkező kész inzertek.



4.5. ábra: A négy rövid oligopeptidet kódoló inzert (gén)

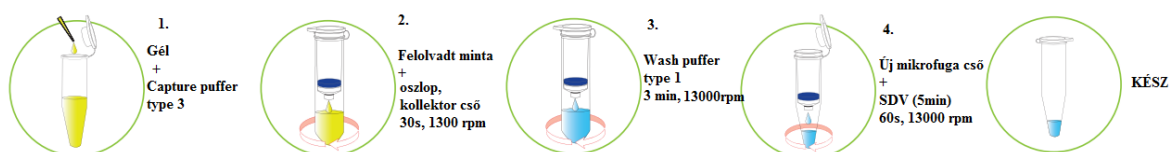
4.1.5. A plazmid restrikciós emésztése

A 4.1.2. fejezetben leírt módon kinyert plazmidban (4.2.(b) ábra) négy darab vágóhely található (XhoI, AgeI, SmaI/XmaI, SacI). Mivel a beépíteni kívánt DNS szakaszokat XhoI és

SacI-re terveztem meg, ezért a befogadó cirkuláris vektort is ezzel a két enzimmel kellett megemésztennem. Ezt úgy hajtottam végre, hogy párhuzamosan 1-1 PCR-csőbe bemértem az alábbi térfogatokat, 4 µl vektort, 4 µl steril desztillált vizet, 1 µl Cut Smart puffert, továbbá 0,5 µl XhoI és 0,5 µl SacI enzimet. Az enzimeket folyamatos jégen (0 °C) tartottam és a használat utáni gyorsan visszahelyeztem -20 °C-ra. Az összeállított elegyeket PCR készülékbe helyeztem és 1,5 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, majd agaróz gélen megfuttattam a mintákat.

4.1.5.1. Emésztett termék kinyerése

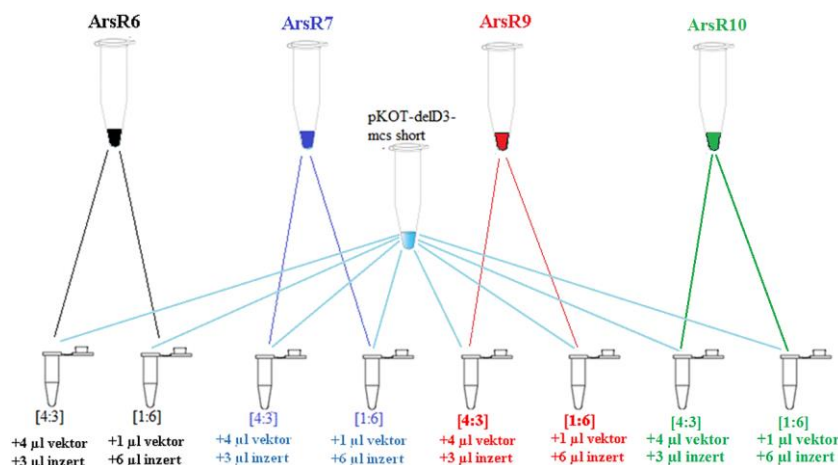
A PCR csöveket jégre raktam és mindegyikhez hozzáadtam 2 µl **6x Orange DNA Loading Dye** festéket, majd az egyenkénti 12 µl térfogatú mintákat agaróz gél zsebeibe pipettáztam. 1%-os gélben 100 V-on futtattam. A ligálás előtt az emésztett plazmidokat ki kellett nyernem agaróz gélből. Az agaróz gélből UV fénnel alulról megvilágítva kivágtam a megfelelő sávokat (5.1. ábra, XhoI SacI sáv), majd azokat **Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit** direkt agaróz gélből való plazmid kinyerésre alkalmas protokollját követve végeztem el a tisztítást. Ehhez elsőként meg kellett határoznom a kivágott gél darabok tömegét, és ennek megfelelő mennyiségű Capture puffert type 3-t hozzáadva 60 °C-os vízfürdőbe helyeztem a gél teljes felolvadásiáig. Ezután a kitben található oszlopra pipettáztam a felolvasztott gél teljes térfogatot. 60 s várakozás után 30 másodpercig 15600 g-n centrifugáltam, majd eltávolítottam az átfolyó oldatot. Az oszlopra vittem 500 µl Wash puffer type 1-t és további 3 percig centrifugáltam szintén 15600 g-n. Az oszlopot átraktam egy új mikrofuga csőbe és 35 µl steril desztillált vízzel 13000-es percenkénti fordulatszámon 60 másodperc alatt eluáltam a plazmid oldatot (4.6. ábra).



4.6. ábra: Gélből való plazmid kinyerés fő lépései

4.1.6. Ligálás és transzformáció

Az összetapadt oligok tízszeresre hígított oldataiból és a korábban előállított emésztett vektorból 1:6-os és 4:3-as mólarányú keveréket hoztam létre a ligálási reakcióhoz. Ennek menetét a 4.7. ábra szemlélteti. A pH stabilizálása érdekében az enzim hozzáadását megelőzően minden PCR csőbe beleraktam 2 µl puffert.



4.7. ábra: Ligálási arányok összeállítása

A nukleinsav fragmentumok közötti foszfodiészter-kötések létrehozásához T4-ligázt használtam, melyből 1 µl-t raktam az elegyekhez, majd 22 °C hőmérsékleten, 10 percig ligáltam. A ligálás után az oldatból 5 µl-t hozzáadtam, 50 µl TOP10 szuperkompetens sejtekhez. A ligálás terméket és az *E.coli* sejteket tartalmazó Eppendorf csövet, 30 percre jégre tettem, majd hirtelen áthelyeztem 42 °C-ra, 1 perc 30 másodperc erejéig. Az így keltett hő sok hatására a kompetens baktérium sejtmembránja fluidabbá válik, amely lehetővé tette a DNS, citoplazmába jutását. Ennek időtartamát és sikerességét nagyban befolyásolja a használt cső minősége és vastagsága. A 42 °C-os hő sok után a szuszpenziót újra visszahelyeztem jégre további 2 percre, hogy a sejtmembrán visszaállhasson eredeti állapotába és a bejuttatott plazmid ne tudjon kifelé diffundálni. A 2 perces jégen történő inkubálás után 500 µl 42 °C-os SOC tápoldatot veszteség nélkül hozzáadtam a transzformált elegyekhez, majd 45 percre 37 °C-ra rázó inkubátorba tettem (280 rpm) őket. Utolsó lépésként lamináris boks alatt a teljes elegyet átvittem szilárd, ampicillines LB táptalajra. A baktérium szuszpenziók megfelelő szélesztése után pedig 16 órán át 37 °C-on inkubáltam a táplemezeket. A táplemezekről átvittem 2 ml, 0,1%(v/v) ampicillint tartalmazó folyékony LB tápoldatba. 15 órás növesztés után minden 500 µl sejtenyészethez 116 µl 80% (v/v) glicerint adtam, majd -80°C-on tároltam a sejteket.

4.1.7. Génkonstrukciók ellenőrzése

A -80 °C-on tárolt glicerines törzsekből átvittem folyékony ampicillines LB tápoldatba, ahonnan 16 órás növesztést követően újabb plazmid DNS tisztítást végeztem. A négy módosított plazmidból 3-3 párhuzamos mintával végeztem el az emésztést. Minden PCR csőhöz hozzáadtam 2 µl-t a megfelelő vektorból, 6,5 µl steril desztillált vizet, 1 µl Cut Smart

puffert és a jégen tartott enzimeket. Az elegyeket úgy állítottam össze, hogy egyféle plazmidot tartalmazó mintákhoz külön PCR csövekbe egyenként 0,5 µl egyfajta restriktációs endonukleázt pipettáztam. A megfelelő hőátadás érdekében PCR készülékben végeztem az emésztés (37 °C, 1 óra). Ezután a csövek tartalmához 2µl **6xOrange DNA Loading Dye**-t adtam hozzá. Az emésztés eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem 1%-os gélen. Minden emésztett minta mellé raktam negatív kontrollt az emésztetlen vektorból is (2 µl vektor, 3 µl SDV, 1 µl 6xOrange DNA Loading Dye). Fél óráig 100mV-on futtattam mindkét gélt **Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder** marker mellett. A gélkép alapján megfelelőnek látszó génkonstrukciók közül mind a négy variánsból a teljes bizonyosság érdekében egyet-egyet elküldtem szekvenálni. Ehhez Eppendorf csövekbe pipettáztam 5-5 µl FliC D szp primert és hozzáadtam ugyanakkora térfogatot (5 µl) a szekvenálni kívánt plazmidokból.

4.2. Módosított plazmidok bejuttatása *Salmonella* baktériumokba

A DNS kinyerés (4.1.2. fejezetben leírtaknak megfelelően) és annak ellenőrzése után következhetett a vektorok flagellin deficiens *Salmonella* (SJW2536) baktériumokba juttatása. Elsőként jégen előhűtöttem a kivett baktériumokat és a DNS oldatot, a küvétát és 0,5ml LB tápoldatot. Két perc elteltével mind a négy variáns esetében 50 µl elektrokompetens SJW2536-hoz 2 µl plazmidot pipettáztam, majd óvatosan homogenizáltam és ismételten jégre tettem. Újabb egy perc elteltével a teljes térfogatot óvatos szuszpendáltatás mellett átpipettáztam az előhűtött küvétába. Elektromos ív-kisülés elkerülésének érdekében az oldalait, különösen a fém részét gondosan szárazra töröltem. A műszeren beállítottam a megfelelő programot (2500 V, 10 ms, 2mm, Time Constant), majd a sikeres feszültség impulzus után hozzáadtam 500 µl LB tápoldatot és a teljes szuszpenzió tartalmát átpipettáztam egy steril tenyészcsőbe. Ezután 37 °C-on, 60 percig inkubáltam 275 rpm rázatás mellett. A szélesztéshez Petri-csészére a szuszpenzió kb. 50-400 µl arányával oltottam át lamináris box alatt, majd 16 órán keresztül növesztettem a sejteket 37 °C-on. Végül a 4.1.6. fejezetben leírt módon ezekből is raktam el glicerines törzseket.

4.3. In vivo polimerizációs képesség vizsgálata

A *Salmonella* baktériumok a tápközegben csak akkor képesek úszni, ha az As(III)-kötő motívumokat tartalmazó flagellinek filamentummá tudnak polimerizálódni a sejtfelszínen. A baktériumok mozgása már negyvenszeres nagyításban is jól látszik, ezért sötétlátóterű

fénymikroszkóppal vizsgálható. Ennek tanulmányozására a módosított fehérjét kódoló plazmidokkal elektroporáltam (4.2. fejezetben leírtak alapján) flagellin deficiens *Salmonella typhimurium* (SJW2536) törzset, melyet aztán ampicillines agarlemezre szélesztettem. Ezt követően mindegyik táplemezeről átoltottam 2-2 kolóniát, egyenként 5 ml folyékony LB-t és 2 µl ampicillint tartalmazó tenyészcsovekbe, majd 37 °C-on és 275 rpm-en inkubáltam őket. 15 óra elteltével, sötétlátóterű mikroszkóppal vizsgáltam a baktériumok úszási képességét.

A vizuális vizsgálat alátámasztására Malapaka és munkatársai által leírt motilitás tesztet végeztem el [38]. Ehhez folyékonyabb állagú, speciális összetételű 10 g/l tripton, 5 g/l NaCl, és 0,3% (w/v) agart tartalmazó táplemezeket készítettem el. A kísérletek során FliC-ArsR10, FliC-ArsR9, FliC-ArsR7 és FliC-ArsR6 flagellint termelő baktériumok úszási képességét vizsgáltam meg. A tesztekhez pozitív kontrollként motilis, D3 domén nélküli flagellinnel rendelkező *Salmonella typhimurium* törzset használtam. Negatív kontrollként pedig szintén egy *Salmonella typhimurium* törzset alkalmaztam, melynek flagellinje egyenes filamentumot épít, ezért nem képes az úszásra. Az imént felsorolt baktériumok elrakott glicerines törzseiből 2 ml ampicillines LB tápoldatba oltottam át, majd 15 órás (37°C, 275 rpm) növesztés után megmértem azok optikai denzitását. A kapott abszorbancia értékek alapján a szükséges esetekben hígításokat végeztem, majd a sejttenyészetekből 3 µl-t cseppentettem a motilitás lemezek három/négy egymástól távol eső részeire, úgy hogy minden lemez tartalmazzon egy pozitív és egy negatív kontrollt is a vizsgálandó minta mellett. Ezt követően 37°C-on 14 órán keresztül inkubáltam a lemezeket.

A baktérium felszínén történő filamentum építés direkt megfigyeléshez elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végrehajtottam. A FliC-ArsR9 és FliC-ArsR10 flagellint termelő baktériumokat növesztettem 1 ml LB tápoldatban (15 óra, 37 °C, 275 rpm). A baktérium szuszpenziókat 3000 g-n 4 perc alatt lecentrifugáltam és a kapott csapadékokat sómentes foszfát pufferrel szuszpendáltam (PB, 7,00 pH). A rézből készült, szén hártáival rendelkező gridek felületére az enyhén opálos szuszpenziókból és a negatív festéshez használt 2%-os PTA (foszfor-wolfrámsav)-ból is 5 µl-t cseppentettem. Két perc várakozás után szűrőpapírral leitattam felületen lévő folyadékot, végezetül pedig 1 percig infravörös lámpa alatt tartva a maradék nedvessége is eltávolítottam. Az elkészített mintákat Talos F200X G2 típusú FEG S/TEM elektronmikroszkóppal vizsgáltuk TEM üzemmódban.

4.4. Arzén(III)-kötő flagellinek termelődésének és felhalmozódási helyének meghatározása, probaexpresszió

Ampicillint tartalmazó 3 ml LB tápoldatot átoltottam az elkészített plazmidokkal elektroporált flagellin deficiens *Salmonella* baktérium törzsszel. A felnövesztést követően a baktérium szuszpenzióból átpipettáztam 1,5 ml-t ultracentrifuga, 1 ml-t pedig Eppendorf csőbe.

A 1,5 ml-es mintát 266000 xg-n (70 000 rpm) (10°C-on) 15 percig centrifugáltam, melynek során a baktériumok és a leszakadt filamentumok, valamint a filamentum kötegek is leülepednek. A felülúszóban így már csak monomer formában maradhettek fehérjék. A felülúszó 1 ml-éhez hozzáadtam 67 µl triklór-ecetsav oldatot (57,1 g TCA, 25,9 ml H₂O), majd az elegyet 15 percre jégre raktam. A TCA-val irreverzibilisen denaturáltam a fehérjéket, majd az oldatot 10000 xg-n 5 percig centrifugáltam 6 °C-on és a keletkező csapadékot kétszer átmostam 300 µl acetonnal. Mindkét acetonos mosás után 10000 xg-n 5 percig centrifugáltam és a felülúszó eltávolítását követően 37 °C-os inkubátorban hagytam teljesen elpárologni a hátramaradt aceton nyomokat. A szárított csapadékot végezetül feloldottam 18 µl SDS minta- és 2 µl Trisz-EDTA (pH=8) pufferben.

A baktérium szuszpenzióból vett 1 ml-es mintából meghatároztam, hogy épülnek-e filamentumok a baktériumok felszínén. Fél órás centrifugálással 6000 xg-n csapadékba vittem a sejteket, eltávolítottam a felülúszót, majd felszuszpendáltam a baktérium csapadékot 195 µl (20 mM Trisz, 150 mM NaCl, 7,8 pH) pufferrel, 2 mM DTT (ditiotreitolt, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol) redukálószer mellett. A sejtek felszínén maradt filamentumokat 10 perc alatt, 70 °C-os vízfürdőben monomerizáltam, és 266000 xg-n (70 000 rpm) 30 percig centrifugáltam. Ekkor a baktérium csapadékban már csak az a fehérje maradhatott, ami nem jutott ki a sejtől. A felülúszóba került fehérjék mennyisége pedig mutatni fogja a baktérium felszínén filamentum formában lévő flagellinek mennyiségét. A csapadékot feloldottam 200 µl (20 mM Trisz, 150 mM NaCl, 7,8 pH) pufferrel, amiből kivettem 20 µl-t. Ehhez és a felülúszó 20 µl-éhez hozzáadtam 20 µl SDS mintapuffert, ezt követően pedig a TCA-s kicsapás eredményeül kapott eleggyel együtt lobogó vízfürdőben 10 percig forraltam az oldatokat, amivel denaturáltam a bennük lévő fehérjéket az SDS-PAGE-hez. Az 12,5%-os szeparáló gélhez összemértem 12,5 ml, literenként 182 g Trisz-HCl-t és 4 g nátrium-dodecilszulfátot tartalmazó oldathoz (**A oldat**, 8,8 pH) 15,75 ml 40%-os akrilamid oldatot (**C oldat**), valamint 21,75 ml desztillált vizet. Ebből egy gél elkészítéséhez kivettem 4 ml-t és hozzáadtam 2 µl TEMED-et és 20 µl 10%-os ammónium-perszulfátot (**APS**), majd a két

üveglap közé pipettáztam a homogenizált oldatot. A felső gélhez szükségem volt 6,3 ml, literenként 61g Trisz-HCl-t és 4 g SDS-t tartalmazó **B** -, 2,825 ml **C** oldatra és 15,9 ml H₂O -ra. Ennek 1,67 ml-éhez hozzámértem 2 µl TEMED-et, 10 µl APS-t, amit aztán a megkötött alsó gél fölé rétegeztem és belehelyeztem a „fésűt”. A megkötött gél futtatókádba helyeztem és feltöltöttem futtató pufferrel. A gél első zsebébe 3 µl **Pierce™ Prestained Protein MW Markert**, a többibe pedig a forralt mintákból egyenként 8 µl-t pipettáztam. Az elektroforézist 30 mA-en végeztem, 36 percig. A gél ezután 1,5 órára áthelyeztem festő oldatba (Coomassie R-250), végezetül pedig további 1 órára előhívó oldatban tartottam a gél.

4.5. Nagy mennyiségű fehérje termeltetés és tisztítás, mint aerob fermentáció

A módosított flagellin fehérjék nagy mennyiségű előállítása és kinyerése egy egyszerű aerob fermentációnak tekinthető.

4.5.1. Az elvégzett aerob fermentáció „UPSTREAM” szakasza

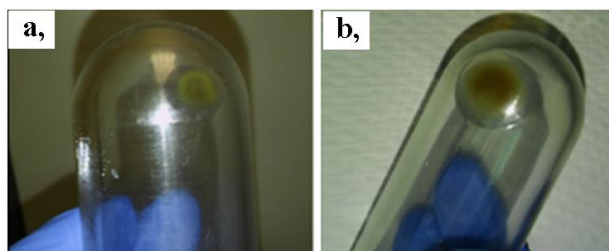
Egy fermentációs folyamat első lépése mindig a megfelelő mikroba kiválasztása. Munkám során a FliC-ArsR9 flagellint termelő Salmonella törzzsel dolgoztam. Mivel ez esetben a sejtnövekedés/szaporodás megegyezett a kívánt termék képződésével és a baktérium tápanyagigénye is viszonylag egyszerű volt, ezért 3% élesztő kivonatot tartalmazó tápoldatban végeztem a baktériumok növesztését.

A táptalaj kiválasztását követően elkezdtem az inokulum készítést. Először 5 ml tápoldatot oltottam át a -80°C-on tárolt glicerines törzsből, majd így végeztem növesztést 37°C-on 250 rpm rázatás mellett 15 órán keresztül. Az így felnőtt sejttömeget átraktam 100 ml tápoldatba, amit az előzővel megegyező hőmérséklet és rázatás mellett történő 5 órás növesztés után vittem tovább. A végső, nagy térfogatú növesztést frissen sterilizett 5% YE-t tartalmazó 2 literes tápoldatban végeztem el 90 rpm kevertetés és 37°C hőmérséklet mellett 14 óra alatt, amihez inokulumként a 100 ml-nyi sejttenyészetet használtam. Itt már külső levegőztetésre volt szükség, ezért az ehhez használt eszközök (csövek, illesztő alkatrészek, szűrő) sterilitásáról is gondoskodnom kellett. Az összes növesztési lépésben ampicillin antibiotikumot használtam a megfelelő szelektálás érdekében. Ehhez 100 mg/ml, szűrt ampicillin törzsoldatot készítettem, amit aztán 0,1 v/v % arányban alkalmaztam a folyamat során. UV-VIS spektrofotométerrel történő monitorozással folyamatosan nyomon követtem az oldat optikai denzitását, ami a kialakult sejttömegről nyújtott információt. Ezen kívül az inokulum készítés közben és a fermentáció végén is ellenőriztem a sejtek állapotát

sötétlátóterű fénymikroszkóp segítségével. A fermentációs folyamat upstream szakasza a nagyjából 1,2-es abszorbancia érték elérése után zárul, ekkor állítottam le a levegőztetést és a rázatást.

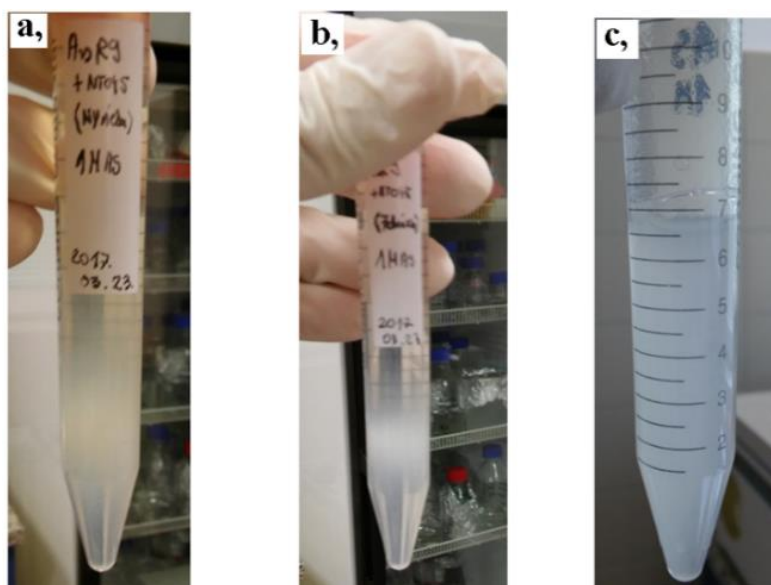
4.5.2. Az elvégzett aerob fermentáció „DOWNSTREAM” szakasza

A fermentációs folyamat downstream szakasza jelenti a „vágás” utáni lépéseket, tehát a termék kinyerését, tisztítását, felhasználható állapotba hozását. A fehérje izolálás első lépéseként 10°C-on és 4300 xg-n (4500 rpm), 30 percig centrifugáltam a sejteket. A leválasztott felülúszóhoz hozzáadtam 2% polietilén-glikolt (PEG6000) és 1% nátrium-kloridot, amit aztán 20°C-ra helyezve 50 rpm-en kevertettem 40 percig. Ezzel a lépéssel céloim a leszakadt polimerek „összegyűjtése” volt, amiket 10°C-on, 15 percig tartó 22000 xg-s (12000 rpm) centrifugálással nyertem ki csapadék formájában. A tisztítási folyamat szuszpendálási lépéseihez 7,8 pH-jú, puffert (20 mM Trisz, 150 mM NaCl) alkalmaztam 50 mM DTT használata mellett. Erre a redukálószerre azért volt szükség, mert a módosított fehérjék As(III)-kötéséért felelős részén három cisztein aminosav található, melynek oldalláncán lévő SH-csoportok oxidációja következtében egyébként diszulfid-hidak képződnének, amik nehezítenék a későbbi tisztítási folyamatot. A centrifugált sejteket 100 ml pufferben vettem fel, majd pedig egy többszörös turmixolási megoldással távolítottam el róluk a filamentumokat. Annak érdekében, hogy a sejtek fala lehetőleg minél kevésbé sérüljön a túlhevülés következtében, minden turmixolás között 2 percre jégre helyeztem a sejteket. Az így kezelt sejt szuszpenziót 6 °C-on, 10000 xg-n (8500 rpm) fél óráig centrifugáltam és a felülúszóval dolgoztam tovább, amit 10°C-on, 178000 xg-n (40 000 rpm) ismét lecentrifugáltam 35 perc alatt. Ezzel hozzájutottam a 4.8.(a) ábrán látható, baktérium törmeléket részben tartalmazó, a baktérium felszínén filamentumot építő fehérjékhez csapadék formában, amit aztán újra felvettem 10 ml pufferben és 10°C-on 266000 xg-vel (70 000 rpm), 30 perc alatt lecentrifugáltam. A PEG-ezés után kapott csapadékot 30 ml pufferben vettem fel, majd 10000 xg-vel (8500 rpm), 6°C-on centrifugáltam 40 percig. A munkasorozat itt két részre bomlott, ugyanis a felülúszót és a csapadék felszínén lévő nyálkás réteget is továbbvittem. A felülúszót ismét 178000 xg-n (40 000 rpm), 10 °C-on, 35 percig centrifugáltam így megkaptam a 4.8.(b) ábrán látható eredményt.



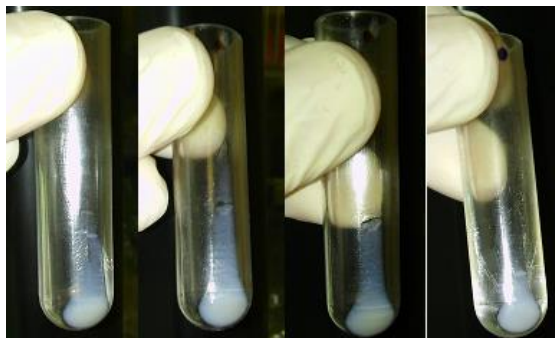
4.8. ábra: A 40 000 rpm-en (178000 xg) történő centrifugálások eredményei

Az ezt követő lépéseket egységesen mindhárom esetben ugyanúgy végeztem el. A csapadék felszínéről leszívott „nyálkás réteget” és a két úton kapott csapadékokat is 10 ml pufferben vettem fel, amiben egy-egy Complete tablettát is feloldottam. A fehérjék ezen a ponton mind, különböző méretű filamentum formában voltak jelen, ezért ügyeltem arra, hogy kellő időt biztosítsak a Complete tablettákban lévő proteáz inhibitoroknak, hatásuk kifejtéséhez, ezzel elkerülve a nem kíván fehérje degradációt. Ez után egy 70°C-on történő 10 perces monomerizálást hajtottam végre, amit egy 266000 xg-s (70 000 rpm) fél órás centrifugálás követett. Ennek során az oldatban a fehérje monomereken kívül minden egyéb összetevő leülepedett, így a felülúszóval tovább dolgozhattam. A következő lépésben ammónium-szulfátot adtam a monomereket tartalmazó oldathoz 1 M koncentrációban, aminek hatására megindult a polimerizáció, melyen folyamatát a 4.9. ábra szemlélteti.



4.9. ábra: (a): A „nyálkás rétegből” kinyert fehérjékből kialakuló polimerizációs gyökök; (b): A második 10000 xg-s centrifugálásból továbbvitt felülúszóból kapott fehérjékből kialakuló polimerizációs gyökök ; (c): A 4300 xg-s centrifugálás csapadékából kinyert fehérjék teljesen polimerizálódott oldata

A nagyjából 3 óra alatt lejátszódó polimerizáció után létrejövő filamentumokat ismét lecentrifugáltam 70 000-es percenkénti fordulatszámom (266000 xg) fél óra alatt (4.10. ábra) és felszuszpendáltam őket a megfelelő mennyiségű pufferrel (a nyálkás réteg esetén ezt kétszer végeztem el).



4.10. ábra: A 70 000 rpm-el (266000 xg) centrifugált polimer csapadékok

Utóbbi két lépést újra megismételtem a megfelelő tisztaság elérése érdekében, majd ismét monomerizáltam a polimereket a korábban leírt módon. Végül a monomerizált oldatokat beraktam egy 70 000 rpm-es (266000 xg), 20 perces centrifugálásra, ami után a felülúszóban lévő fehérje mennyiséget UV-VIS spektrofotométerrel mértem meg. Ezt követően újra polimerizáltam a fehéréket 0,8M ammónium-szulfáttal és ebben a formában tároltam a későbbi felhasználásig.

A leírt fermentációs folyamatot FliC-ArsR10 flagellint termelő *Salmonella* törzs esetén is elvégeztem, azzal a különbséggel, hogy 2000 ml helyett 1000 ml térfogatban végeztem el a sejtek növesztését és a keletkezett csapadékok mennyiségeknek megfelelő térfogatú pufferrel szuszpendáltam fel azokat. A centrifugálási lépések közben mindkét esetben folyamatos mintavételezés mellett kísértem figyelemmel a tisztítási folyamatot, hogy nyomon kövessem az esetleges veszteségeket.

4.6. FliC-ArsR9-As(III) kölcsönhatás vizsgálata izotermális titrációs kalorimetriával

Izotermális titrációs kalorimetriával próbáltam kimérni a FliC-ArsR9 flagellin és a három vegyértékű arzén közötti kölcsönhatást. Munkám során egy VP-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) típusú kaloriméterrel dolgoztam. A mérés előtt a referencia cellában lévő MQ vizet kicseréltem, majd elkészítettem a szükséges oldatokat. A teljes kötési izoterma meghatározott injektáláson belüli megszerzéséhez fontos volt, hogy a titráló oldat a lejátszódó reakciót tekintve tizenkétszeres moláris feleslegben legyen a titrálandóhoz képest [1]. A fehérje tisztítás során használt redukálószer, a DTT ITC-s mérésnél nem alkalmazható. Már kis

koncentrációban is (1 mM) jelentős alapvonalai műterméket okoz, ami a titrálás közbeni háttér oxidációnak köszönhető [39]. Helyette a diszulfid hidak kialakulását megakadályozandó TCEP-t használtam. További előnye a TCEP-nek, hogy nincs elnyelése 280 nm-nél, így nem zavarja a pontos fehérjekoncentráció meghatározást.

A mérés kontrolljaként a számítógéppel vezérelt automata titrátorral arzén-trioxidot (As_2O_3) tartalmazó (0,399 mM) puffert adagoltam a mérőcellában lévő fehérje nélküli pufferhez. Ezt követően 1:12 moláris arányt tartva monomer formában lévő fehérjéket tartalmazó (2,4623 mg/ml) puffert titráltam arzén-trioxidot tartalmazó (0,399 mM) pufferrel. A fehérjét és az As_2O_3 -t is azonos pufferben (2 mM TCEP, 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH=7,00) oldottam fel.

A tapasztalt műhibák elkerülése érdekében a következő méréshez a puffert és a fehérjeoldatot (2,08 mg/ml) dialízissel készítettem elő. Ehhez a flagellin monomereket 20 kDa-os dialízis membráncsőben puffer oldatba helyeztem és lassú keverés mellett 16 órán keresztül dializáltam őket. Kontroll mérésként monomer formában lévő fehérjéket tartalmazó puffert titráltam sima pufferrel, majd szintén a fehérjés puffert titráltam, de már arzén-trioxidot is tartalmazó (0,2868 mM) dialízis pufferrel. A fehérjét és az As_2O_3 -t itt is azonos pufferben (1 mM TCEP, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH=7,00) oldottam.

Az oldatokat betöltés előtt vákuumozással légtelenítettem, az ITC-t vezérlő programban pedig az alábbi paramétereket állítottam be:

- összes injektálás száma: 15 db
- várakozás két injektálás között: 300s
- injektálási időtartam: 10 s
- első injektálás mennyiség: 4 μl
- injektált mennyiségek: 20 μl
- referencia fűtési teljesítmény: 15 $\mu\text{Cal/s}$
- cella (mérés) hőmérséklete: 25 °C

A kapott mérési eredmények alapján módosítottam a program paraméterein és úgy is elvégeztem a kísérleteket. Exoterm reakciónak megfelelő, egymást követő injektálásokból származó hőváltozásokat detektáltam. A kontroll kísérletekkel a hígulásokból származó hőváltozásokat határoztam meg.

4.7. FliC-ArsR9-As(III) kölcsönhatás vizsgálata elektronmikroszkópos elemanalízissel

A FliC-ArsR9 flagellin és az arzén kölcsönhatását elektronmikroszkópos elemanalízissel kíséreltem kimutatni. A fehérjéket a nem kívánt sókristályképződés elkerülése érdekében PB pufferben (pH=7,00) szuszpendáltam 1 mM TCEP mellett. A rézből készült szénhártyával borított grid felületére 0,1 mg/ml koncentrációjú polimer formában lévő fehérje oldatból 3 μ l-t vittem fel. Két perc várakozás után szűrőpapírral leitattam a felületen lévő folyadékot, majd kétszer mostam MQ vízzel. Az IR lámpa alatt megszárított gridre hétszeres moláris feleslegben Na_3AsO_3 oldatból (3,09 $\mu\text{g/ml}$) 3 μ l-t cseppentettem. Három perc után eltávolítottam az oldatot a mikrorostélyról, majd azt kétszer átmostam MQ vízzel és megszárítottam. Talos F200X G2 típusú FEG elektronmikroszkóppal felvételeket készítettünk a mintáról és olyan területeket kerestünk, ahol sok filamentum látható. Ezeket a területeket a filamentum nélküliekkel összehasonlítva lokális összetétel-meghatározást végeztünk el. Azt vizsgáltuk, hogy mérhető-e köztük szignifikáns eltérés az arzénre vonatkozóan. A meghatározás a minta-elektronsugár kölcsönhatása során keletkező karakterisztikus röntgen sugárzások detektálása alapján történt.

A mérést úgy is elvégeztem, hogy a fehérjéket az előzővel megegyező moláris arányban 45 percig inkubáltam Na_3AsO_3 -et tartalmazó PB pufferben 1 mM TCEP mellett. Az így elkészített oldatból 3 μ l-t juttattam a mikrorostélyra, amit 2 perc várakozás után lemostam és megszárítottam.

4.8. Filamentumok rögzítése szenzorikai chip felületen gyakorlati alkalmazáshoz

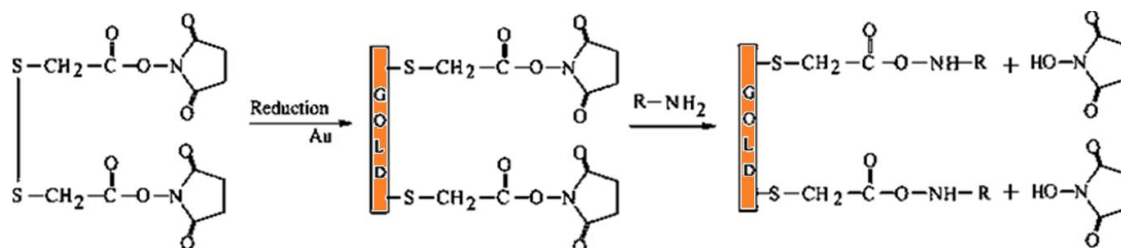
A FliC-ArsR9 flagellint filamentum formában rögzítettük arannyal borított chipek felszínére (4.11. ábra).



4.11. ábra: A rögzítéshez használt chipek

Keresztkötő ágensként DSP-t (Ditiobisz-(szukcinimidil-propionát) használtunk, amit 100% DMSO-ban oldottunk fel 10 mg/ml koncentrációban. A chipeket a kezelendő felülettel

lefelé 2 ml-es Eppendorf-csövekbe helyeztük, és rájuk pipettáztuk a DSP oldatot. Lassú forgatás mellett 90 percig hagytuk, hogy a DSP tiol csoportjain keresztül hozzákötődjön a felülethez. Ezután először DMSO-val, majd MQ vízzel mostuk a chipek kezelt felületét, majd lefújtuk őket nitrogénnel. A mosást követően a mintákat ismét 2 ml-es Eppendorf-csövekbe helyeztük és ráöntöttük az 1 mM TCEP-t tartalmazó, PBS pufferben (pH=7,4) lévő 0,5 mg/ml koncentrációjú filamentum szuszpenziót. Ekkor történt meg a fehérjék keresztkötő ágenshez való kötődése (4.12. ábra).



4.12. ábra: A DSP arany felülethez kötése s a fehérjék mobilizált DSP-hez kapcsolódása

Három órán át tartó 170 rpm-es forgatás után háromszor átmostuk a chipeket PBS pufferrel minden 10 perc forgatás után puffert cserélve. A létrehozott chipeket PBS pufferrel feltöltött Eppendorf csövekben tároljuk.

Az As(III) – FliC_{Ar}R9 kölcsönhatást filamentumokkal borított chipeken ciklikus voltammetriával tesztelték az MTA EK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetében. A méréseket az általunk javasolt paraméterekkel, 100 mM HEPES, 150 mM NaCl pufferben (pH=7,00) 1 mM DTT jelenlétében végezték. Segédelektrodként platina, referencia elektrodként Ag/AgCl elektródot használtak. A mérés során alkalmazott kezdeti és vég potenciálérték -0,7 és +0,7 V volt az Ag/AgCl elektródhoz viszonyítva.

5. Eredmények és azok kiértékelése

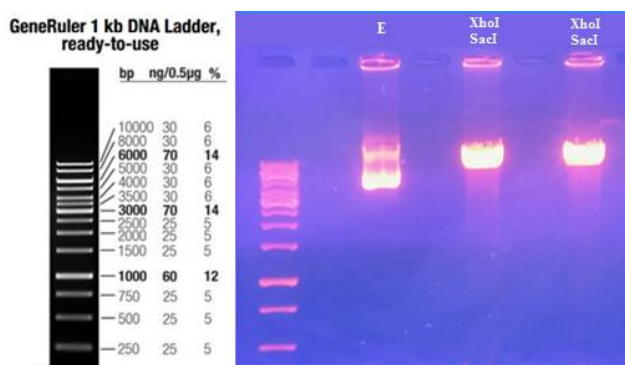
A következő fejezetben a munkám során elvégzett kísérletek eredményeit és azok kiértékelését fogom bemutatni.

5.1. A módosított flagellineket kódoló génkonstrukciók előállításának eredményei

Alábbi fejezet a FliC-ArsR6, FliC-ArsR7, FliC-ArsR9, FliC-ArsR10 fehérjék termeléséhez szükséges DNS szakaszok létrehozásának eredményeit mutatja be.

5.1.1. A plazmid izolálás és az emésztett termék kinyerésének eredménye

A pBR322 alapú plazmid, mely a flagellin génjét hordozza, a D3 domént kódoló DNS szakasz helyén egy többszörös klónozó hellyel 6088 bázispárból áll. UV fény alatt megvizsgálva látható volt (5.1. ábra (E)), hogy megfelelő mennyiségű vektort sikerült kinyerni a „miniprep” segítségével. Ahhoz, hogy az anellált oligonukleotidokat be lehessen építeni az izolált plazmidokba, először létrehoztam a megfelelő ragadós végekkel rendelkező vektorokat.



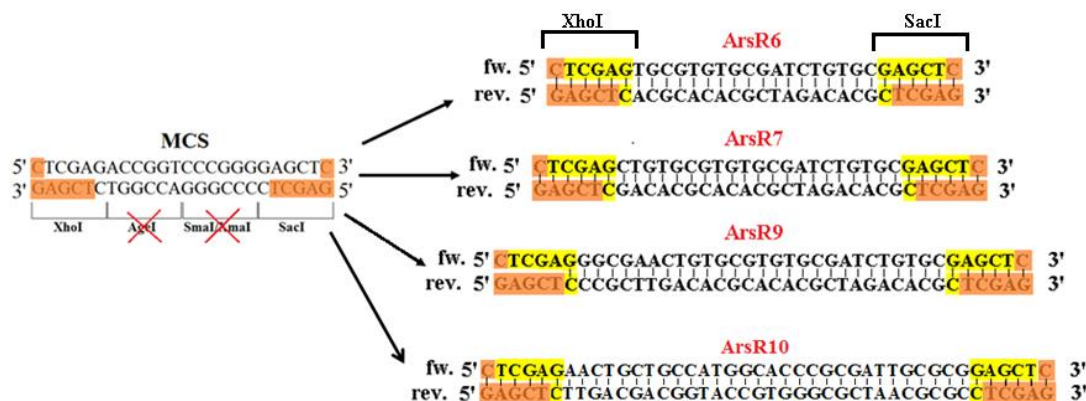
5.1. ábra: Emésztetlen (E), és az emésztett vektorok sávjai (XhoI, SacI)

Az XhoI és SacI restrikciós endonukleázokkal végzett emésztés eredményét az 5.1. ábra (XhoI, SacI) szemlélteti. A gél megvizsgálva észrevehető, hogy az XhoI és a SacI is elvágta a vektorokat, ugyanis a lineárisra vált egy csíkot adó DNS gyorsabban tud haladni gélben, mint a sima cirkuláris és lassabban, mint a szuperhélix forma.

5.1.2. Enzim vágóhelyek ellenőrzésének eredményei

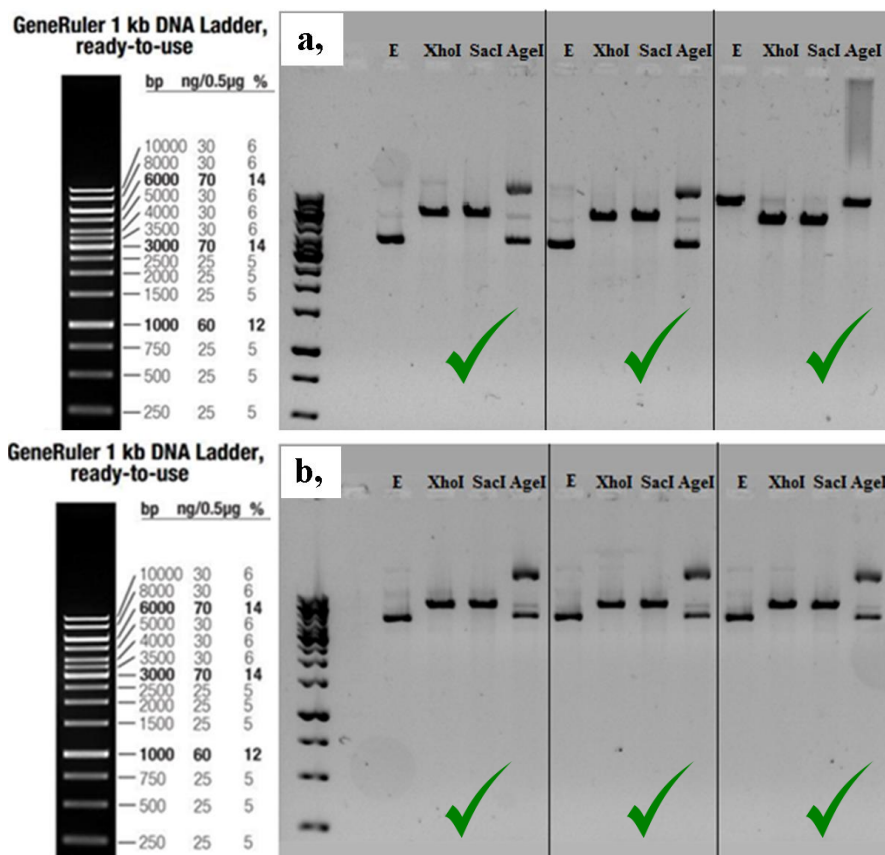
A szekvenálás előtt meg szerettem volna győződni arról, hogy a ligálást követően az As(III)-kötő motívumot kódoló génszakasz valóban beépült a plazmidba. Ezért 3 különböző restrikciós endonukleázt adtam a vektort tartalmazó oldatokhoz. Ezek közül kettőnek (XhoI,

SacI) kell, egynek (AgeI) pedig nem szabad emészteni a helyesen összeépült génkonstrukciókat.



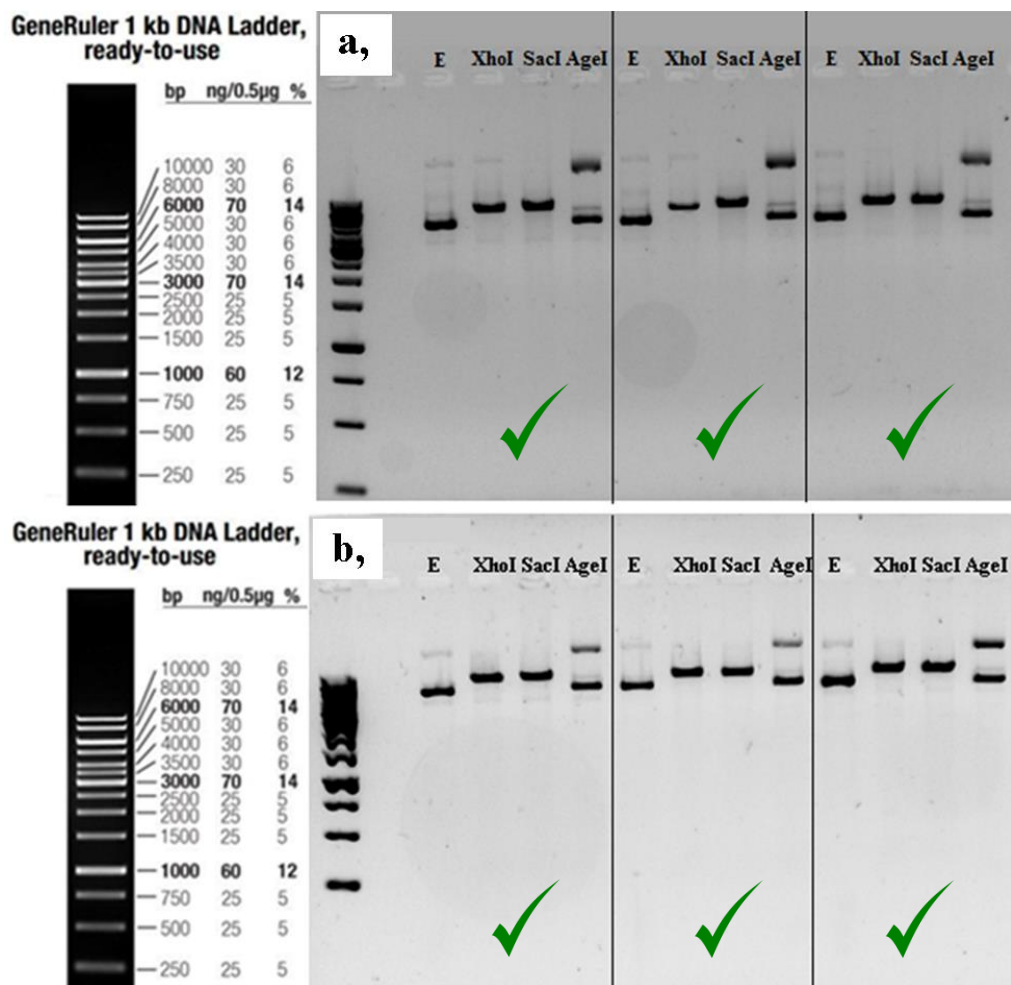
5.2. ábra: Vágóhelyek változása az inzertek beépítését követően

Ennek oka, hogy a négyféle polipeptidet kódoló két DNS szakaszok az eredeti vektor MCS régiójának legszélső vágóhelyei segítségével kerültek beépítésre (5.2. ábra), aminek következményeképp az új konstrukcióból hiányoznia kell a kiindulásiban meglévő 3 vágóhelynek, nevezetesen az SmaI, XmaI és AgeI-nek.



5.3. ábra: Az emésztett (XhoI, SacI, AgeI) és emésztetlen (E) módosított vektorok sávjai.

(a) FliC-ArsR9-t kódoló vektor; (b) FliC-ArsR7-t kódoló vektorok



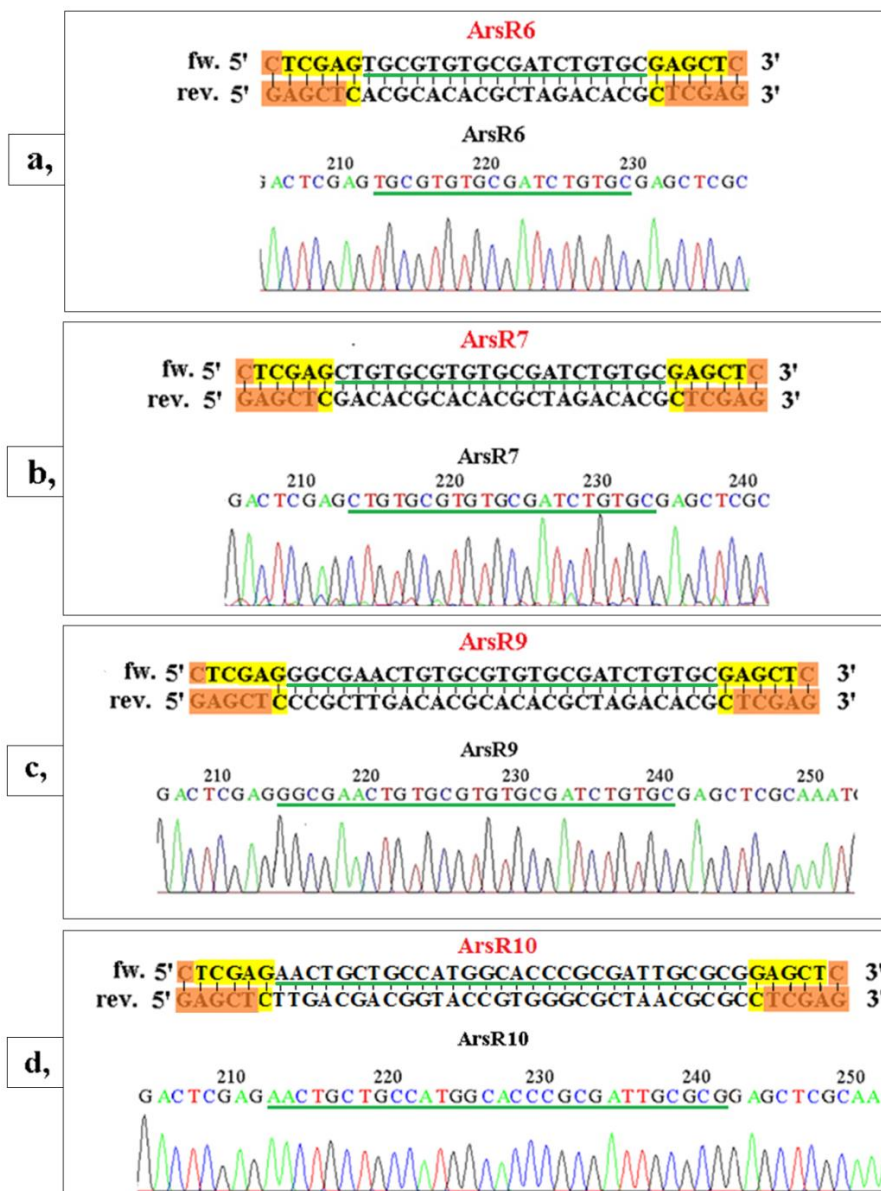
5.4. ábra: Az emésztett (*XhoI*, *SacI*, *AgeI*) és emésztetlen (*E*) módosított vektorok sávjai.

(a) *FliC-ArsR6-t* kódoló vektor; (b) *FliC-ArsR10* flagellint kódoló vektor

A géleképeken (5.3. és 5.4. ábra) megfigyelhető, hogy míg *XhoI*, *SacI*-nek igen, addig *AgeI*-nek nem sikerült elmetesznie a konstrukciókat. Ez abból látszik, hogy az *AgeI*-el kezelt minták sávjaiban a cirkuláris forma két konformációja jelent meg.

5.1.3. A szekvenálás eredményei

A plazmidokhoz hozzáadott *FliC* Dszp egy forward szekvenáló primer, ami a (pKOT-delID3-mcs short) vektor 5076. bázistól számított 20 nukleotidhoz tapad. Mivel az inzertek várt beépülése az 5309. bázistól kezdődik, ezért ez éppen ideálisnak bizonyult. A szekvenálások eredményét az érintett régióban az 5.5. ábra mutatja, amik megerősítették, hogy a génkonstrukciók megfelelőek és az *ArsR6*/*ArsR7*/*ArsR9*/*ArsR10* motívumokat kódoló DNS szakaszt sikeresen klónoztam a flagellin gén D3 doménjének helyére.



5.5. ábra: A négy plazmid szekvenciája a változtatás helyén.

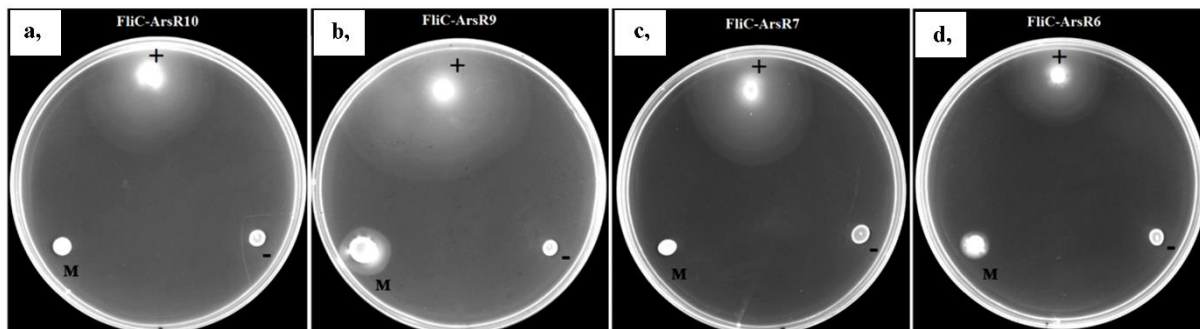
(a) ArsR6; (b) ArsR7; (c) ArsR9; (d) ArsR10 motívumot kódoló DNS szakaszok szekvenciája a vektorokban (zölddel aláhúzva).

5.2. Az *in vivo* polimerizációs képesség vizsgálatának eredménye

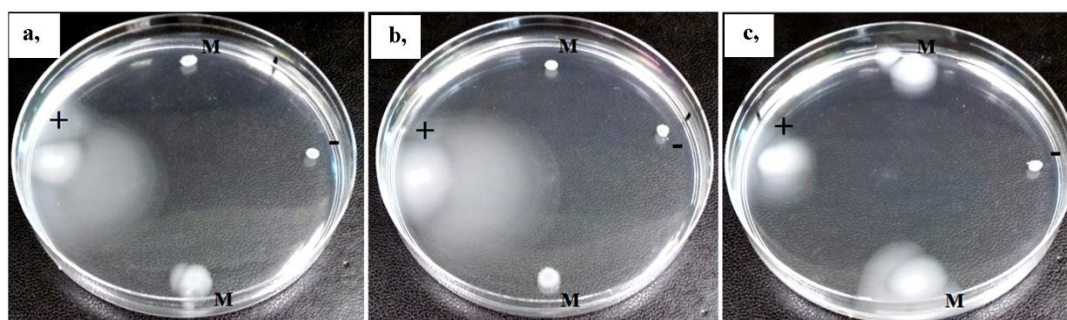
Sötét látóterű fénymikroszkóp alatt vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a vad törzsekhez képest a módosított flagellineket termelők kevésbé mozgékonyak. Nagyrészt egyhelyben forgó és mocorgó egyedek voltak láthatók, azonban a négy génmódosított baktérium közül FliC-ArsR9 flagellinnel rendelkezők esetén jelentős számban megfigyelhetők voltak úszásra képes egyedek is. A jelenségnek több magyarázata is lehet. Az egyik lehetőség, hogy a sejt filamentumot épít a módosított flagellinből, azonban az letörik így a baktérium nem képes

úszni, vagy kitapad a tárgylemezre, ezért egyhelyben forog. Az is lehet, hogy a fehérje bár termelődik, de nem tud exportálódni és bent marad a citoplazmában. Az is előfordulhat, hogy a flagellin monomer formában kijut a sejtől a tápközegbe, filamentum képződése nélkül.

A fénymikroszkóp alatt látottak alátámasztása érdekében elvégzett Malapaka-féle motilitás tesztek eredményei az 5.6. és 5.7. ábrán láthatók.



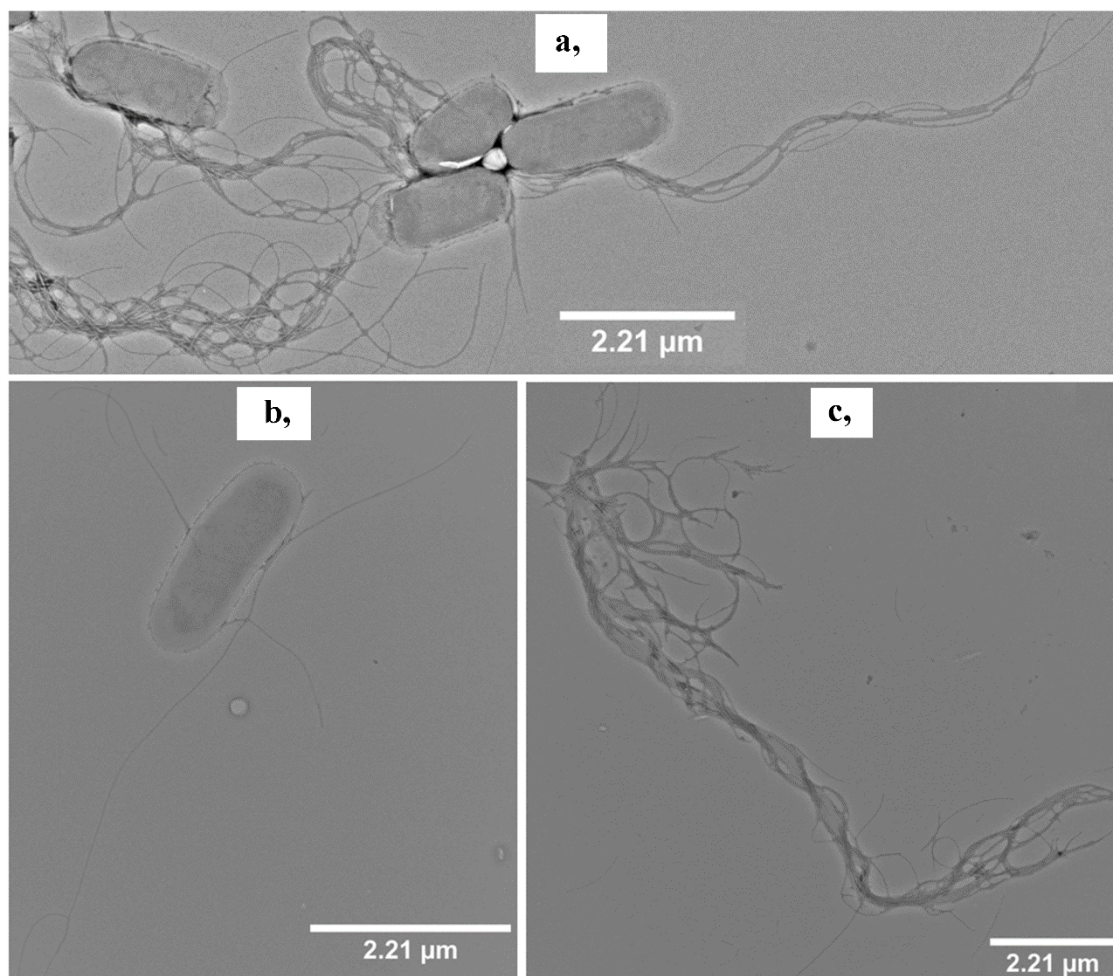
5.6. ábra: A Malapaka-féle motilitás tesztek eredményei. (a) FliC-ArsR10; (b) FliC-ArsR9; (c) FliC-ArsR7; (d) FliC-ArsR6 flagellint termelő baktérium
(M) minta; (-) negatív kontroll; (+) pozitív kontroll



5.7. ábra: A Malapaka-féle motilitás tesztek eredményei. (a) FliC-ArsR6; (b) FliC-ArsR7; (c) FliC-ArsR9 flagellint termelő baktérium
(M) minta; (-) negatív kontroll; (+) pozitív kontroll

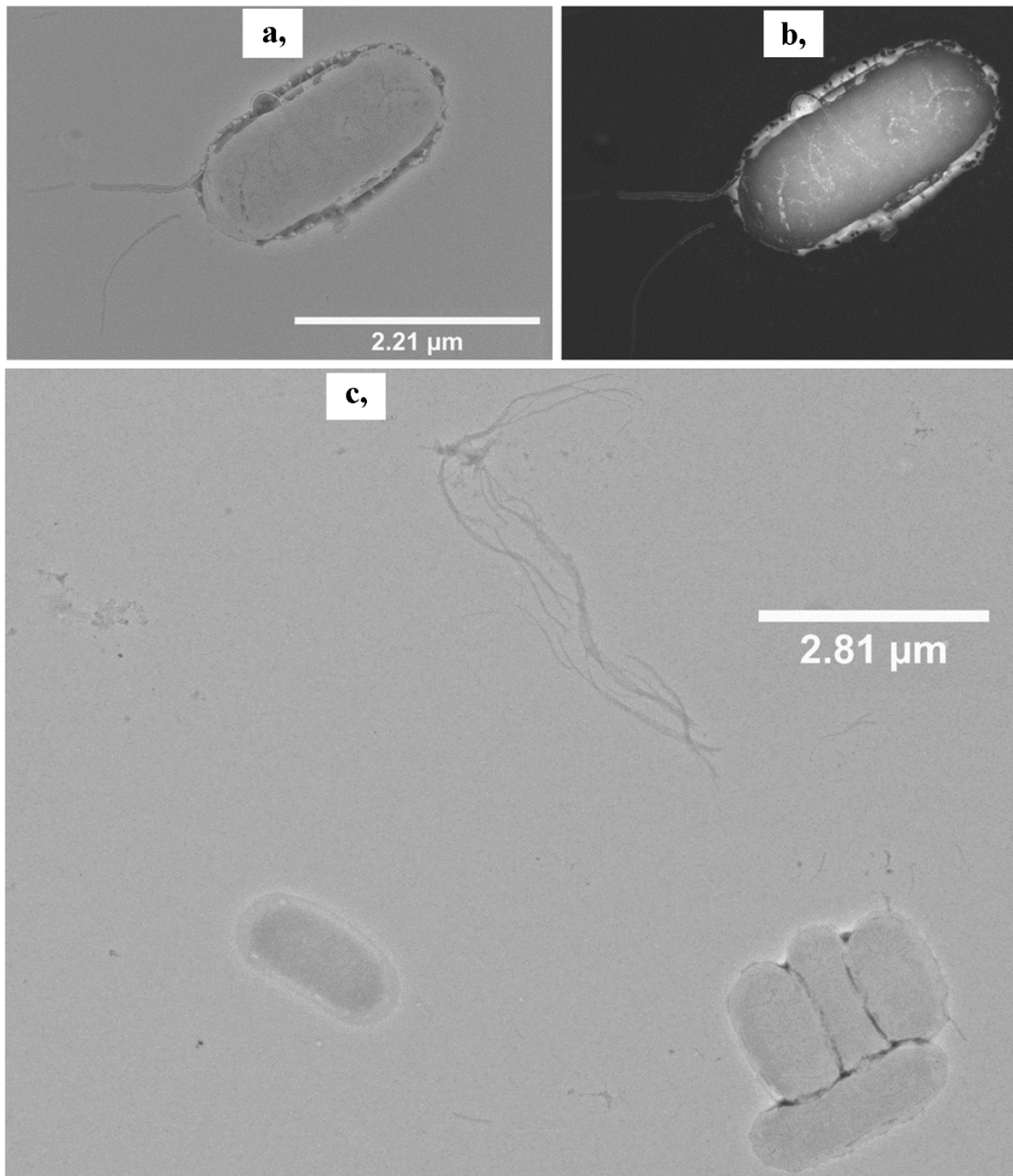
A tesztek eredményei alapján is a FliC-ArsR9 flagellint termelő baktériumok bizonyultak a leginkább motilisnak és az is látható, hogy ugyan kisebb mértékben, de a FliC-ArsR6 flagellinnel rendelkező törzs is képes úszni. A maradék két törzs nem mutatott úszási képességet.

Két különböző (FliC-ArsR10: CCX₅C és FliC-ArsR9: CXCX₂C) fémkötő motívummal rendelkező flagellint termelő baktérium esetén, elektronmikroszkóp alatt is megvizsgáltam a sejtfelszíni filamentum építési képességet.



5.8. ábra: *FliC-ArsR9* flagellint termelő *Salmonella typhimurium* baktériumok (a, b) és a leszakadt filamentum kötegeik (c) világos látóterű TEM felvételei

Az 5.8. ábrán látható, *FliC-ArsR9* flagellint termelő baktériumok transzmissziós üzemmódban készített, világos látóterű elektronmikroszkópos képei alapján bizonyosságot nyert, hogy a módosított fehérjékből nagy mennyiségben épülnek hosszú filamentumok a baktériumok felszínén. A felvételek alapján az is látszik, hogy a filamentumok egy része leszakad a sejtekről, majd az oldatban egymással találkozáva nagy kötegeket hoznak létre. Utóbbi jelenség oka lehet, hogy az As-kötő motívumok mindegyike tartalmaz három ciszteint, melyek között oxidatív tápközegekbe jutva akár intermolekuláris diszulfidhidak is kialakulhatnak. Ez elvezethet a kialakuló filamentumok összetapadásához, ami pedig a flagelláris motor forgása következtében a polimerek letörését is okozhatja.



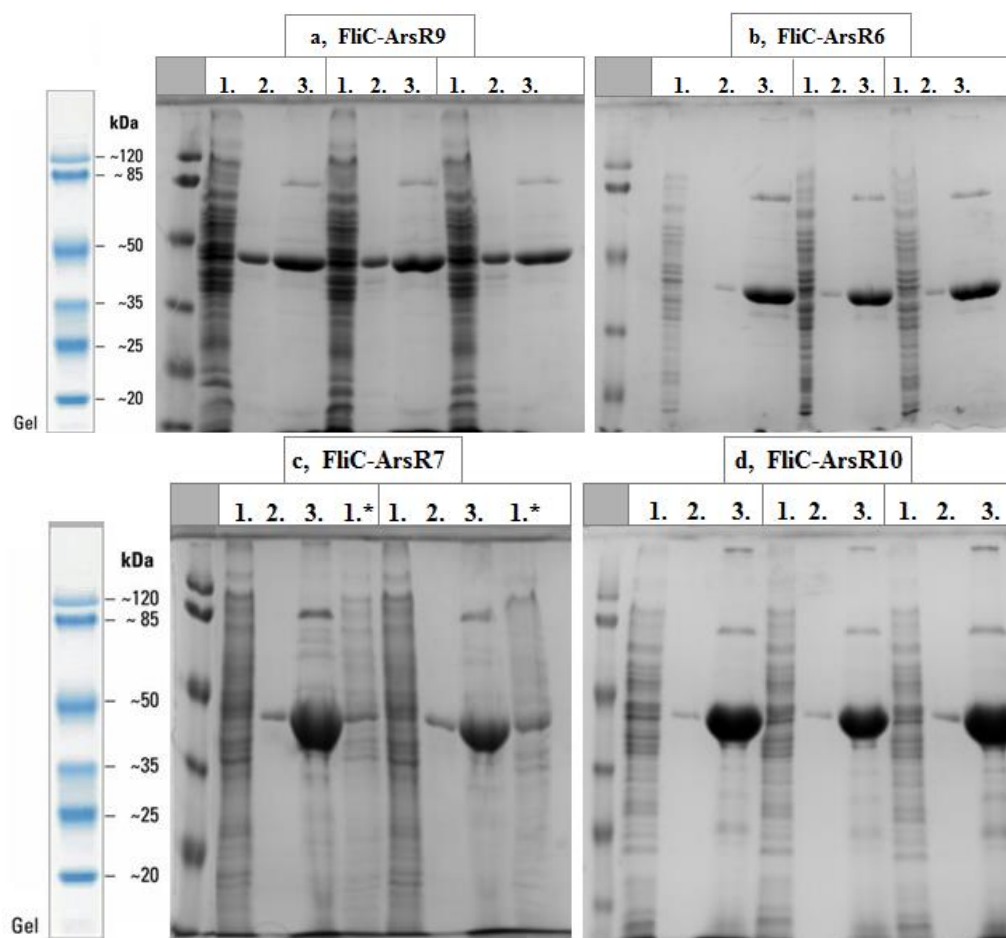
5.9. ábra: *FliC-ArsR10* flagellint termelő *Salmonella typhimurium* baktérium (a, b) és a leszakadt filamentum kötegeik (c) sötét és világos látóterű S/TEM felvételei

A *FliC-ArsR10* flagellint termelő baktériumokról készített elektronmikroszkópos képek (5.9. ábra) alapján az látszik, hogy a *FliC-ArsR9*-hez képes jóval kevesebb és kisebb filamentum van jelen a sejtek felszínén, ami magyarázatot ad a motilitás tesztekben tapasztalt kisebb mozgékonyagra. Szintén kisebb mértékben, de itt is észlelhetők voltak a leszakadt filamentum kötegek. Ez azt jelenti, hogy a baktérium nagy mennyiségben termeli és

exportálja a FliC-ArsR10 fehérjét, ami képes filamentummá polimerizálódni. Ez a megfigyelés jó kiindulás egy hatékony fehérjetisztítási stratégia kidolgozásához.

5.3. Arzén(III)-kötő flagellinek termelődésének és felhalmozódási helyének meghatározása, próbaexpresszió eredménye

A flagellin variánsok molekulatömegét ismerve (5.1 táblázat), az SDS-PAGE eredménye (5.10. ábra) alapján szembetűnő, hogy mind a négy As(III)-kötő variáns esetén nagy mennyiségben termelődnek a fehérjék.



5.10. ábra: (a) FliC-ArsR6-re; (b) FliC-ArsR7; (c) FliC-ArsR69; (d) FliC-ArsR10-re kapott gél kép (1) Baktérium citoszoljában; (2) Baktérium felszínén filamentumként (3) Tápközegbe kijutott fehérjék

Flagellin neve:	Molekulatömeg
FliC-ArsR6	43163.61 Da
FliC-ArsR7	43276.77 Da
FliC-ArsR9	43462.94 Da
FliC-ArsR10	43587.99 Da

5.1. táblázat: A négy flagellin variáns molekulatömege

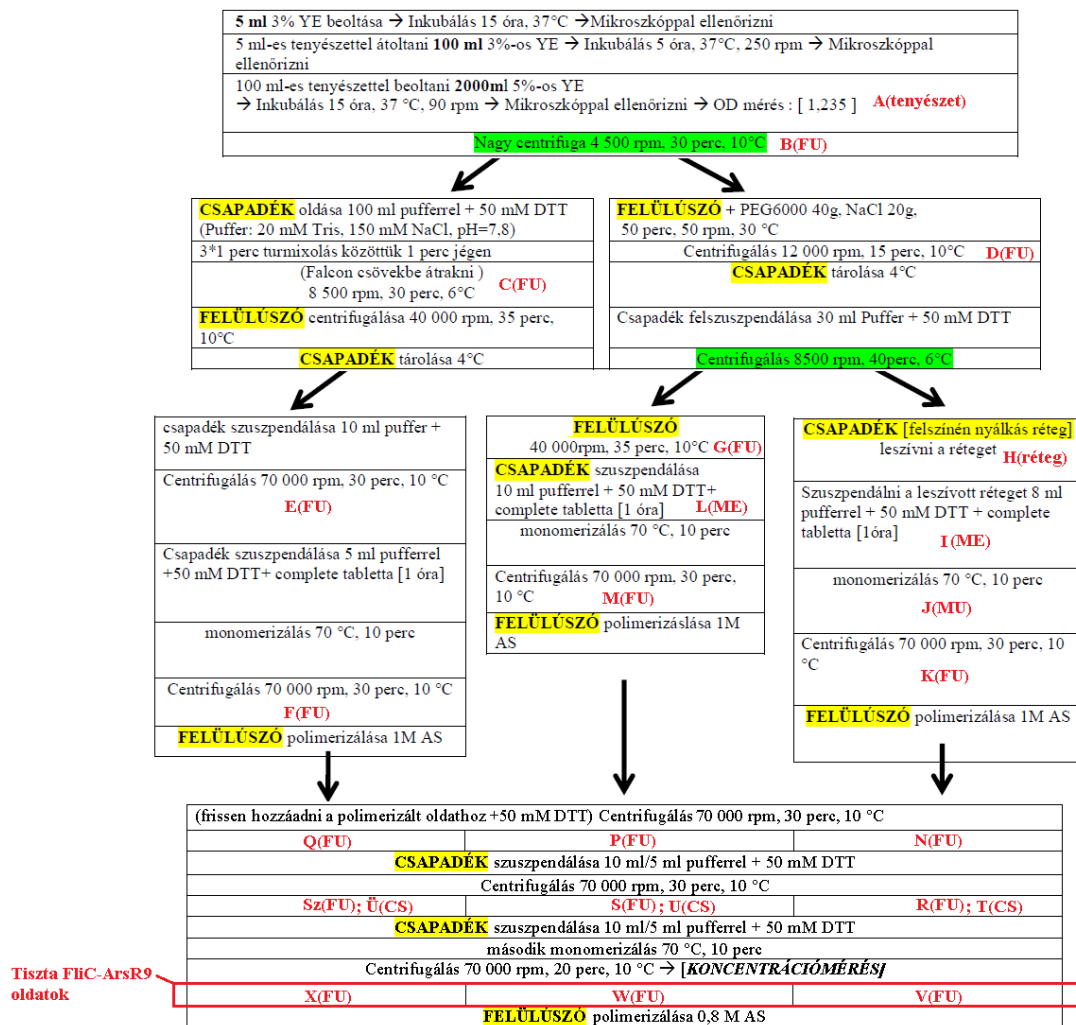
A géleket összehasonlítva látható hogy mind a négy módosított flagellin főként a tápoldatban halmozódik, monomer vagy leszakadt polimer formájában, ami a FliC-ArsR9 esetén a többihez képest jelentősebb filamentum képző képességet is mutat a baktérium felszínén. Ez a későbbi nagy mennyiségű fehérjetisztítás szempontjából fontos információ.

5.4. Nagy mennyiségű fehérje termeltetés és tisztítás eredménye

Mivel a fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatok, valamint a motilitás tesztek és a gélek alapján is FliC-ArsR9 bizonyult a legígéretesebbnek filamentum képzés szempontjából, ezért az ezt termelő baktérium törzzsel végeztem el az első fermentációt, és e fehérje izolálására optimalizáltam egy tisztítási protokollt (5.11. ábra). A későbbi arzén-fehérje kölcsönhatás mérése érdekében ugyanezt a protokollt FliC-ArsR10 esetén is alkalmaztam, hogy rendelkezésemre álljon olyan As(III)-kötő fehérje is, amelyben más elrendezésben vannak jelen a fémkoordinációt biztosító cisztein aminosavak.

Mivel a FliC-ArsR9 fehérjéről kiderült, hogy nagy mennyiségben termelődik, és a főként tápoldatban halmozódnak fel monomer és leszakadt filamentum formában, de a baktériumok felszínén is jelentős mértékben képeznek filamentumot. Ezért egy olyan fehérjetisztítási módszert alkalmaztam, amelynek segítségével a baktériumok felszínén és az oldatban lévő leszakadt filamentum formában lévő fehérje kinyerhető. A vad típusú flagellin tisztítására kidolgozott protokollt használtam kiindulásként és módosítottam a minél nagyobb kitermelés elérése érdekében. A tisztítási folyamat lényege, hogy a fermentléből lecentrifugáljuk a sejteket és turmixolással eltávolítjuk róluk a filamentumaikat. Az sejttenyészetben azonban nem csak a baktériumok felszínén vannak fehérjék, hanem a tápoldatba is kikerülnek monomer és leszakadt polimer formájában. Utóbbiak a sejtek centrifugálása után hátramaradó felülúszóból, PEG6000 (polietilén-glikol) hozzáadásával aggregálhatók és 12000 rpm-en (22000 xg) csapadék formában kinyerhetők némi sejt/sejttörmelék mellett. A leválasztott filamentumok először a 8500 rpm-es (10000 xg) centrifugálás hatására a felülúszóban maradnak, majd a felülúszó 40 000 rpm-es (178000 xg) centrifugálását követően a csapadékba kerülnek. A PEG-ezés után ez nem teljesen valósul meg, mert akkora filamentum kötegek is keletkeznek, melyek a 8500 rpm-es centrifugálás során a sejtek után szintén kiülepednek. Így alakítják kis a csapadék felszínén lévő „nyálkás” réteget. A kapott csapadékok és az úgynevezett nyálkás réteg ekkor még tartalmaznak baktérium törmelékeket. Itt következik a tisztítási folyamat legfontosabb lépése, nevezetesen, hogy a flagelláris filamentum szerkezet 10 perces, 70°C-os hőkezelés hatására monomerjeire esik szét. Így a

szuszpendált csapadékok és a nyálkás réteg 70 000 rpm-es (266000 xg) centrifugálásakor a fehérjék a felülúszóban maradnak, miközben csapadék formájában kiülednek a szennyező anyagok. A felülúszóban maradó fehérjék pedig újra polimerizálhatók oldatban ammónium-szulfát hozzáadásával. Ezt követően a filamentumok többszöri mosásával, majd a monomerizációs-polimerizációs lépést megismételve kellő tisztaságban izolálhatók a fehérjék.



5.11. ábra: A FliC-ArsR9 tisztítására kidolgozott végleges protokoll összefoglalóan

A folyamat során vett minták pirossal jelezve: (FU) felülúszóból vett minta; (MU) monomerizálás előtt vett minta; (ME) monomerizálás után vett minta, (CS) csapadékból vett minta

A tisztítás során vett minták gélképei az 5.12. ábrán láthatók.



5.12. ábra: A FliC-ArsR9 flagellin tisztítása során vett minták 12,5 %-os SDS poliakrilamid gélen

UV-VIS spektrofotometriával határoztam meg tisztított a FliC-ArsR9 oldatok koncentrációját. A fehérjék abszorpciós tulajdonságainak megfelelően a mérést 250 és 330 nm hullámhossztartományban végeztem el, ahol a fehérjék elnyelési maximumát jelentő 280 nm-en mért abszorbancia alapján számítottam ki a végső fehérje koncentrációt. Erre az alábbi képletet (5.1) használtam, az 5.2. táblázatban szereplő adatok és fehérjére jellemző paraméterek behelyettesítésével. A FliC-ArsR9 flagellin moláris abszorpciós koefficiense $10555 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, molekulatömege $43462,94 \text{ Da}$.

$$c \text{ (mg/ml)} = [(Abs\{280 \text{ nm}\} - Abs\{330 \text{ nm}\}) M_W / \epsilon H] / l \quad (5.1.)$$

[A=abszorbancia, ϵ =extinkciós koefficiens ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), M_W =fehérje molekulatömege (Da), H=hígítás mértéke, l=optikai úthossz (1 cm)]

Minta	H	Abs{280nm}	Abs{330nm}	c (mg/ml)	V (cm^3)	m (mg)
V	3X	0,5505	0,0576	6,088	10	60,88
W	1X	0,7666	0,0158	3,092	10	30,92
X	1X	0,9376	0,0291	3,741	5	18,7

5.2. táblázat: A kinyert FliC-ArsR9 mennyiség számításához használt adatok.

A fehérje tisztítás eredményeként összesen $110,5 \text{ mg}$ FliC-ArsR9 flagellint sikerült kinyernem 2 liter nyi térfogatban felnőtt sejtenyészetből. Ez egy meglehetősen jó eredménynek számít, lévén hogy egy flagellin alapú bioszenzor érzékelő elemének elkészítéséhez mindössze pár milligramm fehérje van szükség.

FliC-ArsR10 flagellin tisztítása közben, habár kisebb mértékben, de ugyanazokat a jelenségeket tapasztaltam, mint FliC-ArsR9 esetén. Az első polimerizáció utáni centrifugálást követő szuszpendáláskor egyesítettem a három részből kinyert fehérjéket. A továbbiakban egy

oldatként kezelve őket, a második monomerizálás után mértem meg a fehérje koncentrációját (5.3. táblázat).

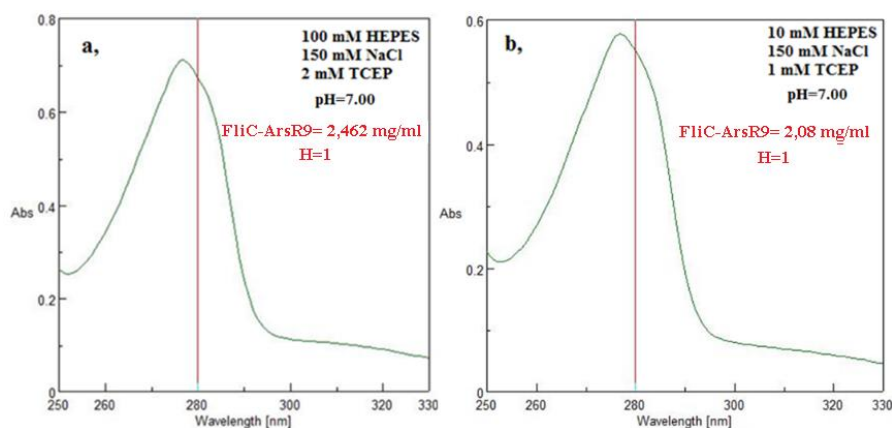
Minta	H	Abs{280nm}	Abs{330nm}	c (mg/ml)	V (cm ³)	m (mg)
FliC-ArsR10	2X	0,643	0,0321	5,046	3,5	17,66

5.3. táblázat: A kinyert FliC-ArsR10 mennyiség számításához használt adatok.

A számításhoz itt is az (5.1.) képletet alkalmaztam a fehérje adatait behelyettesítve ($M = 43587.99$ Da, $\epsilon = 10555$ M⁻¹cm⁻¹), melyek alapján 17,66 mg fehérjét sikerült izolálnom 1 liter sejtenyészetből. Ez nagyjából 32,11%-a FliC-ArsR9 kitermelésének.

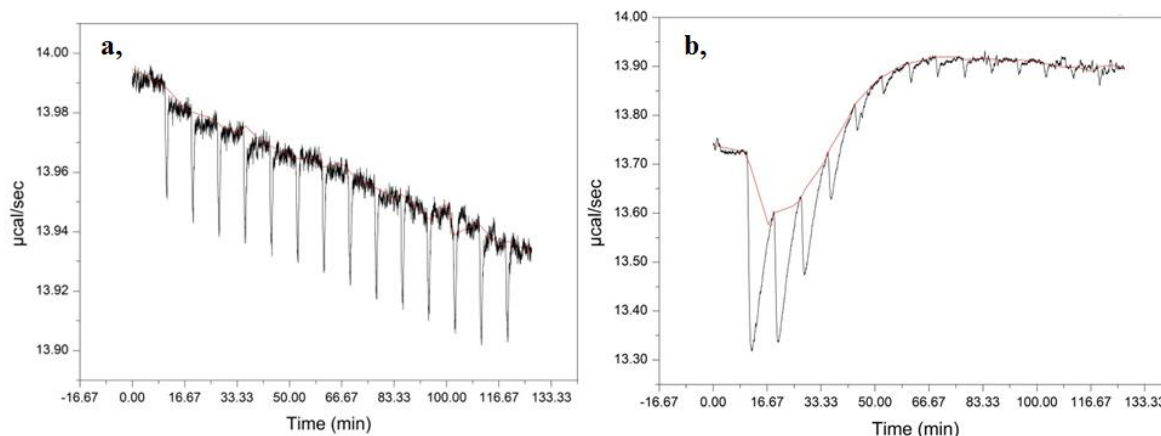
5.5. Az izotermális titrációs kalorimetriás mérések eredményei

A fehérje-As(III) kölcsönhatás vizsgálatához optimális reakciókörülményhez a tisztított fehérjét 10/100 mM HEPES (pH=7,00) pufferben oldottam 1/2 mM TCEP redukálószer használatával. UV-Vis spektrofotométerrel meghatároztam az abszorbanciákat és 5.1. egyenletbe behelyettesítve kiszámoltam a mérő cellában lévő fehérjeoldat koncentrációját (5.13. ábra).



5.13. ábra: Az ITC-s mérésekhez használt FliC-ArsR9 flagellin oldatok abszorpciós spektruma hígítás előtt (a): első méréshez; (b): második méréshez

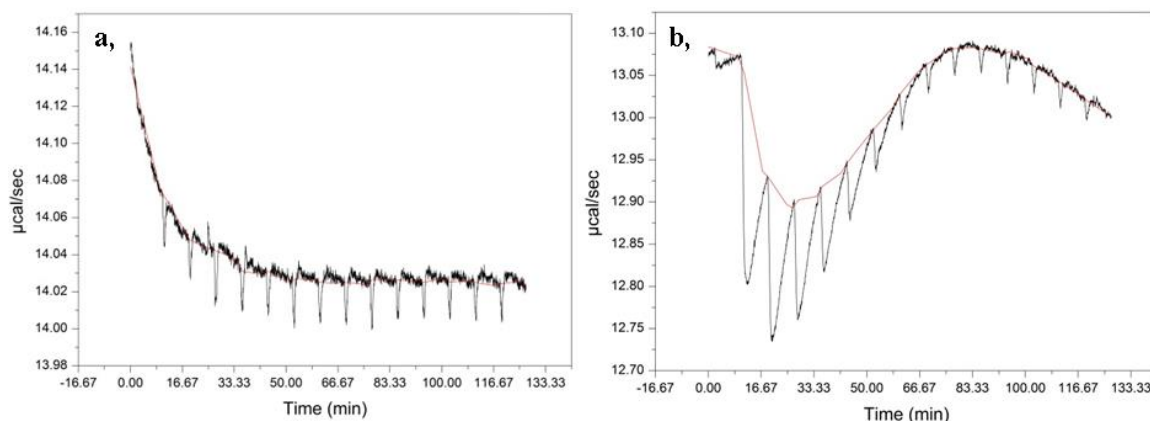
A ITC-s mérés eredményét az 5.14. ábra szemlélteti.



5.14. ábra: Az ITC-s mérés során kapott nyers görbék (a): Puffer (2 mM TCEP, 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH=7.00) titrálása As_2O_3 -ot tartalmazó pufferrel; (b): Monomer FliC-ArsR9 puffer oldat titrálása As_2O_3 -ot tartalmazó pufferrel

Az injektálásokhoz tartozó hőmennyiségeket ábrázolva a komponensek moláris arányának függvényében a kölcsönhatásra jellemző kötési izotermát kapjuk, amiből kiértékelő program segítségével a kölcsönhatás termodinamikai paraméterei kalkulálhatók. Ez azonban itt nem tehető meg, mert az injektálások között kapott jel nem tért vissza az alapvonalra, sőt maga az alapvonal is eltolódott az 5. injektálás után.

Ennek kiküszöbölése érdekében a TCEP koncentrációját 1 mM-ra, a pufferkapacitást pedig 10 mM HEPES-re csökkentettem. A célom az volt, hogy megvizsgáljam vajon a TCEP, vagy a HEPES okozza-e az anomáliát. Ezenkívül az esetleges, titráló és titrálandó oldat közötti NaCl és TCEP koncentráció különbség elkerülése érdekében a mintákat mérés előtt ugyanabba a pufferbe dializáltam. Az így elvégzett mérés eredménye az 5.15. ábrán látható.

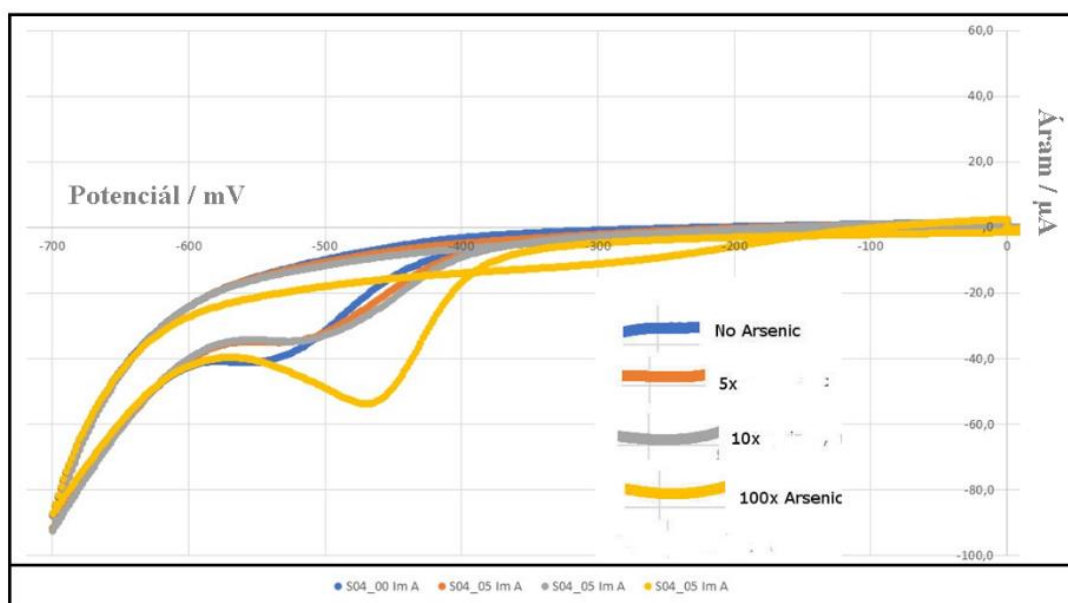


5.15. ábra: A ITC-s mérés során kapott nyers görbék (a): Monomer FliC-ArsR9 puffer oldat titrálása pufferrel (1 mM TCEP, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH=7.00) (b): Monomer FliC-ArsR9 puffer oldat titrálása As_2O_3 -ot tartalmazó pufferrel

A problémát okozó jelenséget így sem sikerült teljesen eltüntetni, ezért az adatokból nem lehetett biztosan beazonosítani kölcsönhatást, és a kötési állandókat meghatározni. A kontroll titrálásoknál (5.14.(a) és 5.15.(a) ábrák) a várakozásoknak megfelelően nem tapasztaltam kölcsönhatást. Kiderült, hogy a titrálási görbe kizárólag az As(III) adagolásának hatására változott, ami arra utal, hogy van kölcsönhatás az As(III) és a FliC-ArsR9 között.

5.6. Az elkészített chipok és a ciklikus voltammetriás mérés eredménye

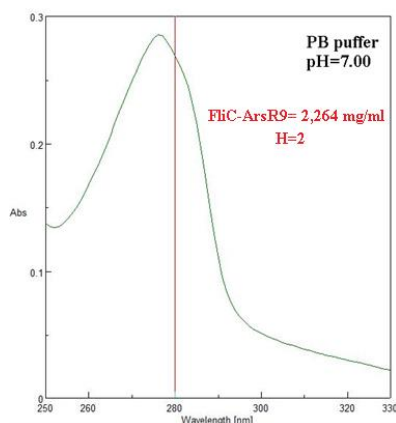
A chipok felületére 4.8. fejezetben leírtak szerint sikeresen kikötöttük a filamentumokat. A voltammogramokról jól látszik, hogy az arzén egészségügyi határértékének körülbelül ötszörös értékénél már szignifikáns eltérést mutat a görbe az arzénmentes oldatban mérttől, ami biztató jele annak, hogy a FliCArsR9 filamentum formában használható As(III) detektálására. Ugyanakkor ezek a mérések még további finomításra, illetve referenciamérésekkel való alátámasztásra várnak.



5.16. ábra: A FliCArsR9 fehérjéből chipre rögzített filamentumok As(III)-kötésének vizsgálata ciklikus voltammetriával, arzén-mentes és az arzén egészségügyi határérték 5, 10 illetve 100-szoros koncentrációjú oldatainak jelenlétében

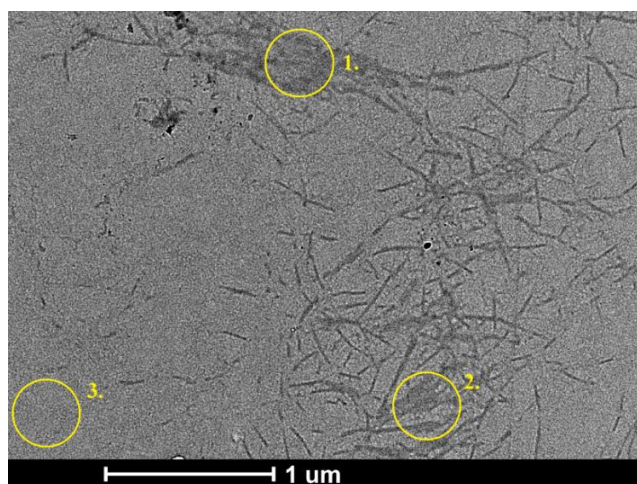
5.7. Elektronmikroszkópok elemanalízis eredményei

Az elektronmikroszkópos elemanalízishez a fehérjéket PB pufferben (pH=7.00, 1 mM TCEP) vettem fel, ami egyben a filamentumok rögzítésére is szolgált.

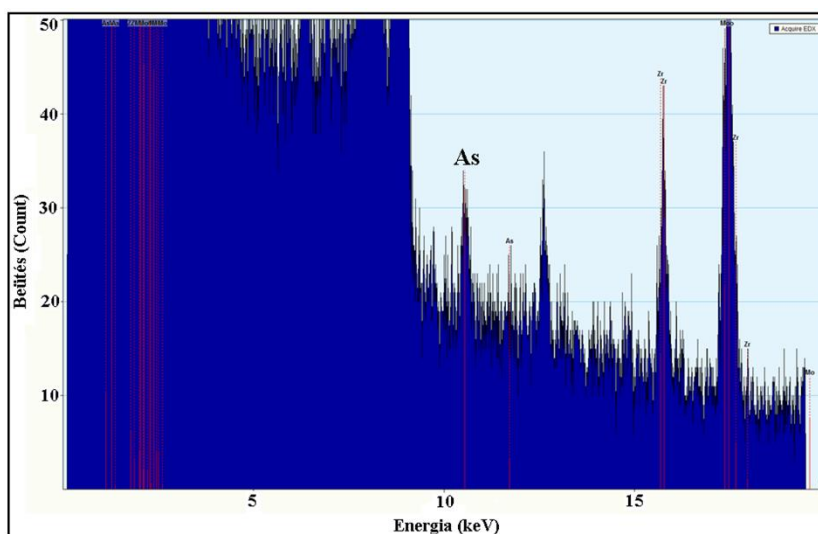


5.17. ábra: A PB pufferben felvett FliC-ArsR9 oldat elnyelési színeke

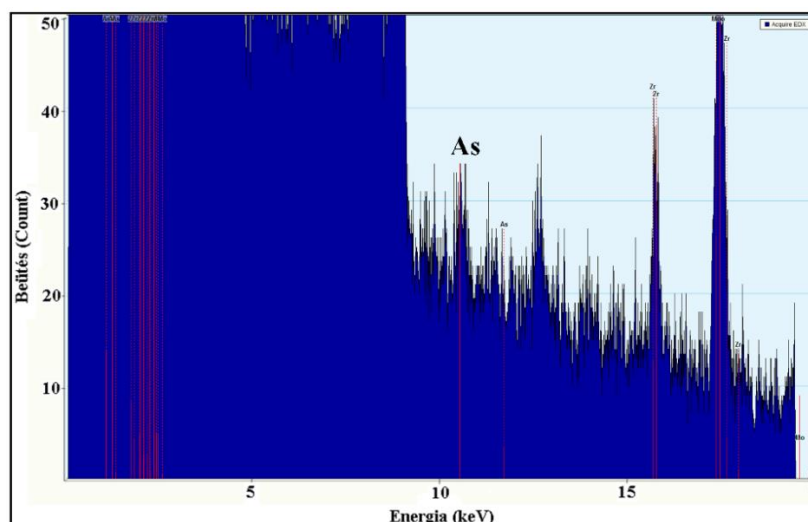
A mikrorostélyra filamentum formában vittem fel a fehérjéket, de azok koncentrációját monomer formában mértem meg (5.17. ábra). Ezt követően a 0,1 mg/ml-re hígított filamentum szuszpenziót sikeresen rögzítettem a grid felszínére, melyek az 5.18. ábrán a negatív festés hiánya miatt kontrasztszegényen ugyan, de jól láthatók.



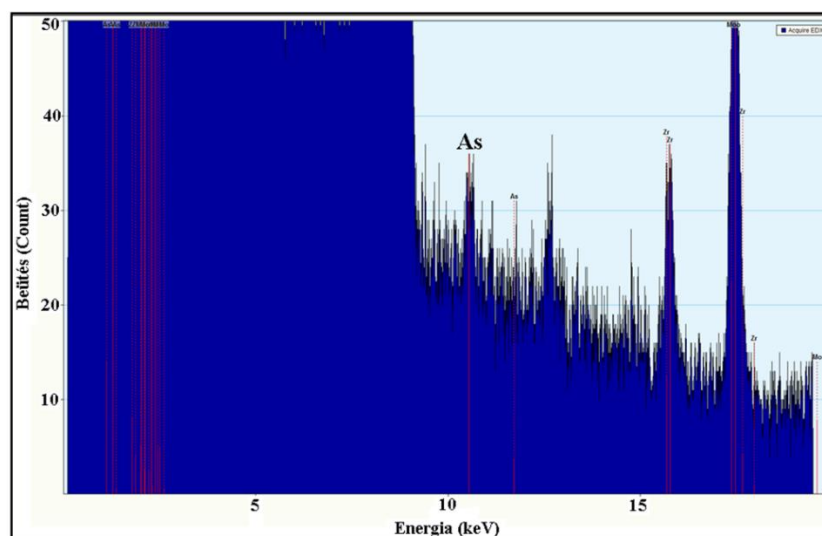
5.18. ábra: A FliC-ArsR9 filamentumokról készül TEM felvételek (1., 2.) filamentumokat tartalmazó területek; (3.) filamentum nélküli terület



5.19. ábra: Az 1. számú területen végzett lokális összetétel-elemzés eredménye

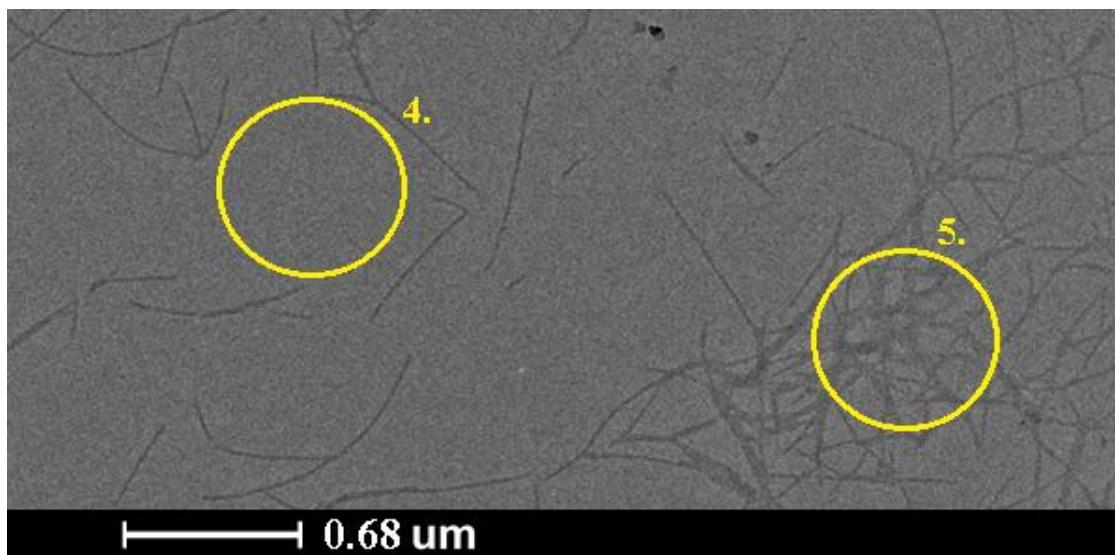


5.20. ábra: Az 2. számú területen végzett lokális összetétel-elemzés eredménye



5.21. ábra: A 3. számú területen végzett lokális összetétel-elemzés eredménye

Az 5.19., 5.20., 5.21. ábra alapján egyértelműen látszik az arzén jelenléte, azonban kvantitatív elemzéshez szükséges mértékben nem tértek el a különböző területeken mért arzénre kapott jelek.



5.22. ábra: A FliC-ArsR9 filamentumokról készült TEM felvételek (5.) filamentumokat tartalmazó terület; (4.) filamentum nélküli terület

Az inkubálással elkészített minta TEM felvételeit az 5.22. ábra szemlélteti. Így is sikerült a filamentumok rögzítése, az elemzés eredményei is hasonlóak lettek.

A mérési módszert egyelőre nem sikerült kellően kidolgozni, viszont több ponton is javíthatónak tűnik. Egyik lehetőség a reakciókörülmények optimalizálásához savasabb pufferben dolgozni vagy oxigénmentes körülményeket biztosítani. De az arzén és a fehérje koncentráció növelése is sokat segíthet a kiértékelésben.

6. Összefoglalás

A *Salmonella typhimurium* baktérium flagelláris filamentumaiból génszabványi eszközökkel specifikus felismerésre képes struktúrák hozhatók létre. Ezek a szerkezetükből adódóan rendkívül nagy kötőhelysűrűséggel rendelkező 23 nm átmérőjű, és akár 15 μm hosszúságot is elérő nanorudak kitűnő alternatívául szolgálhatnak bioszenzorokban érzékelő elemként.

Munkám során megterveztem és elkészítettem négyfajta (FliC-ArsR6, FliC-ArsR7, FliC-ArsR9, FliC-ArsR10) As(III)-kötő flagellin variáns termeltetéséhez szükséges gént. Ezt úgy végeztem el, hogy a három vegyértékű arzénkötő funkciót biztosító oligopeptid szakaszok (ArsR6, ArsR7, ArsR9, ArsR10) az eredeti fehérje (FliC) D3 doménjének helyére épüljenek be.

A létrehozott gént tartalmazó plazmidokat flagellin deficiens *Salmonella* baktériumokba (SJW2536) juttattam, majd megvizsgáltam a fehérjék termelődésének mértékét. Ezzel párhuzamosan azt is kiderítettem, hogy fehérjék hol találhatók a fermentlében. Sötétlátóterű fénymikroszkópos vizsgálatok és a Malapaka-féle motilitás tesztek eredménye alapján két módosított flagellin változatot (FliC-ArsR9, FliC-ArsR10) termelő baktériumokról elektronmikroszkópos felvételeket is készítettem. A látottak alátámasztására próbaexpressziót is végrehajtottam mind a négy flagellin variáns esetén. Az elvégzett kísérletek alapján megállapítottam, hogy mind a négy flagellin változat főként a tápoldatban halmozódik fel monomer és leszakadt filamentum formában, azonban FliC-ArsR9 a többihez képest jelentős filamentum képző képességet is mutatott a baktérium felszínén.

Mivel az összes vizsgálat alapján FliC-ArsR9 bizonyult a legígéretesebbnek filamentum képzés szempontjából, ezért az ezt termelő baktérium törzzsel végeztem el az első fermentációt, valamint e fehérje izolálására dolgoztam ki egy tisztítási protokollt is. A későbbi arzén-fehérje kölcsönhatás mérése érdekében az optimalizált protokollt FliC-ArsR10 esetén is alkalmaztam, hogy rendelkezésemre álljon olyan As(III)-kötő fehérje is, amelyben más elrendezésben vannak jelen a fémkoordinációt biztosító cisztein aminosavak.

A FliC-ArsR9 flagellin As(III)-kötő képességét izotermális titrációs kalorimetriával és elektronmikroszkópos elemvizsgálattal vizsgáltam. Ezen mérések körülményeit a pontos kvantitatív elemzéshez még nem sikerült optimalizálni. A FliC-ArsR9 fehérjéből felépülő polimereket elektrokémiai vizsgálatokhoz alkalmas chipke arany felületére is rögzítettük, melyekkel az általam javasolt reakciókörülmények használata mellett elvégzett ciklikus voltammetriás méréssel sikerült igazolni e flagellin variáns As(III)-kötő képességét.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőnek, Dr. Jankovics Hajnalkának páratlan hozzáállásáért, türelméért és a dolgozat elkészítéséhez nyújtott rengeteg segítségéért. Hálával tartozom Dr. Vonderviszt Ferenc egyetemi tanárnak, aki tanácsaival és szakmai hozzáértésével nagyban segítette munkámat. Köszönet a Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet tanszéki mérnökeinek, hogy kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk. Köszönet illeti Dr. Jancsó Attilát a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai tanszékről, aki a 10 aminosavból álló arzénkötő motívumot javasolta, mint potenciális receptor alapanyag. Illetve köszönet illeti az MTA EK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetét is. Munkámat az OTKA NN117849 és a

BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017 pályázat támogatta, amit ezúton is szeretnék megköszönni.

Irodalomjegyzék

- [1] Fàbrega, A., Vilaa, J.(2013). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2): 308–341.
- [2] Vonderviszt, F., Keiichi, N. (2008). Structure, Function and Assembly of Flagellar Axial Proteins. In Thomas Scheibel. *Fibrous Proteins*. Austin, Texas: Landes Bioscience. 58-76.
- [3] Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Namba, K.(2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410:331-337.
- [4] Maki-Yonekura, S.,Yonekura, K.,Namba, K.(2010). Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. *Nature Structural & Molecular Biology* 17(4):417-423.
- [5] Hayashi, F., Tomaru, H., Furukawa, E., Ikeda, K., Fukano, H., Oosawa, K.(2013). Key Amino Acid Residues Involved in the Transitions of L- to R-Type Protofilaments of the *Salmonella* Flagellar Filament. *Journal of Bacteriology*. 195(16):3503-3513.
- [6] Beatson, S. A., Minamino, T., & Pallen, M. J. (2006). Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *TRENDS in Microbiology*. 14(4):151-155.
- [7] Nithichanon, A., Rinchai, D., Gori, A., Lassaux, P., Peri, C., Conchillio-Solé, O., Ferrer-Navarro, M., Gourlay, L. J., Nardini, M.,Vila, J., Daura, X., Colombo, G., Bolognesi, M., & Lertmemonkolchai, G. (2015). Sequence- and Structure-Based Immunoreactive Epitope Discovery for *Burkholderia pseudomallei* Flagellin. In Bart J Currie. *PLoS Negl Trop Dis*.9(7) :e0003917
- [8] Yonekura, K., Makai-Yonekura, S., Namba, K. (2005). Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis. *Structure*. 13:407-412.
- [9] <http://www.uniprot.org/uniprot/P06179>
- [10] Muskotál, A., Segegyés, Cs., Sebestyén, A.,& Vonderviszt, F. (2010). Structural basis for stabilization of the hypervariable D3 domain of *Salmonella* flagellin upon filament formation. *Journal of Molecular Biology*. 403:607-615.
- [11] Sebestyén, A., Muskotál, A., Végh, B. M., Vonderviszt, F. (2008). The Hypervariable D3 Domain of *Salmonella* Flagellin Is an Autonomous Folding Unit. *Protein & Peptide Letters*. 15:54-57
- [12] Pál, G. (2013). Kofaktorok. In Nyitrai, L., Gábor, P. *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*. Budapest, Eötvös Loránd Tudományegyetem: 223-243
- [13] Lu, Y., Yeung, N., Sieracki, N., Marshall N.,M. (2009). Design of Functional Metalloproteins. *NATURE*. 460(7257): 855–862.
- [14] Xiao, Z., Wedd AG. (2010). The challenges of determining metal-protein affinities. *Natural Product Reports*. 27(5):768-89.
- [15] Zhang, P. (2017). On arsenic trioxide in the clinical treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Res. Rep*. 7: 29–32.
- [16] Lu, M., Wang, H., Wang, Z., Li, X.,. Le, X. C., J. (2008). Identification of Reactive Cysteines in a Protein Using Arsenic Labeling and Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *J.Proteome Res*. 7 (8), pp 3080–3090
- [17] Chen, X., Hua, H., Balamurugan, K., Kong, X., Zhang, L., , George, G. N., Georgiev, O., Schaffner, W., Giedroc, D. P. (2008). Copper sensing function of *Drosophila* metal-responsive transcription factor-1 is mediated by a tetranuclear Cu(I) cluster. *Nucleic Acids Res*. 36(9): 3128–3138.
- [18] Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., & Robinson N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. *NATURE*. 460:823-830.
- [19] Ma, Z., Jacobsen, F. E, & Giedroc, D. P. (2009). Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis. *Chem Rev*. 109(10):4644-4681.

- [20] Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., Giedroc, D. P. (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 27:131-143.
- [21] Saha, RP., Samanta, S., Patra, S., Sarkar, D., Saha A, Singh, MK. (2017). Metal homeostasis in bacteria: the role of ArsR-SmtB family of transcriptional repressors in combating varying metal concentrations in the environment. *Biomaterials*. 30(4):459-503.
- [22] O'Halloran, TV. (1993). Transition metals in control of gene expression. *Science*. 261(5122):715-25.
- [23] Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W. R., Weinfeld, M. & Le, X. C. (2013). Arsenic Binding to Proteins. *Chemical Reviews*. 113:7769–7792.
- [24] Qin, J., Hsueh-Liang Fu., Ye, J., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L., Rawlings, D. E., & Rosen, B. P. (2007). Convergent Evolution of a New Arsenic Binding Site in the ArsR/SmtB Family of Metalloregulators. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(47):34346-34355.
- [25] Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*. 7(2): 60–72.
- [26] Hong, Y-S., Song, K-H., Chung J-Y. (2014). Health Effects of Chronic Arsenic Exposure. *J Prev Med Public Health*. 47:245-252
- [27] Hughes, MF. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett*. 133(1):1-16.
- [28] Nieder, R. (2018). Pathways of Toxic Elements. In Rolf Nieder, Dinesh K. Benbi, Franz X. Soil Components and Human Health. Springer. Munich. 399-402.
- [29] Naujokas, M. F., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian, H.V., Graziano, J. H., Thompson, C. & Suk, W. A. (2013). The Broad Scope of Health Effects from Chronic Arsenic Exposure: Update on a Worldwide Public Health Problem. *Environmental Health Perspectives*. 121(3):295-302
- [30] Melak, D., Ferreccio, C., Kalman, D., Parra, R., Acevedo, J. Pérez, L., Cortés, S., Smith, A. H., Yuan, Y., Liaw, J., and Steinmaus, C. (2014). Arsenic Methylation and Lung and Bladder Cancer in a Case-control Study in Northern Chile. *Toxicol Appl Pharmacol*. 274(2): 225–231.
- [31] Kaur, H., Kumar, R., Babu, JN., Mittal, S. (2015). Advances in arsenic biosensor development--a comprehensive review. *Biosens Bioelectron*. 63:533-545.
- [32] Sebestyén, A., Végh, B., Szekrényes, Á., Kurunzci, S., Vonderviszt, F. (2006). Nehézfémkötő, falgellinalapú receptorok. *Biokémia*. 30:86-90.
- [33] Radnai, L. (2013). A géntechnológia alapja: molekuláris klónozás. In Nyitray László. Géntechnológia és fehérjemérnökség. Budapest. 23-26
- [34] Pingoud, A., Wilson, G. G. & Wendel, W. (2014). Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res*. 42(12): 7489–7527.
- [35] Velasquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E. Isothermal titration calorimetry. In: Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, Yamada KM, editors. *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ: Wiley; 2004. 17.8.1-17.8.24.
- [36] Russo, C. J., Passmore, L.A., (2016). Progress towards an optimal specimen support for electron cryomicroscopy. *Current Opinion in Structural Biology* Volume 37 Pages 81-89
- [37] Bard, A.J., Faulkner, L.R. (1976) *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Inc. pp.244-265.
- [38] Malapaka, R.R, Adebayo, L.O, Tripp, B.C. (2007). A deletion variant study of the functional role of the Salmonella flagellin hypervariable domain region in motility. *J Mol Biol*. 365(4):1102-16.
- [39] Salim, N.N., Feig, A.L. (2009). Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods*. 47(3):198-205



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018**



Biogáz előállítása elektrofermentációs úton

Készítette: Takács Piroska

Témavezető: Dr. Nemestóthy Nándor

Mérnöki Kar, Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai
Kutatóintézet

A pályamunka lezárásának dátuma: 2018.11.04.

Tartalomjegyzék

Absztrakt	293
1 Bevezetés	294
2 Irodalmi áttekintés	295
2.1 Bio-elektrokémiai rendszerek	295
2.2 Hagyományos és elektrofermentáció	297
Biogáz előállítása	300
3 Anyagok és módszerek	302
3.1 Konstrukció és mérés technika.....	302
3.2 Üzemeltetési paraméterek	303
4 Eredmények és értékelés	305
5 Összefoglalás	311
6 Irodalomjegyzék	312
Köszönetnyilvánítás	314

Absztrakt

Az elektrofermentáció a hagyományos fermentációs technológiát elektrokémiai rendszerrel ötvöző eljárás, melynek lényege, hogy egyfajta mediált elektrontranszfer révén elősegíti különböző vegyületek mikrobiális átalakítását. A fermentorban elhelyezett elektródokkal számunkra kedvező módon befolyásolhatjuk a fermentációs közeg redox-potenciálját, ezen keresztül pedig a mikroorganizmusok NADH/NAD⁺ egyensúlyát, ami jelentős hatással van a keletkező termékek összetételére, növelhető az atomhatékonyság illetve a mikrobiális növekedés is serkenthető.

Az elektrokémia és a fermentáció ilyen jellegű összekapcsolásával csupán az utóbbi néhány évtizedben foglalkoztak a kutatók. Bár a kezdeti eredmények igen ígéretesnek bizonyultak, számos tisztázandó kérdés és megoldásra váró probléma merül fel a technológiával kapcsolatban.

Kutatásom egyik témája a biogáz elektrofermentációval történő előállítása. Munkám során az elektrokémiai folyamatoknak a termékösszetételre és a termelés hatékonyságára gyakorolt hatását vizsgálom a hagyományos fermentációt használva kontrollként.

Kulcsszavak: bio-elektrokémia, fermentáció, bioüzemanyagok

1 Bevezetés

A növekvő környezetszennyezés és a globális felmelegedés miatt egyre fontosabbá válnak a fenntartható fejlődés által kínált megoldások korunk környezetvédelmi problémáira. A kutatások egyik irányvonala a különböző hulladékokban rejlő kémiai energia kinyerését és felhasználását célozza meg. Ilyen technológia például a szennyvíz-alapú biogáz-előállítás, melynek ipari megvalósítására számos példát láthatunk. Ugyanakkor a hagyományos fermentációs eljárás hatékonyságát több tényező korlátozza, ezért további fejlesztések szükségesek a magasabb energia-kihozatal érdekében.

A bio-elektrokémiai rendszerek egyik legújabb típusa az elektrofermentáció, mely a hagyományos fermentációs technológiát ötvözi elektrokémiai módszerekkel. A külsőleg biztosított tápfeszültség segítségével nagyban fokozható a mikrobiális aktivitás, nő a termelt biogáz mennyisége, valamint az anyagcsere-útvonalak irányításával megnövelt metántartalom révén minőségi javulás is elérhető. Az elektrofermentációval kapcsolatos publikációk száma azonban még korlátozott, éppen ezért számos további kutatás szükséges az eljárás pontos mechanizmusának megértéséhez és gyakorlatban való elterjedéséhez.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 *Bio-elektrokémiai rendszerek*

A bio-elektrokémiai rendszerek lényegében speciális bioreaktoroknak tekinthetők, melyekben a biológiai és elektrokémiai folyamatok ötvözésével állatható elő elektromos áram, bio-üzemanyag vagy egyéb fermentációs termék, ezzel párhuzamosan pedig bizonyos esetekben hulladéklebontás, szennyező anyagok eltávolítása is megvalósulhat. Az említett rendszereknek számos változata létezik, melyek felépítésüktől és az üzemeltetési paramétereiktől függően igen széles felhasználási körrel rendelkeznek [1].

A mikrobiális elektrokémiai rendszerek alapját Potter 1911-ben publikált megállapítása jelenti, miszerint bizonyos mikroorganizmusok anyagcsere-folyamatait elektromos áram termelésére lehet hasznosítani [2]. Felfedezése néhány évtizedre feledésbe merült, mígnem a hatvanas években a NASA bio-üzemanyagok és elektromosáram-termelés iránti igényének köszönhetően újra előtérbe került. Ekkor készült el az első mikrobiális üzemanyagcella, mely a későbbiekben is a bio-elektrokémiai rendszerek legintenzívebben kutatott változata maradt. Az ezt követő évtizedekben újabb és újabb típusok jelentek meg, számos tudományos publikáció született, melyek a biológiai és elektrokémiai háttér megértésével, valamint a gyakorlati megvalósítás során fellépő problémákkal foglalkoznak [3].

Bár a különböző bio-elektrokémiai folyamatok vizsgálata során az elektrofermentáció alapjaival is foglalkoztak a kutatók, a kétezres évek előtt igen kevés publikáció született ebben a témában [3]. Park és Zeikus 1999-ben megjelent munkája azonban úttörő jelentőségűnek bizonyult [4]. Eredményeik ugyanis azt mutatták, hogy az elektródok által biztosított redukáló erő a metabolikus útvonalak irányítására használható, mind tiszta mind kevert kultúrák tenyésztése esetében. A felfedezés hatására kezdték el vizsgálni a kutatók az ipari fermentációk elektrokémiai úton történő hatékonyság-növelésének lehetőségét [3]. Az elektrofermentáció kifejezést először Rozendal és munkatársai használták egy 2010-ben megjelent publikációjukban [5], de azóta sem sikerült minden esetben egyértelműen tisztázni a különbséget elektrofermentáció, elektroszintézis és egyéb rokon fogalmak között [3].

Bármely típusról beszélünk, a bio-elektrokémiai rendszerek működésének alapját minden esetben az exoelektrogén mikroorganizmusok jelentik [3]. Az exoelektrogén baktériumok olyan mikroorganizmusok, melyek a szubsztrát lebontása közben termelődött elektronokat képesek az extracelluláris térbe juttatni. Az így keletkező elektronokat hasznosíthatjuk elektromos áram termelésére vagy valamilyen termék előállítására. A kutatásoknak

köszönhetően számos exoelektrogén fajt sikerült azonosítani, melyek tiszta kultúráként is alkalmazhatóak: *Geobacter sulfurreducens*, *Escherichia coli*, *Shewanella putrefaciens*, stb. [6].

Elterjedtebb azonban a kevert kultúrák használata, hiszen nem kell nagyfokú sterilitást biztosítani, valamint kevésbé érzékenyek a környezeti paraméterek változásaira (alacsony illetve változó hőmérséklet esetén is működtethető a cella). Emellett a szubsztrátok szélesebb körét képesek hasznosítani, így az egyik legfontosabb alkalmazási területük a különböző szennyvizek és szerves hulladékok kezelése, amely közegekben természetes körülmények között is megtalálhatóak [7, 8]. A mikrobakonzorciumok fermentatív és acidogén baktériumokat is tartalmaznak, melyek a nagy molekulájú, összetett szerves anyagokat hidrolizálják és könnyen bontható vegyületekké alakítják, elősegítve ezáltal az exoelektrogén baktériumok tápanyagfelvételét és metabolizmusát [6]. Az adaptációs folyamat során - a bio-elektrokémiai rendszer működésének kezdeti fázisában - a konzorcium összetétele megváltozik: az adott környezetben a leghatékonyabb anyagcserét folytató baktériumok fognak elszaporodni [8].

Az extracelluláris elektrontranszport jelenleg ismert mechanizmusai két fő típusba sorolhatók [7]:

- mediált elektrontranszfer, melynek során valamilyen biogén transzfervegyület szállítja az elektront az anód felületére;
- direkt elektrontranszfer, melynél az elektronok szállítását a sejtek külső membránjában található citokróm fehérjék vagy a baktériumok által növesztett pílusok teszik lehetővé.

Az elektrontranszportra irányuló kezdeti kutatások során különböző mediátor molekulákat alkalmaztak, ezek azonban egészségkárosítónak és igen költségesnek bizonyultak. A későbbi kísérletek során számos olyan mikroorganizmust sikerült azonosítani, melyek nem igényelnek mesterségesen hozzáadott mediátor vegyületet, így használatuk háttérbe szorította a korábban alkalmazott törzseket. Ezek a baktériumok vagy saját maguk által termelt vegyületekkel juttatják az elektronokat az anódra, vagy bakteriális pílusokkal kapcsolódnak az elektród anyagához, és ezeken keresztül valósul meg az elektrontranszfer [6]. Előfordulhat olyan eset, hogy az elektronokat termelő mikroorganizmus nem képes ugyan az elektródhoz történő elektrontranszferre, más mikroorganizmusok azonban mediátorként szolgálnak, így nincs szükség mesterséges közvetítő vegyületre [3].

2.2 Hagyományos és elektrofermentáció

A fermentáció fogalma alatt olyan biotechnológiai eljárást értünk, melynek során élő sejteket tenyésztünk valamilyen anyag előállítása vagy lebontása érdekében. Számos területen alkalmaznak fermentációs eljárásokat: ide tartozik a különböző élelmiszeripari termékek előállítása és tartósítása, gyógyszergyártás, üzemanyag-termelés, de akár a szennyvíz-kezelés is. Ipari jelentőségének köszönhetően számos tanulmány született, melyek a különböző metabolikus útvonalak megismerését és irányítását célozzák, hogy minél hatékonyabban lehessen előállítani a számunkra kedvező termékeket [9].

A heterotróf mikroorganizmusok szerves vegyületek lebontása során nyerik az életműködésükhöz szükséges energiát. A glükóz – mint általános szénforrás – lebontásának első szakasza a glikolízis, melynek során piruvát, szén-dioxid, ATP (adenozin-trifoszfát) és NADH (nikotinamid-adenin dinukleotid) keletkezik. A NADH a katabolikus anyagcsere-folyamatokban résztvevő redukált koenzim, melynek regenerálása (visszaoxidálása) elengedhetetlen a glikolízis folytonosságának biztosítása céljából. Oxigén jelenlétében a NADH az oxidatív foszforiláció során regenerálódik, a sejtek számára ez a fő energiatermelő folyamat. Anaerob körülmények között a redukált koenzim csak erjedési reakcióban tud regenerálódni, mely az oxidatív foszforilációhoz képest jóval kevesebb ATP előállításával jár. A piruvát keto- és karboxilcsoportot egyaránt tartalmazó szerves vegyület, az adott mikroorganizmus metabolikus útvonalától függően számos végtermék kiindulási anyaga lehet, pl. etanol, butanol, karbonsavak, rövid szénláncú zsírsavak, stb [3].

A fermentációs folyamatok alapját tehát a redox reakciók jelentik. A szerves vegyületekben a szén oxidációs állapotát könnyen meghatározhatjuk, hiszen a hidrogén oxidációs száma +1, az oxigéné -2, ha pedig a teljes vegyületre nézve összegezzük az oxidációs számokat, a molekula vagy ion töltésével megegyező értéket kapunk. A szén oxidációs állapota alapján sorba rendezve a vegyületeket megállapíthatjuk, hogy a szén-hidrogének rendelkeznek a legalacsonyabb, a szén-dioxid pedig a legmagasabb oxidációs fokkal. Ennek megfelelően nem lehet a szén-dioxidot tovább oxidálni, a szén-hidrogéneket pedig tovább redukálni [10].

A hagyományos fermentációs technológiákkal kapcsolatban több probléma is felmerül, melyek közül az egyik legnagyobb a redox egyensúly felborulása, aminek következtében csökken a kívánt termék mennyisége, illetve egyéb melléktermékek keletkeznek. Az egymást követő redukciós és oxidációs reakciók bár többnyire termodinamikailag kedvező, spontán folyamatok, szigorú biológiai szabályozás alatt állnak, melyet az adott sejt szükségletei és a

mikroorganizmusok egymás közötti interakciói határoznak meg. A metabolikus útvonalat az egyéb környezeti paraméterek mellett jelentősen befolyásolja az oxidációs-redukciós potenciál (ORP). A tápoldat oxidációs-redukciós potenciálja (extracelluláris ORP) a közegben található elektronok aktivitásának feleltethető meg (mint ahogy a pH a protonaktivitásról ad információt). Az extracelluláris ORP értékét, melyre hatással van a közeg kémiai összetétele és hőmérséklete is, egy ORP szenzor segítségével könnyen mérhetjük. Az intracelluláris ORP a sejten belüli redox állapotot jellemzi, értéke a $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ arány alapján becsülhető [3].

Egy redox reakció lejátszódásához szükség van egy redukálószerre, amely elektront ad át az oxidálószernek. Minden redoxpárhoz tartozik egy, a standard hidrogénelektroddhoz viszonyított ORP, amely nagyobb elektron-affinitás esetén magasabb értéket vesz fel. Egy sejten belül egymással párhuzamosan több oxidációs és redukciós reakció is zajlik, ebből kifolyólag az extracelluláris közegben mért ORP a sejten belüli folyamatok összességét jellemzi, nem az egyes reakciókat [11].

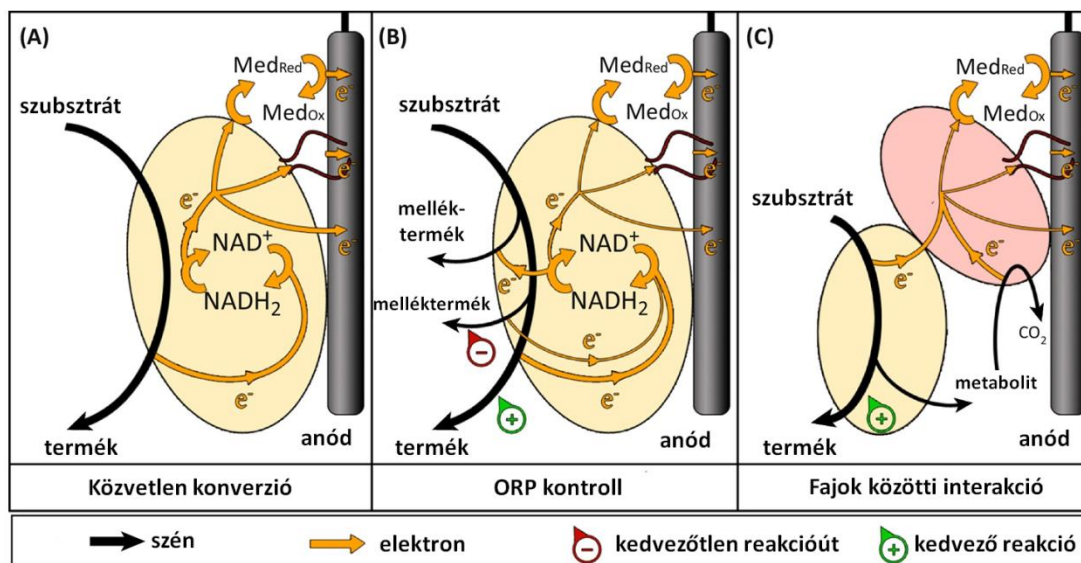
Az oxigén / víz redox-pár standard ORP értéke a legmagasabb a metabolizmusban előforduló összes redox-párhoz képest. Éppen ezért az oxigén az elsődleges elektronakceptor a sejten belüli reakciókban, még akkor is, ha koncentrációja jóval alacsonyabb a többi metaboliténál. Anaerob fermentációknál azonban - oldott oxigén hiányában - a szubsztrátok és a tápközegbe bocsátott metabolitok befolyása az ORP értékre számottevővé válik [11].

A sejtekben lezajló biokémiai folyamatok enzimatikus szabályozás alatt állnak, így a redox viszonyok génexpresszióra és enzimszintézisre gyakorolt hatása nem elhanyagolható a metabolikus útvonalak megértése és irányítása során. Mivel az intracelluláris ORP mérésére a gyakorlatban nehezen kivitelezhető, a citoplazmában található adott redoxpárokat használnak az ORP jellemzésére. A legcélravezetőbb a $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ molekulák vizsgálata, mivel ezek a kofaktorok számos oxidációs-redukciós reakcióban részt vesznek, így felhasználhatóak a sejt metabolikus viszonyainak reprezentatív jellemzésére [11]. A fermentáció hozama növelhető a kofaktorok sejten belüli mennyiségének módosításával, amely géntechnológiai eljárásokkal is megvalósítható. Például Berrios-Rivera kutatócsoportja egy *Escherichia coli* tenyészet genetikai módosításával fokozta a NAD^+ kofaktort igénylő formiát-dehidrogenáz expresszióját, így nőtt a NADH mennyisége és hatékonyabbá vált az etanol-előállítás [12].

A sejten belüli folyamatok irányításához nem feltétlen szükséges a génszintű beavatkozás. Az extracelluláris ORP szabályozásával is befolyásolhatjuk az intracelluláris ORP-t, így elősegíthetjük a számunkra fontos céltermék képződését. Erre ad lehetőséget a bio-elektrokémiai rendszerek egyik legújabb típusa, az elektrofermentáció. Az eljárás alapját a tápoldatba helyezett elektródok és a rendszerre kapcsolt tápfeszültség jelentik. Az

elektródok elektrondonorként vagy akzeptorként viselkednek. Katódos elektrofermentáció esetén a szubsztrát a katód által biztosított elektronok felhasználásával, egy redukáltabb állapotú vegyületet képez. Ha a termék a kiindulási szubsztrátnál magasabb oxidációs állapotú, a reakció során keletkező elektronok az anódra kerülnek, ezt nevezzük anódos elektrofermentációnak [1].

Fontos megjegyezni, hogy a célparaméter nem a katódos elektrofermentációban termelt áram, mint ahogy az alkalmazott tápfeszültség sem a fő energiaforrása a fermentációnak. A cél az extracelluláris ORP szabályozásán keresztül befolyásolni a $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ arányt és fenntartani a megfelelő redox egyensúlyt. A hagyományos fermentáció során az elektronakceptorok hiánya a reakciósebesség csökkenéséhez vagy a célterméktől eltérő vegyület képződéséhez vezethet. Ezt lehet elkerülni egy külső elektronakzeptorként alkalmazott elektróddal. Hasonló módon a mikroorganizmusok fel is vehetnek elektronokat az elektródról, így képesek redukálni a szubsztrátot. Az anódtérben a szerves vegyületek oxidációja során keletkezett elektronok az anódról a katódra kerülve felhasználhatók a redukációs folyamatokban. Az anód- és katódtér szeparálható egymástól valamilyen szelektív membrán (pl. ioncserélő membrán) alkalmazásával, de egycellás kivitelezés is megvalósítható [3].



2.1. ábra: Elektrofermentáció lehetséges mechanizmusai [1]

A 2.1. ábraán láthatóak az elektrofermentáció anódján végbemenő elektrontranszfer lehetséges mechanizmusai.

- (A) A szubsztrát átalakítása közben keletkező többlet-elektronok közvetlenül az anód felületére kerülnek valamilyen extracelluláris elektrontranszfer révén (lásd 2.1 fejezet).

- (B) A termelt elektronok feleslege csak részben kerül az anódra, egy része egyéb melléktermékek képződése során hasznosul. Az anód elektron-felvételének következtében csökken a $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ arány, a sejt pedig ennek ellensúlyozására törekedve olyan anyagcsere-útvonalakat preferál, melyek a NADH regenerálásával járnak, tehát az általunk kívánt céltermék képződését segíthetjük elő ily módon.
- (C) Előfordulhat, hogy a fermentációt végző mikroorganizmus nem képes az elektród felületére juttatni az elektronokat. Ilyenkor egy exoelektrogén mikroba mediátorként szolgálhat a szubsztrát lebontását végző sejt és az anód között [1].

Biogáz előállítása

A biogáz olyan gázelegy, mely szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett lebontása során keletkezik anaerob körülmények között. Összetételét tekintve fő alkotói a metán (50-75%) és a szén-dioxid (25-50%), emellett nyomokban tartalmazhat vízgőzt, kénhidrogént, nitrogént, ammóniát, stb. Mind a teljes biogáz-hozamot, mind az összetételt jelentősen befolyásolja a feldolgozott alapanyag, amely lehet állati trágya, mezőgazdasági hulladék, élelmiszeripari melléktermék vagy kommunális hulladék. Ezek közül kiemelném a szennyvíziszapot (mivel kísérleti munkám során ezzel dolgoztam), amelynek biogáz-hozama $35 - 280 \text{ m}^3 / \text{t}$, a keletkező gáz metántartalma pedig 60-72 % [13].

Az alapanyag összetétele mellett többek között a szárazanyag-tartalom, üzemeltetési hőmérséklet, térfogati szervesanyag-terhelés és a mikrobakonzorcium diverzitása is hatással vannak a gázképződési eredményekre. Üzemeltetési hőmérséklet szempontjából kétféle technológiát alkalmaznak a gyakorlatban: a mezofil eljárásnál a hőmérsékleti tartomány $35 - 40^\circ\text{C}$, a termofil esetben pedig $50 - 55^\circ\text{C}$. Termofil technológiával magasabb gázkihozatal és rövidebb tartózkodási idő érhető el a mezofil eljáráshoz képest, ugyanakkor a termofil fermentációt végző mikroorganizmusok érzékenyebbek a hőmérsékleti és az alapanyag minőségbeli ingadozására. Továbbá a magasabb hőmérséklet miatt az eljárás energiaigénye is nagyobb, ami gazdasági szempontból sem elhanyagolható [14].

A biogáz fermentációja három fő lépésből áll: hidrolízis, savképződés és metánképződés. A nagy molekulaméretű szerves polimerek (keményítő, cellulóz, stb.) a mikroorganizmusok számára közvetlenül nem felvehetők, előbb a fermentációs közegbe juttatott, ún. extracelluláris enzimek monomerekre (esetleg oligomerekre) bontják. A különböző tápanyagok hidrolíziséhez eltérő enzimek szükségesek, egy adott mikroba viszont csak

bizonyos típusú exoenzimeket termel. A sokféle polimert tartalmazó, összetett szubsztrát lebontásához éppen ezért megfelelően diverz mikrobakonzorcium szükséges [13].

A hidrolízis során nyert monomerekből a fermentáció második fázisában szerves savak és alkoholok, valamint szén-dioxid és hidrogén keletkezik. A savképző (acidogén) baktériumok által előállított termékek a metanogén sejtek számára szubsztrátként szolgálnak a fermentáció utolsó, metántermelő fázisában. Ecetsavból erjedéssel metán és szén-dioxid keletkezik, a többi szerves sav pedig ecetsavvá alakul, szintén biogáz-termelés mellett. Metán létrejöhet hidrogén és szén-dioxid felhasználásával, valamint metil-csoporttal rendelkező szubsztrátokból is [13].

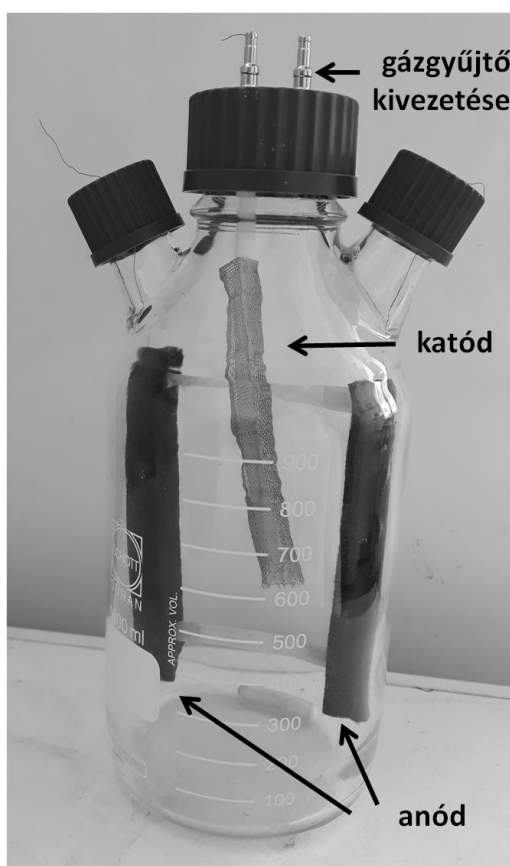
Bár a biogáz-termelés viszonylag régi technológiának mondható, energia-kihozatal szempontjából azonban még tovább optimalizálható. A biogáz metán / szén-dioxid arányát alapvetően meghatározza a szubsztrát szénatomjának oxidációs állapota, amely jórészt az anyagi minőség függvénye. A gyakorlati felhasználást tekintve a minél magasabb metántartalom a kedvező, ezért számos eljárással próbálják növelni a biogázban lévő metán arányát. A szén-dioxid kémiai vagy fizikai szeparációjával ugyan elérhető az említett cél, a módszerek többsége jelentős költségekkel jár [15].

A metán mennyiségi növekedése a metabolikus útvonalak befolyásolásával is elérhető, ezt próbálják megvalósítani bio-elektrokémiai módszerrel az elektrofermentáció során. Az fermentációs közegben biztosított tápfeszültség révén a mikroorganizmusok anyagcseréje számunkra kedvező irányban módosítható. Az elektrofermentációval tehát a biogáz előállítása és minőségi javítása egyaránt megvalósítható, ami a többi biogáz-feldolgozási eljáráshoz képest jóval olcsóbb és kisebb energiaigényű. Az utóbbi négy-öt évben több publikáció is született, melyekben sikeresen megnövelt metántermelésről számolnak be, ugyanakkor a különböző üzemeltetési paraméterek és az alkalmazott feszültség nagyságának optimumáról még korlátozott információ áll rendelkezésre. Nem tisztázott az sem, hogy pontosan milyen hatással van a külső feszültség a baktériumok növekedésére és aktivitására [15]. A felmerült kérdések tisztázása érdekében további kutatások szükségesek.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Konstrukció és méréstechnika

A 3.1. ábraán látható az elektrofermentációs rendszer kialakítása. Reaktorként egy liter hasznos térfogatú, háromnyakú üvegedényt használtam, a két oldalsó csonk szolgált az anódok kivezetésére. Az edény középső nyakát lezáró kupakon két nyílás található, ezek közül az egyik a katód, a másik pedig a keletkező gázok kivezetését tette lehetővé. Katódként 28 cm² felületű rozsdamentes acélhálót, anódként pedig két darab, egyenként 32 cm² felületű szénszövetet alkalmaztam, az elektródokhoz erősített titánszál biztosította az elektromos kivezetést. Az elektródok közé erősített távtartó megakadályozta, hogy az üzemeltetés során összeérjenek az elektródok.



3.1. ábra: Elektrofermentációs rendszer felépítése

A kontroll rendszer felépítésében, üzemeltetési körülményeiben, az alkalmazott inokulum és tápoldat-összetétel tekintetében egyaránt megegyezett az elektrofermentációs rendszerrel. Az egyetlen különbség a két berendezés között, hogy a kontroll nem tartalmazott elektródokat, ennek megfelelően tápfeszültséget sem alkalmaztunk ebben az edényben.

A keletkezett biogáz mennyiségének méréséhez egy módosított U-csövet használtam, melynek bal oldali szárát a reaktor gázkivezető nyílásához csatlakoztattam egy szilikoncső segítségével, a jobb oldali szára pedig felül nyitott volt. Az eszközbe csapvizet töltöttem, a szárukba pedig egy-egy fémdrótot helyeztem úgy, hogy alaphelyzetben a baloldali szárban beleérjen a vízbe, a jobb oldaliban viszont szárazon legyen. A fermentáció során termelődő gáz fokozatosan kiszorította a vizet a bal oldali szárból, ennek megfelelően nőtt a vízszint a jobb oldali szárban, illetve a két szár között található átvezető csőszakaszban. Amikor a víz elérte a jobb oldali elektródot, az áramkör zárult. További gáztermelés hatására az átkötő csőből teljesen kiszorult a folyadék, így a nyomáskülönbség kiegyenlítődt a két oldal között és a vízszint visszaállt az eredeti állapotba. A két állapot közötti változás által generált elektromos jelet adatgyűjtő segítségével mértem és rögzítettem. A nyitott-zárt ciklusok számából megfelelő kalibráció után a keletkezett gáz térfogata kiszámolható.

A termelt gáz összetételét hővezetőképesség-mérő detektorral (TCD) ellátott gázkromatográf segítségével analizáltam. A méréshez a gáztérből Hamilton fecskendővel vettem mintát, az alkalmazott vivőgáz nitrogén volt. A kapott kromatogramokat a kalibrációs adatok felhasználásával elemeztem.

3.2 Üzemeltetési paraméterek

Inokulumként a BAKONYKARSZT Víz- és Csatornamű Zrt. veszprémi szennyvíztisztító telepéről származó mezofil, anaerob iszapot alkalmaztam. A fermentációs folyamat beindulásának elősegítésére 100 mL vegyes tápanyag-összetételű, jól metabolizálható oldatot adtam a 0,5 L inokulumhoz. Az oldat az alábbi komponenseket tartalmazta:

- 25 g/L glükóz
- 10 g/L keményítő
- 10 g/L élesztőkivonat
- 5 g/L NaCl
- 10 g/L kukoricacsíra-olaj

A kukoricacsíra-olaj mellett, hogy a mikroorganizmusok szénforrásként hasznosíthatják, habzástgátló tulajdonságú, így hozzájárul a habképződés és az ezzel járó esetleges eltömődések megakadályozásához.

Az anaerob körülmények biztosítása céljából tíz percen keresztül nitrogént áramoltattam át az oldaton, hogy a gáztérben lévő és a folyadékfázisban oldott oxigén egyaránt távozzon a

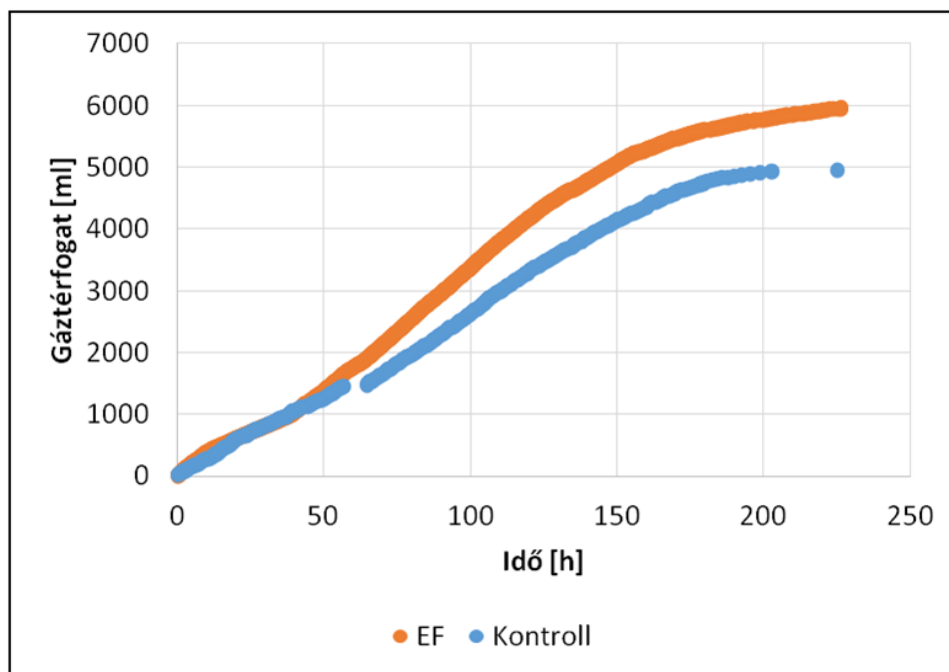
rendszerből. A fermentorokat 37°C-on termosztáltam, mely megfelelt a biogáz termeléséért felelős mikroorganizmusok hőmérsékleti optimumának.

A mérés indításakor a két fermentor üzemeltetési paraméterei mindenben megegyeztek, az elektrofermentációs rendszerre sem kapcsoltunk tápfeszültséget. Kezdetben különböző sebességgel termelődött a biogáz a két rendszerben, majd az adaptációt követően beállt egy viszonylag egyenletes és a két rendszerre nézve azonos gázképződési sebesség. Az elektrofermentorban az indítás utáni huszonnegyedik órától 0,4 V feszültséget tartottunk potenciosztással az anód és a katód között. Adatgyűjtő segítségével mértük az elektródok között kialakuló feszültséget, melyből az áramkörbe kötött 1,6 Ω nagyságú ellenállás segítségével kiszámolható az áramerősség.

Kutatásom során vizsgálni akartam az alkalmazott feszültség nagyságának hatását, így a 95. óra után a 0,4 V feszültséget átállítottam 0,8 V-ra. A külsőleg biztosított potenciálkülönbség értékét Zhen és munkatársai publikációja [16] alapján választottam meg. Bár az általuk használt reaktor konstrukciója, illetve az inokulum és a szubsztrát típusa is az enyémtől részben eltért, a cél az ő esetükben is biogáz előállítása volt, valamint a méret és a főbb üzemeltetési paraméterek hasonlósága miatt felhasználtam adataikat a kísérlet tervezése során. Kezdetben én is 0,4 V feszültséget alkalmaztam, mely a publikáció szerint pozitív hatással van a gáztermelésre. Ezt követően a cikk írói 0,6 V-ra állították a potenciálkülönbséget, ami gátolta a mikrobák metabolizisát, valamint instabillá tette a rendszert. Hozzájuk hasonlóan Ding kutatócsoportja [17] is azt tapasztalta, hogy a metanogenezisre káros hatással van a túl magas (0,8 V feletti) feszültségérték. Ahogy a kedvezőnek ígérkező 0,4 V, úgy a korábbi mérésekben negatív eredményt hozó 0,8 V feszültséget azért választottam, mert meg akartam vizsgálni, hogy egy részben eltérő rendszerrel is a mások által publikálthoz hasonló eredményre jutok-e.

4 Eredmények és értékelés

A 4.1. ábraán látható a kísérlet teljes időtartama alatt összesen képződött biogáz mennyisége. (A továbbiakban a diagramokon EF rövidítéssel jelölöm az elektrofermentációs rendszerre vonatkozó mérési eredményeket.)



4.1. ábra: Összesen képződött biogáz mennyisége

A fermentáció lefutása mindkét esetben közel azonos: a kezdeti adaptációs időszakot követően gyorsabban és viszonylag egyenletes mértékben termelődött biogáz, majd a szubsztrát fogyasztásával a keletkező termék mennyisége is csökkent. A kísérlet végére az elektrofermentációval közel 20 %-kal több biogázt sikerült a kontroll rendszerhez képest.

A reaktorok térfogatára és a mérés teljes időtartamára vonatkoztatva megadható a két rendszer biogáz-kihozatala:

$$Y_K = \frac{V_{biogáz}}{V_{reaktor} \cdot t} = \frac{0,005 \text{ m}^3}{0,001 \text{ m}^3 \cdot 9,4 \text{ nap}} = 0,53 \frac{\text{m}^3}{\text{m}^3 \cdot \text{nap}} \quad (4.1.)$$

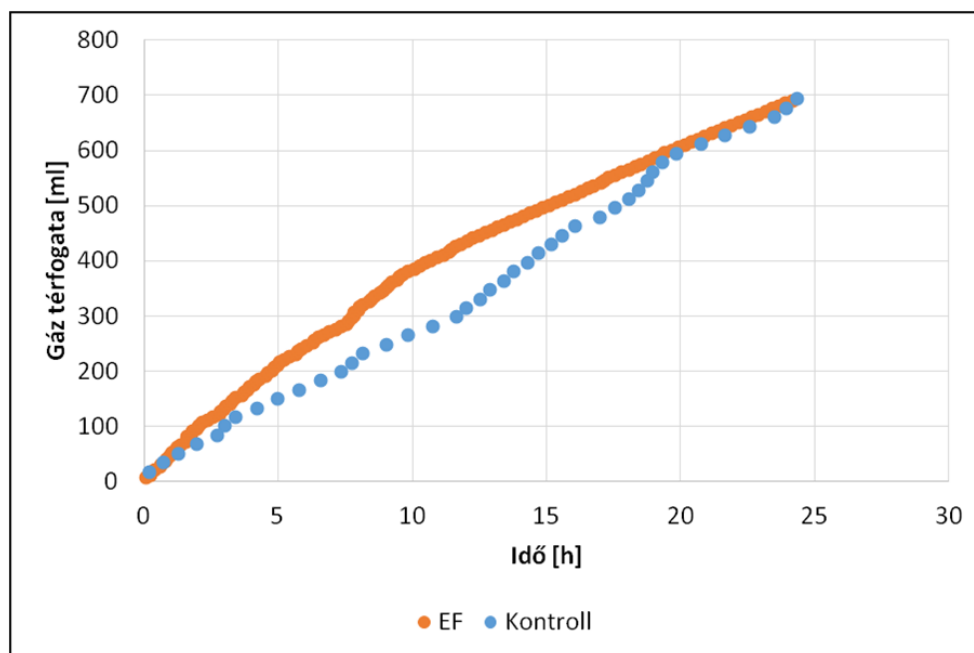
$$Y_{EF} = \frac{V_{biogáz}}{V_{reaktor} \cdot t} = \frac{0,006 \text{ m}^3}{0,001 \text{ m}^3 \cdot 9,4 \text{ nap}} = 0,64 \frac{\text{m}^3}{\text{m}^3 \cdot \text{nap}} \quad (4.2.)$$

A potenciosztáttal biztosított tápfeszültség értéke alapján a mérés három szakaszra osztható:

- 0-24. óra: zérus tápfeszültség,
- 25-95. óra: 0,4 V tápfeszültség,
- 96-225. óra: 0,8 V tápfeszültség.

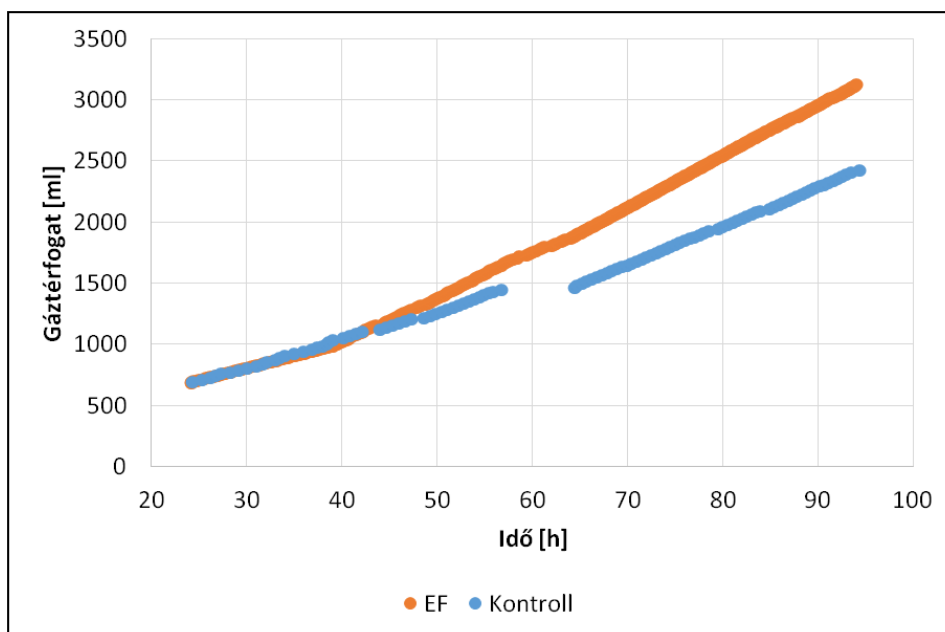
A következőkben a három időszak biogáz-termelési eredményei külön-külön kerülnek bemutatásra.

Ahogy azt a 3.2 fejezetben leírtam, a kísérlet indítását követő egy napban nem alkalmaztam tápfeszültséget az elektrofermentációs rendszerben, így a két reaktor üzemeltetési körülményei teljesen azonosak voltak. A 4.2. ábraán jól látható, hogy a kontroll rendszer esetében a kezdeti gáztermelés elmarad az elektrofermentorhoz képest, majd a 19. órától a keletkezett gáz mennyisége a két reaktorban azonosnak mondható.



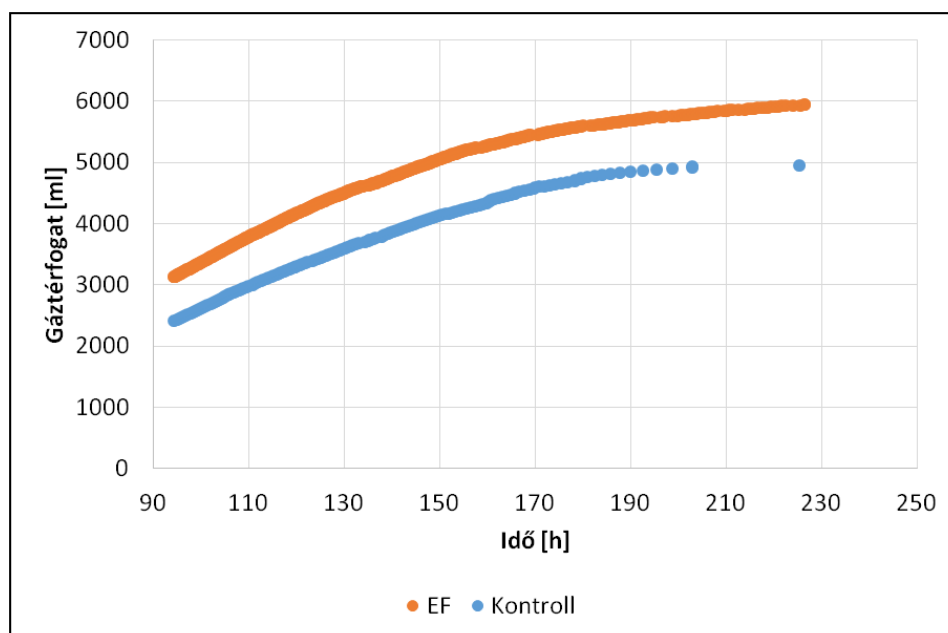
4.2. ábra: Kezdeti biogáz-termelés

Mivel az üzemeltetési paraméterek megegyeztek, az indítást követő gáztermelési különbség a mikrobakonzorciumnak tudható be. Bár egyforma mennyiségű, ugyanolyan eredetű inokulumot alkalmaztam, a tiszta kultúrákkal ellentétben az anaerob rothasztóból származó iszap esetében sem azonos sejtszámot, sem azonos összetételt nem lehetett biztosítani. A szubsztráthoz való adaptáció végére azonban lényegében ugyanannyi biogáz keletkezett a két rendszerben, ami lehetővé tette az elektrokémiai eljárás hatásának vizsgálatát, ezért a 24. órától 0,4 V tápfeszültséget alkalmaztam.



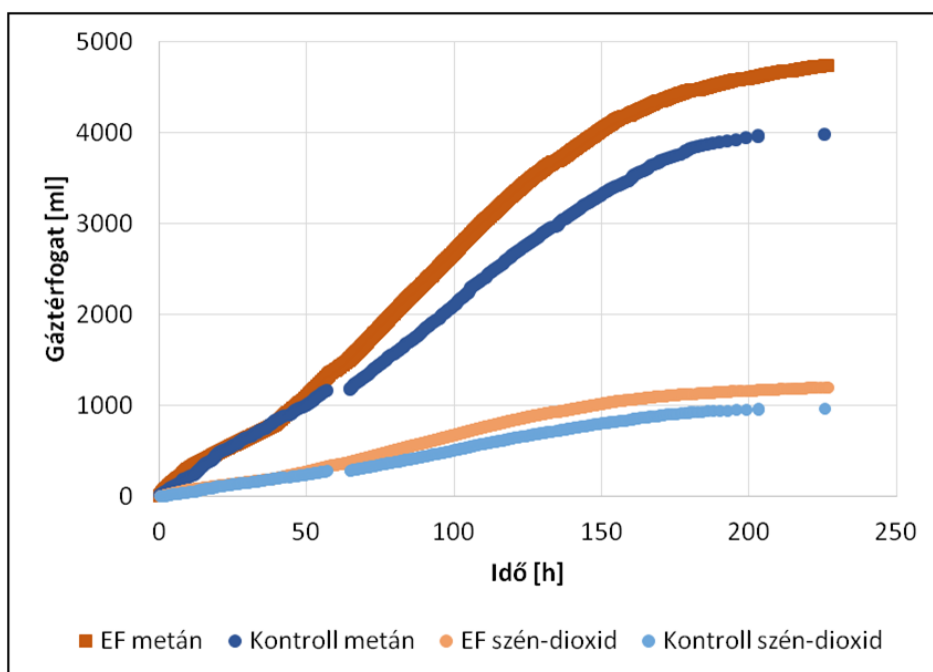
4.3. ábra: Gáztermelés 0,4 V tápfeszültség mellett

A kísérlet második fázisához tartozó biogáz-termelés eredménye látható a 4.3. ábraán. A külsőleg biztosított potenciálkülönbség az első mintegy 16 órában nem volt pozitív hatással a fermentációra. Feltehetőleg ennyi idő kellett hozzá, hogy az exoelektrogén mikroorganizmusok számottevően elszaporodjanak a rendszerben, bár ez az idő az elmélet alapján várthoz képest meglepően rövid. Ezt követően egyre látványosabb eltérést tapasztaltam a keletkező biogáz mennyiségében: a 70. órában 500 ml-rel több gázt termelt az elektrofermentor, a 90. órára pedig ez a különbség elérte a 700 ml-t.



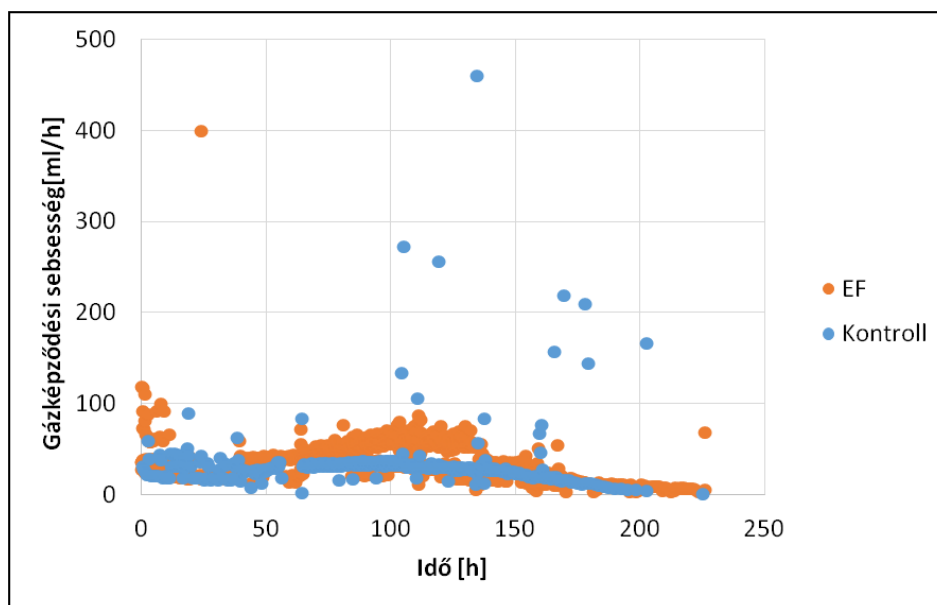
4.4. ábra: Gáztermelés 0,8 V tápfeszültség mellett

Azért, hogy megvizsgáljam, milyen hatással van a rendszerre az elektródok potenciáljának változtatása, a 95. órában a feszültséget átállítottam 0,8 V-ra, ennek eredménye látható a 4.4. ábraán. Mivel a görbék közötti távolság nem változott számottevően, a két rendszerben a feszültségállítást követően nem volt lényeges különbség a keletkező gáz mennyiségét illetően. (Az elektrofermentornál látható magasabb értékek így csupán a 0,4 V-os tápfeszültség alkalmazásának tudhatók be.) Bár a magasabb feszültség nem járt pozitív hatással, a vonatkozó szakirodalomban [16, 17] leírt gátló hatást és instabilitást nem tapasztaltam.



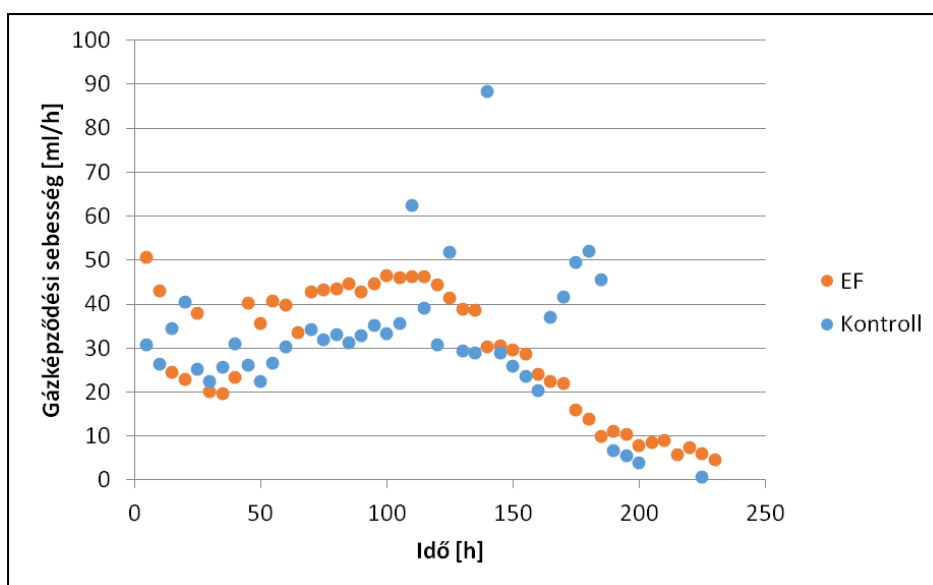
4.5. ábra: Metán és szén-dioxid mennyisége a termelt biogázban

Az előállított biogáznak nem csupán a mennyisége, hanem a metántartalma is meghatározó jelentőségű a gyakorlati felhasználás szempontjából. A 4.5. ábra a kísérlet során keletkezett metán és szén-dioxid mennyiségét mutatja be mindkét reaktor esetében. A diagramon látható eltérés csak a biogáz-termelés mértékében tapasztalt különbségre vezethető vissza, a gázkromatográfiás mérés alapján ugyanis a biogáz metántartalma a hagyományos és az elektrofermentációs esetben is átlagosan 80 % volt a kísérlet teljes időtartama alatt. (Ez egyébként az irodalom alapján várt 65-70 %-hoz képest viszonylag magas metántartalmat jelent.) Az adatok alapján megállapítható, hogy sem a 0,4 V, sem a 0,8 V értékű külső potenciál nem volt hatással a keletkező biogáz összetételére, bár az utóbbi néhány év publikációi alapján megnövekedett metántartalmat vártam az elektrofermentorban.



4.6. ábra: Biogáz képződési sebessége

A biogáz mennyisége és összetétele mellett fontos jellemzője a rendszernek a gázképződési sebesség alakulása a fermentáció során, ezt mutatja be a 4.6. ábra. A diagramon látható, hogy a kontroll esetében többször tapasztaltam extrém magas sebességet, ugyanakkor alapvetően alacsonyabb értékek jellemzik ezt a reaktort. Mivel a pillanatnyi gázképződési sebességet a rendszer érzékenysége folytán számos körülmény befolyásolhatja, az egyes kiugró értékekből illetve az ingadozásból nem vonható le kellő biztonsággal általános konklúzió. Továbbá a nagy adatszám rontja a diagram áttekinthetőségét is. A gázképződési sebesség tendenciájának megfigyeléséhez ezért ötóránként átlagoltam a sebességértékeket, az így készített diagram látható a 4.7. ábraán.



4.7. ábra: Átlagos gázképződési sebesség

A diagram alapján elmondható, hogy a kontroll rendszer átlagos gázképződési sebessége szinte a teljes kísérlet során alacsonyabb volt az elektrofermentációnál mérthez képest, ami megfelel az összesen termelődött biogáz mennyiségében megmutatkozó különbségnek. A kezdeti szakaszra jellemző ingadozások után az elektrofermentációt egy viszonylagos stabilitás jellemzi, míg a kontroll rendszerben több kiugró értéket láthatunk a századik óra után. Ez alapján feltételezhető, hogy a külső tápfeszültségnek stabilizáló hatása van a mikroorganizmusok metabolizására, ezáltal pedig egyenletesebb biogáz-termelés érhető el.

Annak érdekében, hogy megállapítsam, valóban szignifikánsan eltér-e egymástól a két rendszerben az átlagos gázképződési sebesség, az adatsorokat t-próbával elemeztem. Az egy-szélű t-próbát külön végeztem el a 0,4 V és a 0,8 V tápfeszültség során mért sebességértékekre, így az alábbi eredményt kaptam:

$$t_{0,4\text{ V}} = 0,028$$

$$t_{0,8\text{ V}} = 0,030$$

A kapott értékek alapján megállapítható, hogy mindkét feszültségtartományban 97 % a valószínűsége annak, hogy a két adatsor közti eltérést nem a véletlen okozza, tehát statisztikailag is szignifikánsnak mondható a különbség.

5 Összefoglalás

Kutatásom a biogáz hagyományos fermentációval illetve elektrofermentációval történő előállításának vizsgálatára irányult. A termelt biogáz mennyisége, valamint metán - széndioxid aránya mindkét eljárás esetében közelítőleg megegyezett az szakirodalmi értékekkel. Az eredmények alapján elmondható, hogy a 0,4 V tápfeszültség hatására a biogáz-termelés jelentősen növekedett, 0,8 V alkalmazásánál az előállított gáz mennyiségét nem befolyásolta a feszültség. A gázképződési sebességre a tápfeszültség mindkét esetben stabilizáló hatással volt, ugyanakkor a biogáz összetétele végig megegyezett az elektrofermentációs és a kontroll rendszerben, így a metántartalmat nem sikerült külső potenciál alkalmazásával növelni.

A továbbiakban tervezem újabb kísérletekkel megállapítani az optimális feszültségtartományt, valamint meghatározni az elektrofermentáció hatékonyságát meghatározó egyéb paramétereket.

6 Irodalomjegyzék

- [1] R. Moscoviz, J. Toledo-Alarcón, E. Trably, and N. Bernet, “Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems From Microbial Fuel Cells to EF,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 856–865, 2016.
- [2] M. C. Potter, “Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds,” *Proc. R. Soc.*, 1911.
- [3] H. Civelek Yoruklu, E. Oguz Koroglu, A. Demir, and B. Ozkaya, *The Electromotive-Induced Regulation of Anaerobic Fermentation*. Elsevier B.V., 2019.
- [4] D. H. Park, M. Laivenieks, M. V Guettler, M. K. Jain, and J. G. Zeikus, “Microbial Utilization of Electrically Reduced Neutral Red as the Sole Electron Donor for Growth and Metabolite Production,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 7, pp. 2912–2917, Jul. 1999.
- [5] K. Rabaey and R. A. Rozendal, “Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, p. 706, Sep. 2010.
- [6] B. Vajda, “Két-kamrás mikrobiális üzemanyagcellák vizsgálata,” Pannon Egyetem, 2015.
- [7] B. Környei, “*Shewanella putrefaciens* törzssel működtetett mikrobiális üzemanyagcella,” Pannon Egyetem, 2015.
- [8] B. Borza, “Mikrobiális elektrohidrogenézis cellák vizsgálata,” Pannon Egyetem, 2015.
- [9] A. Schievano, T. Pepé Sciarria, K. Vanbroekhoven, H. De Wever, S. Puig, S. J. Andersen, K. Rabaey, and D. Pant, “Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 866–878, 2016.
- [10] L. Nyitrai and G. Pál, “Az élő szervezetekben lejátszódó fő reakciótípusok,” in *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*, Eötvös Lóránd Tudományegyetem, 2013.
- [11] C. G. Liu, C. Xue, Y. H. Lin, and F. W. Bai, “Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, pp. 257–265, 2013.
- [12] S. J. Berrios-Rivera, G. N. Bennett, and K.-Y. San, “The Effect of Increasing NADH Availability on the Redistribution of Metabolic Fluxes in *Escherichia coli* Chemostat Cultures,” *Metab. Eng.*, vol. 4, no. 3, pp. 230–237, 2002.
- [13] J. Hajdú, “Bio gázüzemek működése és biogáz üzemi technológiák,” *Obekk Tudományos Szakmai Kiadványok*, vol. 11/12, 2009.

-
- [14] J. Tamás and L. Blaskó, “A biogáz-termelés technológiai háttere,” in *Environmental Management*, Debreceni Egyetem, 2008.
- [15] Z. Dou, C. M. Dykstra, and S. G. Pavlostathis, “Bioelectrochemically assisted anaerobic digestion system for biogas upgrading and enhanced methane production,” *Sci. Total Environ.*, vol. 633, pp. 1012–1021, 2018.
- [16] G. Zhen, X. Lu, T. Kobayashi, L. Su, G. Kumar, P. Bakonyi, Y. He, P. Sivagurunathan, N. Nemestóthy, K. Xu, and Y. Zhao, “Continuous micro-current stimulation to upgrade methanolic wastewater biodegradation and biomethane recovery in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor,” *Chemosphere*, vol. 180, pp. 229–238, 2017.
- [17] A. Ding, Y. Yang, G. Sun, and D. Wu, “Impact of applied voltage on methane generation and microbial activities in an anaerobic microbial electrolysis cell (MEC),” *Chem. Eng. J.*, vol. 283, pp. 260–265, 2016.

Köszönetnyilvánítás

A kutatómunkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00016 nyilvántartási számú, „Vízbázis-védelem, moduláris, mobil vízkezelő rendszerek és szennyvízkezelő technológiák fejlesztése a Pannon Egyetem bázisán hazánk dinamikus export növekedésének elősegítése érdekében” című projekt támogatta.



Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018**



Útépítési kötőanyagok minőségjavítási lehetőségeinek vizsgálata

Készítette: Tálosi Gréta

Témavezető: Dr. Holló András

Konzulens: Gergó Péter

Mérnöki Kar, Vegyészmérnöki és Folyamatmérnöki Intézet, MOL
Ásványolaj- és Széntechnológiai Intézeti Tanszék

A pályamunka lezárásának dátuma: 2018. 11. 04.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	318
2. Irodalmi áttekintés.....	320
2.1. Bitumenek és minőségjavításuk	320
2.1.1. Polimerek felhasználása bitumenekben.....	321
2.1.2. Gumiőrlemény felhasználása bitumenekben	323
2.2. Bioolajok és minőségjavításuk	325
2.2.1. Bioolajok felhasználása bitumenekben	327
3. Kísérleti rész	331
3.1. Célkitűzés	331
3.2. Felhasznált alapanyagok.....	331
3.2.1. Alapbitumen	331
3.2.2. Gumibitumen.....	331
3.2.3. Polimerrel módosított bitumen	332
3.2.4. Bioolaj nehéz maradék	332
3.3. A kísérleti minták összetétele	333
3.4. Vizsgálati módszerek.....	333
3.4.1. Alapvizsgálatok	333
3.4.2. Reológiai vizsgálatok	334
3.5. Kísérleti eredmények és értékelés	336
3.5.1. Alapvizsgálatok	336
3.5.2. Reológiai vizsgálatok	337
4. Összefoglalás	345
Irodalomjegyzék	347
Köszönetnyilvánítás	351

Rövidítések jegyzéke

APA: asphalt pavement analyzer – aszfalt analizátor

DSR: dinamikus nyíróreométer

|G*|: komplex modulusz

|G*|/sin δ : termikus stabilitás (nyomvályúsodási hajlam)

GmB: gumibitumen

HDO: hidrogénező oxigéneltávolítás

HPTT: magas nyomású hőkezelés

LVE tartomány: lineáris viszkoelasztikus tartomány

m: kúszássebesség

MSCR: ismételt kúszás-relaxáció vizsgálat

PmB: polimerrel módosított bitumen

RTFOT: rolling thin film oven test – forgó vékony filmes öregítési teszt

S: kúszási merevség

SBS: sztirol-butadién-sztirol blokk kopolimer

δ : fázisszög

γ : deformáció

1. Bevezetés

A világ bitumengyártása növekvő kihívásokkal néz szembe. Napjainkban nagymértékben fokozódnak a közúti közlekedésben alkalmazott útépítési kötőanyagok teljesítményével szemben támasztott követelmények, melyek szigorodása magával hozta új, nagyobb teljesítményű, környezetbarát, de drága kötőanyagok felhasználását is. Ennek következtében intenzíven kutatott területté vált a nagyobb forgalmi terhelhetőségű, hosszabb élettartamú aszfaltok kifejlesztése, melyet nagyobb teljesítményű kötőanyagok kifejlesztésével lehet elérni. Ezek legfontosabb képviselői a különböző polimerekkel modifikált bitumenek, illetve a gumibitumenek, melyek hosszabb élettartamot, nagyobb terhelhetőséget, jobb tapadást és közlekedésbiztonságot nyújtanak [1][2][3].

Az utóbbi évek környezetvédelmi törekvéseire válaszolva több kutató vizsgálta különböző bio eredetű alapanyagok – ezek közt biomassza pirolízis folyadékok, bioolajok módosító hatását bitumen elegyekre. Azt találták, hogy különböző bioolajok megfelelőek lehetnek bitumen elegyek módosítására, illetve helyettesítésére [4]. A feldolgozott biomassza alapjául szolgált már mikroalga [5], állati eredetű hulladék [6][7], kukoricakóró [8], kerti hulladék [9], tea [10] és kávé maradék [11], repce [12] és szójabab, stb. [13]. Megfelelő minőségjavítási lépések után kedvező lehet a különböző bioolajok felhasználása, mivel javíthatják a bitumenes kötőanyagok deformációval szembeni ellenálló képességét.

Egy másik szempontból megközelítve, a fenntartható fejlődés jegyében a nem fosszilis eredetű alternatív alapanyagok használata lehet az egyik hosszú távú megoldás a kőolaj eredetű bitumenek részleges helyettesítésére. A 2009/28/EK irányelv, a megújuló energiaforrásból előállított energia támogatásáról szóló EU direktíva szerint a fosszilis eredetű energiahordozók arányát csökkenteni kell. 2020-ig az EU energiaigénynek legalább 20%-át megújuló forrásból kell fedezni, legalább 10%-ot a motorhajtóanyagok nem fosszilis eredetű alternatívákkal történő helyettesítésével kell elérni [14]. A legújabb javaslat szerint 2030-ra 32 energia %-ot kell fedezni megújuló forrásból [15]. Bitumenekre eddig ilyen előírások, javaslatok még nem voltak. Azonban, ha ezt az iparágat is eléri az új szabályozások, illetve az esetleges kőolaj felhasználás csökkenése magával vonja a rendelkezésre álló bitumen mennyiségének csökkenését, akkor a bioolajok alkalmazása jó alternatíva lehet.

A fa pirolízis folyadékból vízmentesítést követő tovább feldolgozásával (desztillálással) nyert bioolaj nehéz maradékának bitumenadalékként való hasznosíthatósága jelenleg még nem tisztázott terület. A polimerrel módosított bitumenek, valamint a

gumibitumenek alkalmazása már széles körben elterjedt, azonban nem készült még összehasonlító elemzés a bioolaj nehéz maradék módosító hatásáról gumibitumenes, illetve polimerrel modifikált bitumenes kötőanyag-rendszerekben. Ezért dolgozatomban célul tűztem ki olyan kötőanyag kompozíciók előállítását és vizsgálatát, melyek tartalmaznak biokomponenst is, valamint már önmagukban vagy együttesen más módosítószerekkel az alapbitumenhez képest jobb alkalmazástechnikai tulajdonságokat biztosíthatnak.

Szakmai munkám során kereskedelmi forgalomban kapható 50/70 fokozatú útépítési alapbitumen minőségjavítási lehetőségeit vizsgáltam. A kísérletek során biomassa eredetű, pirolízisből származó és utólagosan minőségjavított biokomponens módosító hatását vizsgáltam az alapbitumen esetén. Továbbá gumiőrleménnyel, illetve sztirol-butadién-sztirol blokk kopolimerrel (SBS) együttesen alkalmazva is végeztem vizsgálatokat. Biokomponensként egy kereskedelmi forgalomban is beszerezhető bioolaj nagyhőmérsékletű minőségjavítása során nyert nehéz terméket (maradékot) alkalmaztam.

2. Irodalmi áttekintés

Dolgozatom irodalmi részében áttekintem TDK munkám szakirodalmi háttérét. Ezek között a bitumenek fajtáit, azok összetételét, minőségjavításuk lehetőségeit. Ezen belül kitérek a polimerrel módosított bitumen és a gumibitumen alkalmazásának előnyeire. Foglalkozom továbbá a biomassa pirolízisével nyerhető folyadékokkal, azok minőségjavításának szükségszerűségével, majd tárgyalom felhasználhatóságukat bitumenekben.

2.1. Bitumenek és minőségjavításuk

A kőolajfinomítókban a legnagyobb volumenben felhasznált bitumengyártási alapanyag a vákuum desztilláló kolonna maradéka, a gudron. A gudront leggyakrabban átalakítják fehéráruvá különböző konverziós technológiákkal. Azonban a fűtőolajok és bunkerolajok mellett a legnagyobb volumenű direkt alkalmazás az építőiparban történő felhasználás [3]. Bitumenként emellett felhasználhatók még a különböző hőbontásos technológiából nyert maradék áramok. Például viszkozitástörő üzemek nehéz maradékából is állíthatók elő bitumenfrakciók. Egyes finomítókban a gudron könnyű paraffinokkal végzett aszfalténmentesítésének maradékát vagy a maradék hidrokrakkoló üzemek át nem alakult vákuummaradékát is felhasználják különböző alkalmazási célú bitumenek előállítására. A bitumeneket főként nagy molekulatömegű paraffinos, nafténes és aromás szénhidrogének alkotják, de sok molekula tartalmaz heteroatomokat, így ként, nitrogént, oxigént és különböző fémeket is. A bitumeneket aszfalténes és malténes (telített, aromás, gyantás) anyagcsoportokra bonthatjuk. Az aszfaltének alkotják a bitumenek vázát, ezért a bitumenek jellemző tulajdonságai – például viszkozitás, hőérzékenység – főként ettől a vegyületcsoporttól függenek. A bitumenek összetételüket tekintve 80-85%-ban szénből, 9-10%-ban hidrogénből és heteroatomokból állnak [1][16][17].

A bitumenek a vizsgálati hőmérséklettől függően viszkózus vagy viszkoelasztikus jellegű anyagok lehetnek. Melegítés hatására meglágyulnak, majd folyékonyá válnak. A széles hőmérséklettartományban viszkoelasztikus tulajdonságokat mutató bitumenek folyási tulajdonságai reológiai mérésekkel vizsgálhatók. A bitumenek reológiai jellemzése lehetővé teszi teljesítményelvű osztályozásukat is [1].

A bitumeneket legnagyobb mennyiségben útépítési célra használják fel. A bitumen az aszfaltburkolatok és bitumenes pályaszerkezeti rétegek kötőanyaga, amely az aszfalt

szervetlen komponenseit – homok, kőzúzalékok, töltőanyag (mészkőliszt) – tartja össze. Az aszfalt utakkal szemben támasztott követelmények szigorodása magával hozta nagyobb teljesítményű, környezetbarát, de nagyrészt drága kötőanyagok felhasználását is. Így az alternatív, olcsóbb kötőanyagok fejlesztése intenzíven kutatott területté vált [1][18].

2.1.1. Polimerek felhasználása bitumenekben

A speciális igényeket kielégítő bitumen előállítás egyik módja a modifikálás, módosítás, leggyakrabban különböző polimerekkel. A módosítószer fajtájának és koncentrációjának függvényében a modifikált bitumenek rugalmassága nagyobb, hosszabb az élettartamuk és szélesebb hőmérsékleti tartományok között használhatók fel, mivel alacsonyabb hőmérsékleten következik be ridegtörésük, illetve magasabb a lágyuláspontjuk, mint a módosítás nélküli kereskedelmi, úgynevezett alapbitumeneknek. Az adalékanyagokkal történő komplex modifikálásnak köszönhetően a kötőanyag fizikai és mechanikai tulajdonságai szignifikánsan javulnak, így biztosítható az elvárt minőség és tartósság. Technikai szempontból a bitumen alapú kompozit rendszerek előállításakor a következő követelményeket kell figyelembe venni [1][19]:

- az adalék ne bomoljon az aszfalt keverési hőmérsékletén,
- összeférhető legyen a bitumennel a keverési folyamat alatt a hagyományos berendezésekben az adott hőmérsékleten,
- nyáron növelje a bitumen deformációval szembeni ellenállását anélkül, hogy a viszkozitást a keverési és terítési hőmérsékleten növelné, továbbá ne okozzon ridegtörést alacsony hőmérsékleten,
- legyen kémiai és fizikailag stabil, ne változzanak a tulajdonságai a szállítás, tárolás, feldolgozás alatt és az üzemelési körülmények között.

A modifikáló szerként használatos polimereket négy osztályba sorolhatjuk azon tulajdonságaik alapján, amelyek meghatározzák a bitumenre gyakorolt módosító hatásukat és az eljárási módot a polimerrel módosított bitumen (PmB) előállítására. Eszerint megkülönböztetünk elasztomereket pl. gumiőrlemény; hőre lágyuló elasztomereket pl. SBS; hőre keményedő polimereket pl. epoxigyanta; illetve hőre lágyuló polimereket pl. polisztirol, PVC [19].

Yildirim összefoglalta különböző polimerek módosító hatását bitumen elegyekre. Megállapítása szerint a természetes gumik csökkentik a nyomvályú képződési hajlamot és növelik a duktilitást, azonban termikusan degradálódhatnak és gyakran kompatibilitási

problémák léphetnek fel bitumenben történő alkalmazásuk esetén. A sztírol-butadién kaucsuk (SBR) polimer javítja a keverék duktilitását, a rugalmas tulajdonságokat és az aszfalt adhéziós-kohéziós tulajdonságait. Az SBR-t később a sztírol-butadién sztírol (SBS) kopolimer váltotta fel, mely az előzőnél szélesebb körökben alkalmazható és nagyobb a szakítószilárdsága, napjainkra pedig a leggyakrabban alkalmazott modifikáló szerré vált. Az SBS, mely polisztirol és polibutadién blokkokból (polisztirol-polibutadién-polisztirol) felépülő kopolimer javítja a bitumen elasztikus tulajdonságait, valamint jobb tapadást biztosít a közetchez, alkalmazásával nagyobb kohézió és nagyobb komplex modulusz érhető el, illetve növeli a terhelhetőséget. Továbbá mérsékelten javítja a bitumen fáradási és hidegoldali (termikus repedés, stb.) karakterét, emellett az SBS-sel módosított bitumenes kötőanyagot tartalmazó aszfalt újrahasznosítható [1][20].

A Dupont által kifejlesztett Elvaloy® egy olyan módosítószer, mely kémiai kötéseket alakít ki a bitumennel, így alkalmazása esetén stabilitási, szeparációs problémák nem merülnek fel. Az Elvaloy® egy elasztomer terpolimer, azaz egy három különböző monomerből szintetizált polimer, mely láncvégi propilén-oxid csoporttal rendelkezik. A feltételezett reakciómechanizmus szerint ez a csoport reagál az aszfaltén molekula karboxil csoportjával, kialakítva így egy észter kötést. Az Elvaloy® előnye még, hogy javítja a bitumen reológiai tulajdonságait nagy hőmérsékleteken [21][22].

Bulatović és társai 70/100-as fokozatú alapbitumen minőségjavítását vizsgálták lineáris, valamint radiális SBS blokk kopolimer módosítószerekkel. A minták 2, 3, 4, 5, valamint 7 m/m% adalékot tartalmaztak, melyeken hagyományos vizsgálatokat hajtottak végre öregítés előtt, majd RTFOT (rolling thin film oven test) öregítés után, így mérték a penetrációt, lágyuláspontot, duktilitást és a Fraass töréspontot. Továbbá reológiai vizsgálatokat is végeztek, melyekből megállapították a dinamikus nyírómoduluszt ($|G^*|$) – mely a fáradási tulajdonságról és a repedések keletkezésével szembeni ellenállóképességről nyújt információt –, a fázisszöveget (δ) – mellyel a viszkoelasztikus tulajdonság állapítható meg –, illetve a $|G^*|/\sin\delta$ tényezőt – mely a termikus stabilitásról ad információt. A mérési eredményekből megállapították, hogy mindkét típusú SBS javította az alapbitumen reológiai tulajdonságait, az adalék koncentrációjának növelésével pedig javult a minták elasztikus jellege. Öregítés után valamennyi minta keményedett, azonban a polimert tartalmazó minták esetén kisebb mértékben, legjobb eredményeket a radiális SBS-t tartalmazó minták esetén érték el [23].

Egy másik kutató, Airey, lineáris SBS polimer alkalmazhatóságát vizsgálta különböző kőolaj eredetű bitumenekben. Az egyik bitumen paraffinos, míg a másik nafténes kőolajból származott. Megállapította, hogy kiemelkedő fontosságú a reológiai tulajdonságok tekintetében, hogy milyen forrásból származik a bitumen, valamint milyen kötések, mátrix-adalékanyag kölcsönhatások jönnek létre a bitumen és a polimer között. Minél magasabb SBS koncentrációt alkalmazott, valamint minél nagyobb volt a bitumen aromástartalma, annál nagyobb lett a viszkozitás a kialakuló elasztikus hálózat következtében, nőtt a komplex modulusz ($|G^*|$) értéke és az elasztikus hajlam, kiváltképpen magas hőmérsékleteken. Bulatovićékhoz hasonlóan Airey is azt tapasztalta, hogy az elasztikus hajlam csökken az öregítés után, melyet az SBS kopolimer degradációjával magyarázott [24].

2.1.2. Gumiőrlemény felhasználása bitumenekben

Az alternatív kötőanyagok egyik legfontosabb képviselője a gumibitumen. A gumibitumen egy útépítési kötőanyag, melyet bitumenből és használt gumiabroncsokból származó gumiőrleményből, esetleg egyéb adalékanyagok felhasználásával állítanak elő. A gumibitumenek mintegy 10-20% gumiőrleményt tartalmaznak típustól függően. A gumibitumen alkalmazásának főbb előnyei a következők [2][3][18][25]:

- hosszabb élettartam az útépítési alapbitumenes úthoz képest,
- kiváló fáradási tulajdonság, így kisebb hajlam a termikus repedések kialakulására,
- nagyobb terhelhetőség, kisebb nyomvályú képződési hajlam,
- kiváló tapadás az ásványi közethez, csökken a kátyúk kialakulásának esélye,
- a hosszabb élettartam és jobb ellenálló képesség miatt alacsonyabb fenntartási költség,
- kisebb menet zaj,
- jobb vízelvezető képesség és tapadás a gépjármű abroncs és az útfelület között, így nagyobb közlekedésbiztonság.

A gumiőrlemény bitumenadalékként való alkalmazhatóságának kérdéskörét járta körbe Gawel munkatársaival. A használt gumiabroncsok újrahasznosításának egyik leghatékonyabb módjaként tartják számon a bitumenes kötőanyagokban való felhasználásukat. Gazdasági szempontból tekintve pedig olcsóbb alternatívái lehetnek a többi hagyományos polimer módosítószernek. Tanulmányuk szerint a gumiőrlemény-bitumen interakció egy diffúziós jelenség. A gumiőrlemény részecskék abszorbeálják a bitumen azonos oldhatóságú komponenseit, és megduzzadnak. A duzzadás mértéke függ a bitumen kémiai összetételétől és viszkozitásától, a gumiőrlemény koncentrációjától, az őrlemény

szemcséinek méretétől és összetételétől, valamint a keverési hőmérséklettől és annak időtartamától. A gumiőrlemény-bitumen interakció nagy mértékben befolyásolja a keletkezett kötőanyag-rendszer teljesítőképességét. Az így előálló gumibitumen jó technológiai jellemzőkkel bír és hosszú az élettartama. Gazdasági számítások is alátámasztják a gumibitumen felhasználásának jelentőségét [26].

Geiger és munkatársai részletes vizsgálatokat, többek között életciklus-analízist végeztek a 2013-ban piacra vezetett MOL gumibitumennel előállított aszfalt kopórétegen, majd összevetették az eredményeket a Magyarországon legnagyobb mennyiségben használatos 50/70 fokozatú útépítési alapbitumen esetén mért értékekkel. Az összehasonlítás eredményeit az **1. táblázat** mutatja be. Megállapították, hogy a gumibitumen használata növelheti a környezettudatosságot és a vállalatok közösségi szerepvállalását demonstrálhatja, mivel egy olyan hulladékanyag felhasználásával állít elő a követelményeknek megfelelő és kedvező ár/érték aránnyal rendelkező terméket, mely súlyos problémákat vet fel napjainkban (hulladék gumiabroncsok helyzete) [27].

1. táblázat: Gumibitument és alapbitument tartalmazó aszfaltrétegek összehasonlítása [27].

Tulajdonság	Különbség
Előállítási költség ⁽¹⁾	+ 3–4 %
Élettartam	+ 50 %
Teljes élettartam során felmerülő költségek	- 29–32 %
CO ₂ emisszió teljes életciklus alatt ⁽²⁾	- 25–30 %
Féktávolság	- 5–10 %
Közlekedési zaj	- 3 dB (-50 %)

⁽¹⁾ MOL gumibitumen piaci árával számítva. A gumibitumen tonnája 10000 Forinttal drágább, mint az 50/70 fokozatú útépítési bitumennek.

⁽²⁾ Minden forrást beleszámítva (kötőanyag előállítása és szállítása, aszfalt elegy előállítása, szállítása és fektetése, és aszfalt kopóréteg eltávolítása. +50% élettartammal számítva.

Mashaan és társai a gumibitumen keverési körülményeinek hatását, illetve különböző típusú gumiőrlemény szemcsék felhasználását vizsgálták bitumen minőségjavítási céllal. Dinamikus nyíróreométerrel végeztek reológiai vizsgálatokat, illetve lágyuláspont mérést hajtottak végre az egyes, különböző keverési időtartamú és keverési hőmérsékletű mintákon. Vizsgálataik alapján megállapították, hogy a szemcse típusa és a keverési hőmérséklet nagyban befolyásolja a gumibitumen tulajdonságait, azonban a keverési időnek nincs jelentős hatása. A hőmérséklet növekedésével nőtt a komplex modulusz és a lágyuláspont, valamint csökkent a fázisszög. Tanulmányukban beszámoltak egy összefüggésről a fizikai-mechanikai tulajdonságok becslésére, mely független a keverési körülményektől. Ebben a reológiai paraméterek ($|G^*|$, δ) és a lágyuláspont közötti kapcsolatot tárgyalják, miszerint a fázisszög és

a lágyuláspont korrelál, a korrelációs koefficiens $R^2=0,95$. Tehát a lágyuláspont értékéből becsülhetővé válik a kötőanyag elasztikus tulajdonsága [28].

Kök és Çolac kutatásuk során gumiőrleménnyel és SBS-sel együttesen módosított bitumenes kötőanyag-rendszereket hasonlítottak össze. Hagyományos és reológiai vizsgálatokkal vetették össze a két adalék hatását. A hagyományos bitumen vizsgálatokból megállapították, hogy mind az SBS, mind pedig a gumiőrlemény esetén csökkent a viszkozitás hőmérsékletfüggése, az SBS esetén nagyobb mértékben. A reológiai mérések eredményeiből megállapították, hogy magasabb frekvencia értékek esetén a két adalékanyag közel azonos minőségjavulást indukált. A gumiőrlemény kisebb fázisszöget eredményezett azonos komplex modulusz esetén alacsony frekvencián, azaz elasztikusabb módosítószerként viselkedett. Eredményeik alapján legfeljebb 8%-os gumiőrlemény koncentráció alkalmazását javasolják módosítószerként. A 8% gumiőrlemény tartalmú minta közel azonos tulajdonságokat eredményezett, mint a 4% SBS tartalmú minta, az alapbitumenhez képest pedig 50%-kal nőtt a merevség, a komplex modulusz értéke. A gumiőrlemény használatával jelentős költségmegtakarítást lehet elérni az SBS-sel módosított bitumenhez képest, valamint segíthet megelőzni a használt gumiabroncsok felhalmozódásának környezeti problémáját is [29].

2.2. Bioolajok és minőségjavításuk

A pirolízis biológiai eredetű szerves alapanyagok, kommunális- és más, például műanyag hulladékok termokémiai bontása oxigénmentes közegben, szabályozott körülmények között. A folyamat során több termék keletkezhet: szilárd fázisú pirolíziskoksz, víztartalmú szerves folyadék fázis, vagy külön szerves és vizes fázis, illetve gáz. Az alacsony hőmérséklet és hosszú tartózkodási idő a kokszképződésnek kedvez, a magas hőmérséklet és hosszú tartózkodási idő a gázképződést segíti elő, míg közepes hőmérséklet és rövid tartózkodási idő alkalmazásával a folyadékhozam maximalizálható [30].

A biomassa pirolízisével előállított biofolyadékok, bioolajok különböző molekulák komplex keverékei, melyek több, szimultán lejátszódó vagy versengő reakció eredményeként keletkeznek. A sokszínű kémiai összetétel jelentős kihívást jelent a bioolaj hasznosítása szempontjából. A bioolaj kedvezőtlen tulajdonságai közé tartozik annak nagy víz- és oxigéntartalma, savas kémhatása a jelenlévő karbonsavak miatt, bomlékonysága a reaktív komponensek következtében, és lerakódási hajlama csővezetékben, reaktorokban az adott körülmények között kialakuló oligomer, polimer részecskék miatt [30][31].

A jelenlévő oxigéntartalmú szénhidrogének miatt a bioolaj minőségjavításának az oxigéntartalom csökkentését magában kell foglalnia. Többféle minőségjavítási módszert tanulmányoztak eddig a kutatók; ezek közül a legfontosabbak a hidrogénező oxigéneltávolítás (HDO), a katalitikus krakkolás és a nagy nyomású hőkezelés (HPTT). A HDO reakció során nagy hidrogénnyomást alkalmaznak katalizátor jelenlétében, a folyamat során az oxigén víz formájában távozik. A katalitikus krakkolást atmoszférikus vagy néhány bar nyomáson végzik savas katalizátorok (például zeolitok) jelenlétében. A HPTT eljárás esetén a pirolízis olajat, folyadékot nagy nyomáson hőkezelik a magasabb energiasűrűség elérése érdekében [32].

Hossain és munkatársai összefoglalták a különböző biomasszából nyert pirolízis technikákat, termékeket és azok felhasználhatóságát (**2. táblázat**) [33].

2. táblázat: A pirolízis különböző módszerei [33].

Technika	Hőmérséklet, °C	Tartózkodási idő	Folyadék hozam, %	Koks hozam, %	Gázhozam, %
Gyors pirolízis	500	Rövid forró gőz tart. idő ~1 s	75	12	13
Közepes pirolízis	500	Forró gőz tart. idő: 10-30 s	50	25	25
Lassú-pörkölés	290	Szilárd tart. idő: 30 min	-	82	18
Lassú-karbonizáció	400	Nagyon hosszú gőz tart. idő: órák-napok	30	35	35
Flash pirolízis	400	Rövid szilárd tart. idő: <0,5 s	65	24	10

Papari és munkatársai összevetették a különböző típusú fa alapú biomasszákból előállított bioolajok főbb fizikai és kémiai jellemzőit. A fás biomassza fő összetevői a lignin (20-30%), a cellulóz (40-45%) és a hemicellulózok (25-35%). Közülük a kémiai lebomlásnak főleg a lignin áll ellen, ezért előnyösebb a minél kisebb lignintartalmú biomasszát átalakítani [34].

A szakirodalmi közlemények alapján megállapítható, hogy a különböző bioolajok hozama és főbb jellemzői legnagyobb mértékben a pirolizáló reaktor típusától, az alkalmazott hőmérséklettől, az alapanyag minőségétől és annak szemcseméretétől függenek. A biomassza pirolízisével kapott termékek oxigéntartalma nagy, így nem megfelelő a fűtőértékük, továbbá nagy a viszkozitásuk, a sűrűségük és a savszámuk. Ezekből következően kis értékű energetikai termékek. Közvetlenül motorhajtóanyag keverőkomponensként nem használhatók fel, minőségjavításra szorulnak. A további feldolgozás során a pirolízis folyadékból

visszamaradhat egy nehéz, aszfalténeken dús szerves fázis, melynek a hasznosítása jelenleg még nem megoldott. Ezért az utóbbi időben több kutatócsoport kezdte meg ezen frakció bitumenben történő felhasználásának tanulmányozását.

2.2.1. Bioolajok felhasználása bitumenekben

A bioolajok gyakorlati felhasználását tekintve nagy jelentőségűek lehetnek a biomotorhajóanyag előállító üzemek. Ezekben melléktermékként nagy lignintartalmú folyadék (bioolaj) keletkezik. Ezen bioolajoknak több hagyományos felhasználási módja is ismert, ezek beton-adalékanyag, kötőanyag, fűróiszap, diszpergáló anyag. A lignin, mely egy biopolimer, a nagy fenoltartalma miatt antioxidáns hatású. Néhány vizsgálat eredménye alapján kiderült, hogy a lignin felhasználható bitumen adalékanyagként anélkül, hogy kedvezőtlenül befolyásolná annak teljesítőképességét [35].

Vignesh és munkatársai összefoglalták a biokomponenst is tartalmazó bitumen felhasználásának előnyeit, melyek a következők [36]:

- hazai, nem élelmiszer alapú forrásokból állítható elő,
- csökkentheti az importált kőolaj mennyiségét,
- helyettesíteni tudja a kőolaj alapú bitument, mint adalékanyag, módosítószer,
- csökkenti az ökológiai lábnyomot,
- csökkenteni tudja a bitumen keverési hőmérsékletét, így az útépítési költségeket is,
- csökkenti az üvegházhatású gázok kibocsátását a kisebb energiaigény miatt,
- antioxidáns hatású, mely következtében növelheti az utak élettartamát,
- árkategóriában versenyképes lehet.

További szempont lehet, hogy a maradékfeldolgozó technológiával rendelkező kőolajfinomítók szabad kapacitás esetén a bitumenként/fűtőolajként nem értékesített gudronból értékes fehérarut állíthatnak elő.

Metwally és munkatársai megállapították, hogy a bioolajokat nem lehet felhasználni bio-kötőanyagként vagy útépítési anyagként előzetes hőkezelés vagy minőségjavítás nélkül a magas víz- és illékony anyag tartalma következtében. Az előzetes kezelés vagy minőségjavítás módját annak alapján kell megválasztani, hogy milyen forrásból származik a bioolaj és milyen módszerrel állították elő, mivel ezek határozzák meg a bioolaj kémiai összetételét. Továbbá rávilágítottak arra is, hogy a bioolajok viszkozitási tartománya alacsonyabb, mint a bitumeneké. A bio-kötőanyagok magas hőmérsékleti tartományban nem módosítják jelentős mértékben a bitumen tulajdonságait, azonban alacsonyabb hőmérsékleten

a magas oxigéntartalom következtében szignifikáns hatással lehetnek a teljesítőképességre [37].

Yang és munkatársai fa pirolíziséből származó bioolaj hatását vizsgálták bitumen elegyek mechanikai teljesítőképességére. 5, illetve 10 m/m%-ban keverték kezeletlen bioolajat, vízmentesített bioolajat és polimerrel módosított bioolajat bitumenbe, melyet ezután és különböző vizsgálati módszerekkel minősítettek. APA (asphalt pavement analyzer) tesztet, négy-pontos hasábhajlító fáradási tesztet, dinamikus modulusz tesztet és közvetett szakítószilárdság tesztet hajtottak végre a nyomvályú képződéssel és a fáradással szembeni ellenállóképesség, a dinamikus merevség és a szakítószilárdság mérésére. A biokomponens hozzáadásával a merevség nem változott jelentős mértékben, ahogy a nyomvályúsodásra gyakorolt hatás is minimális volt, azonban ezeket kismértékben negatív irányba befolyásolta. Nem kedvezett a bioolaj a szakítószilárdságnak sem, a fáradási jellemző azonban jelentős mértékben javult. A legjobb eredményeket a polimerrel módosított elegynél tapasztalták, összességében pedig a 10% biokomponens koncentráció bizonyult a legkedvezőbbnek [4]. Meg kell jegyezni, hogy a vízmentesített bioolaj lobbanáspontja is még túl alacsony, így a bitumen előállítása és tárolása során környezetvédelmi és biztonságtechnikai problémák merülhetnek fel. Így a bioolaj könnyebb részét érdemes motorhajtóanyag- vagy vegyipari alapanyag gyártásra felhasználni. Míg a feldolgozás során keletkező bioolaj maradék lehet például a jövő bitumengyártásának egyik alapanyaga.

Yang egy későbbi kutatásában folytatta a három típusú – kezeletlen, vízmentesített, polimerrel módosított – 5 és 10 m/m%-ban bekevert kötőanyagok vizsgálatát. Célja a bitumen kompozíciók melegoldali folyási tulajdonságainak meghatározása volt nyíróreométer (DSR) segítségével. A kísérletek során mérték a dinamikus nyírómoduluszt ($|G^*|$), a fázisszöget (δ), illetve a $|G^*|/\sin\delta$ tényezőt. Ismételt kúszásrelaxáció vizsgálat (MSCR) segítségével pedig a kötőanyagok rugalmas tulajdonságát határozták meg. A biokomponens hozzáadásával a $|G^*|$ értéke nőtt, a vízmentesített és a polimerrel módosított minták esetén nagyobb mértékben. Ez a fáradási tulajdonságnak kedvez. A δ értéke csökkent, a legnagyobb hatást a vízmentesített bioolaj esetén tapasztalták. Ebből adódóan a minta merevebb lett. A termikus stabilitás ($|G^*|/\sin\delta$) tehát összességében a nagyobb nyírómodulusz és a kisebb fázisszög következtében nőtt. Az MSCR mérések során is pozitív eredményeket kaptak, a maradó deformáció értéke csökkent és a visszaalakulás százalékos értéke nőtt. Összességében a vizsgált kötőanyagok elasztikus tulajdonsága javult, így a bioolajjal módosított bitumenek jobban ellenállhatnak a deformációnak [38].

Egy másik tanulmányban Zabelkin és munkatársai a pirolízis folyadék vízben nem oldódó frakcióját keverték 0, 10, 20, 30, 50 és 100%-os arányban bitumenbe, és vizsgálták az így kapott kötőanyag és a belőle, illetve homokból és sóderből, valamint zúzott kőből készült aszfalt tulajdonságait. A kompozit kötőanyag esetén mérték az adhéziós erőt Kisilyov módszerrel, különböző koncentrációk és fűtési körök esetén. Egy fűtési kör során a mintát felmelegítették 120°C-ra 30 percig, majd lehűtötték és hagyták egy estét stabilizálódni. A legjobb értékeket a harmadik felfűtés után tapasztalták 10% biokomponens tartalom esetén. Megvizsgálták továbbá a penetráció változását is szabványos tűpenetrációs vizsgálattal. A tű behatolásának mértéke 30% koncentrációig alig változott, majd utána csökkent a felfűtési körök számával. Az aszfaltminták esetén tömegméréssel állapították meg azok vízabszorpcióját. Ez 50%-ig kismértékben csökkent, majd utána jelentős mértékben nőtt. Úgy vélték, hogy a csökkenés azzal magyarázható, hogy a bioolaj frakció felületaktív anyagként javítja az ásványrészecskék mátrix (bitumen) általi borítottságát. Vizsgálták továbbá a száraz, illetve a vízzel telített minták merevségét töréspont meghatározásával. A merevség 20% körül maximumot vett fel, majd ennek értéke csökkent. Az optimális értékeket 10-20% esetén kapták [39].

Egy másik tanulmányban Sun és társai használt sütőolaj feldolgozásából származó bioolaj hatását tanulmányozták. Először a felhasznált alapanyagok kémiai összetételét állapították meg négy komponenses szeparációs teszt segítségével, majd a fizikai, mechanikai és folyási tulajdonságokat tanulmányozták többek között penetráció vizsgálattal, viszkozitásméréssel és reológiai vizsgálatokkal. A szeparációs teszt alapján a bioolaj főként aromásokból, gyantákból és telített vegyületekből állt. Azt tapasztalták, hogy a bioolaj hozzáadásával a lágyuláspont és a viszkozitás csökkent, a penetráció és a duktilitás értéke pedig nőtt a referencia mintához képest. A biokomponens hatására csökkent a merevség ($|G^*|$) értéke és a kúszási merevség (S), illetve nőtt a fázisszög és a kúszássebesség (m), azaz csökkent a deformációval szembeni ellenállóképesség és ezzel együtt javult a kúszási tulajdonság. Ez nagyobb ellenállást eredményez a termikus repedések kialakulásával szemben. Tehát e kísérlet azt mutatta ki, hogy a felhasznált bioolaj hozzáadása kedvez a bitumen hidegoldali jellemzőinek [40].

Su és munkatársai összefoglalták a biobitumenek előállítását és alkalmazását. Tanulmányukban a következő területek kutatására tettek javaslatot [41]:

- a biobitumen teljesítőképessége és kémiai összetétele közti kapcsolat modellezése,
- a biobitumen polimerrel (SBR) való modifikálási mechanizmusának tanulmányozása,
- a gumiőrlemény szemcsék, a bioolaj komponensek és a mátrix kötőanyag közti interakciók vizsgálata molekuláris szinten,
- különböző biobitumen módosító hatásának felmérése gumibitumenre,
- a biobitumenes kötőanyag és az abból előállított aszfalt elegy teljesítőképessége közti kapcsolat megállapítása,
- különböző biobitumenekből előállított aszfalt elegyek teljesítményének vizsgálata,
- több biobitument felhasználó technológia kifejlesztése,
- a biobitumen és a hagyományos, kőolajból származó bitumen reológiája közti különbségek megállapítása,
- az optimális biobitumen tartalom meghatározása.

3. Kísérleti rész

Dolgozatom kísérleti részében megfogalmazom célkitűzésemet, áttekintem a felhasznált alapanyagokat, a kísérleti minták összetételét, illetve az alkalmazott vizsgálati módszereket. Végül tárgyalom szakmai munkám kísérleti eredményeit.

3.1. Célkitűzés

Tudományos diákköri dolgozatomban célul tűztem ki olyan kötőanyag kompozíciók előállítását és vizsgálatát, melyek tartalmaznak biokomponenst is, valamint már önmagukban vagy együttesen más módosítószerekkel az alapbitumenhez képest jobb alkalmazástechnikai tulajdonságokat biztosíthatnak. Szakmai munkám során kereskedelmi forgalomban kapható 50/70 fokozatú útépítési alapbitumen minőségjavítási lehetőségeit vizsgáltam. A kísérletek során biomassza eredetű, pirolízisből származó és utólagosan minőségjavított biokomponens módosító hatását vizsgáltam az alapbitumen esetén. Továbbá gumiőrleménnyel, illetve sztirol-butadién-sztirol blokk kopolimerrel (SBS) együttesen alkalmazva is végeztem vizsgálatokat. Az adalékként alkalmazott komponensek különböző minőségi paraméterekre gyakorolt hatását kívántam meghatározni alapvizsgálatok, valamint dinamikus nyíróreométer (DSR) segítségével. Fontos volt annak meghatározása, hogy az adalékolás milyen mértékben változtatja meg a bitumen paramétereit, folyási jellemzőit, a vizsgált biokomponenst milyen koncentrációban lehet bekeverni.

3.2. Felhasznált alapanyagok

A következőkben ismertetem kísérleti munkám alapanyagait, azok kísérleti szempontból releváns tulajdonságait, valamint ahol szükséges, azoknak a szakmai munkához történő előkészítésének folyamatait.

3.2.1. Alapbitumen

A vizsgált bitumenminták alapanyaga kereskedelmi forgalomban beszerezhető 50/70 fokozatú útépítési alapbitumen volt.

3.2.2. Gumibitumen

A gumibitumen minták az előzőekben tárgyalt alapbitumen módosításával készültek, Geiger és munkatársai kutatásai alapján 15 m/m% gumiőrlemény adalékanyag felhasználásával [42].

3.2.3. Polimerrel módosított bitumen

A polimerrel módosított bitumenminták alapanyaga a már bemutatott 50/70 fokozatú útépítési bitumen volt, melynek módosítására kereskedelmi forgalomban elérhető, lineáris sztirol-butadién-sztirolt (SBS) alkalmaztam, 4% koncentrációban.

3.2.4. Bioolaj nehéz maradék

Kísérleti munkám során biokomponensként egy kereskedelmi forgalomban is beszerezhető, fenyőfa gyorspirolíziséből származó (gyártó: BTG-BTL, Hollandia) bioolaj nagyhőmérsékletű minőségjavítása során nyert nehéz terméket (maradékot) alkalmaztam.

A nyers bioolaj sötétbarna, erős szagú; víz, szerves savak, szénhidrátok és szénhidrogének elegye. Kezdő forráspontja 100°C alatti, lobbanáspontja 35°C feletti, de nem képes fenntartani az égést. 150°C felett könnyen polimerizálódik. Mivel a módosított bitumenek esetén a termék gyártása, illetve a termékből történő aszfaltkeverés 180°C körüli érték, így a bioolajat a megfelelő minőség és a biztonságtechnika előírások teljesítése érdekében kezeltük. Emellett az aszfaltkeverés hőfokán illó bioolaj komponensek eltávoznának a kötőanyag-rendszerből, így a bioolaj koncentrációja változna, ami az aszfalt tulajdonságait is módosítaná. A bekeverés előtt a bioolajról 220°C-on végzett desztillációval eltávolítottuk a desztillálható víztartalmat; ekkor a 220°C-ig forró illékony komponensek is eltávoztak. A bioolaj főbb tulajdonságait a **3. táblázat** tartalmazza.

3. táblázat: BTG-BTL pirolízis olaj tulajdonságai [43].

Tulajdonság	Mértékegység	Érték
C	m/m%	46
H	m/m%	7
N	m/m%	<0,01
O	m/m%	47
Víztartalom	m/m%	25
Hamutartalom	m/m%	0,02
Szilárd anyag	m/m%	0,04
Sűrűség	kg/l	1,2

3.3. A kísérleti minták összetétele

A kísérletsorozatomban egyrészt vizsgáltam az alapbitumen biokomponenssel történő módosításának lehetőségét. Emellett ugyanezen biokomponens módosító hatását gumiőrleménnyel, valamint más esetben polimerrel (SBS) módosított bitumen alapanyag esetén is tanulmányoztam. A biokomponens koncentrációja a vizsgált minták esetén rendre 1, 5 és 10 m/m% volt. A továbbiakban a biokomponenst nem tartalmazó mintákra mint referenciákra „ref” rövidítéssel, a bioolaj nehéz maradékra pedig a minták nevében „bio” rövidítéssel hivatkozok. A minták nevében lévő szám pedig a minta m/m%-ban kifejezett biokomponens tartalmára utal. A minták összetételét a **4. táblázatban** foglaltam össze.

4. táblázat: Minták összetétele.

Minta neve	Alapbitumen, m/m%	SBS, m/m%	Gumiőrlemény, m/m%	Biokomponens, m/m%
Bref	100	-	-	-
Bbio01	99	-	-	1
Bbio05	95	-	-	5
Bbio10	90	-	-	10
Gref	85	-	15	-
Gbio01	84	-	15	1
Gbio05	80	-	15	5
Gbio10	75	-	15	10
Pref	96	4	-	-
Pbio01	95	4	-	1
Pbio05	91	4	-	5
Pbio10	86	4	-	10

3.4. Vizsgálati módszerek

3.4.1. Alapvizsgálatok

A minták tulajdonságait először szabványos alapvizsgálatokkal tanulmányoztam. Meghatároztam a minták lágyuláspont, valamint penetráció értékeit öregítés előtt, majd vékony filmes öregítési teszt (RTFOT) után.

- **Lágyuláspont**

A lágyuláspontot gyűrűs-golyós módszerrel határoztam meg Petrotest RKA5 típusú félautomata lágyuláspontmérő berendezéssel az MSZ EN 1427 szabvány szerint. A mérés során egy vízzel töltött főzőpohárba helyeztem az előkészített mintát tartalmazó gyűrűt és erre egy szabványos 3,5 grammos golyót helyeztem. A vízfürdőt 5°C/perc sebességgel fűtöttem 5°C kiindulási hőmérséklettől, majd megmértem azt a hőmérsékletet, amikor a golyó a minta nyúlása következtében megtesz 25 mm távolságot.

- **Penetráció**

A minták penetráció értékét Petrotest PNR12 típusú automata penetrométer segítségével határoztam meg az MSZ EN 1426 szabvány szerint. A vizsgálat során 25°C-ra temperált mintán mértem egy szabványosított 100 grammos tű behatolásának mértékét 5 másodperc alatt.

- **Rolling thin-film oven test (RTFOT)**

Az RTFOT, azaz forgó vékony filmes öregítési teszt folyamatát az MSZ EN 12607-1 szabvány írja le. Az RTFOT az aszfaltkeverés körülményeit modellezi, a vizsgálat során a bitumen minta öregítése hő és levegő segítségével történik. A meghatározott mennyiségű mintát egy hengeres üvegedénybe öntjük, majd ezt egy forgó tartóba helyezzük, mely egy fűthető kemencében helyezkedik el. A kemencében a forgó tartó a mérés közben 85 percen keresztül, 163°C hőmérsékleten 15 RPM sebességgel forog, így a minta az üvegedényben a forgatás hatására vékony film rétegben eloszlik. A mérés során 4000 cm³/min levegőt áramoltatunk az üvegedényeken keresztül. Az öregítés után kapott tömegveszteség értékéből következtetést vonhatunk le az illékony komponens veszteségének mértékéről, mely a bitumen viszkozitásának növekedését vonja maga után.

3.4.2. Reológiai vizsgálatok

A reológiai vizsgálatokat a Pannon Egyetem MOL Ásványolaj- és Széntechnológiai Intézeti Tanszékén rendelkezésre álló Anton Paar MCR301 típusú dinamikus nyíróreométerrel (DSR) végeztem el. Ezek közt szabványos, illetve nem szabványos vizsgálati módszereket is alkalmaztam, mellyel meghatároztam a módosító komponens alkalmazásának hatását a folyási tulajdonságokra.

- **Amplitúdó terhelés-léptetés (amplitude sweep)**

Az amplitúdó terhelés-léptetés vizsgálat során a vizsgált minta lineáris viszkoelasztikus tartományát határoztam meg (LVE tartomány). A mérés során a frekvencia állandó 10 s⁻¹ értékű, az amplitúdó pedig változik. A mérési eredmény a minta szerkezetének erősségéről nyújt információt. Az LVE tartomány azt a tartományt jelenti, ahol a minta szerkezete nem szenved el maradó deformációt. A tartomány felvétele szükséges az oszcillációs mérések előtt a megfelelő paraméterek kiválasztásához. Az amplitúdó terhelés-léptetés vizsgálatot 10 és 60°C-on egyaránt elvégeztem, így kaptam a megfelelő γ (deformáció) értékeket százalékban.

- **Frekvencia terhelés-léptetés (frequency sweep)**

A frekvencia terhelés-léptetés vizsgálatot szintén 10 és 60°C-on végeztem el, 0,01-100 Hz frekvencia tartományban. A két hőmérséklet a hazai éghajlati körülményeknek megfelelő közepes és magas aszfalthőmérsékletet jellemzi. A magas frekvenciatartomány a nagy forgalmi terhelést reprezentálja, amely elsősorban a nagyobb sebességű vagy nagy terheléssel járó forgalmat jellemzi. A kis frekvenciatartomány a kis sebességű forgalmat jelképezi. A mérés a minta komplex modulusának ($|G^*|$) frekvenciafüggéséről ad információt. Ebből a minta fáradási tulajdonságára és repedéssel szembeni ellenálló képességére vonatkozóan vonhatunk le következtetéseket.

- **Ismételt kúszás-relaxáció (MSCR, multiple stress creep recovery)**

Az ismételt kúszás-relaxációs vizsgálat a minták elasztikus, rugalmas tulajdonságáról ad információt. A mérést 60°C-on végeztem el, 10 ciklusban az MSZ EN 16659 szabvány szerint. A vizsgálat során 1 másodpercig 100 N erővel terheltem a mintát, majd ezt egy 9 másodperces relaxációs szakasz követte. A 10. ciklus után a terhelő erőt 3200 N-ra emelve újabb 10 ciklust hajtottam végre. A mérési adatokból számítható a visszaalakulás százalékos értéke. Az eredmények az aszfaltburkolat deformációjáról, a kátyúképződési hajlamról adnak tájékoztatást.

- **Hőmérséklet terhelés-léptetés (temperature sweep)**

A vizsgált minták folyási tulajdonságainak hőmérsékletfüggését 10-70°C hőmérséklettartományban, 1°C/perc fűtési sebességgel 1 Hz állandó frekvencia mellett határoztam meg. A mérés során a komplex modulus, azaz a merevség és a komplex viszkozitás értékének változását követtem nyomon.

3.5. Kísérleti eredmények és értékelés

A következőkben a vizsgált mintákon végzett kísérletek eredményeit és azok értékelését mutatom be, valamint az egyes minták eredményeinek összehasonlítását tárgyalom.

3.5.1. Alapvizsgálatok

A vizsgált minták alaptulajdonságainak mért értékeit öregítés előtt, illetve RTFOT után az **5. táblázat** foglalja össze.

5. táblázat: Minták alaptulajdonságainak vizsgálata RTFOT előtt és után.

	Lágyuláspont (°C)	Penetráció (0,1 mm)	RTFOT	Tömegváltozás (%)	Lágyuláspont (°C)	Penetráció (0,1 mm)
Bref	51,0	56		-0,02	56,9	38
Bbio01	51,1	54		0,006	53,2	41
Bbio05	51,2	53		-0,3	55,1	41
Bbio10	51,4	52		-0,5	56,1	37
Gref	56,3	49		0,06	62,5	43
Gbio01	58,3	45		-0,06	61,2	39
Gbio05	58,8	44		-0,2	61,8	39
Gbio10	59,2	42		-0,4	62,1	38
Pref	72,5	35		0,04	75,1	29
Pbio01	74,1	32		0,01	77,7	31
Pbio05	77,0	31		-0,01	80,1	29
Pbio10	79,7	29		-0,02	82,9	29

A lágyuláspont vizsgálatok eredményeit tekintve megállapítható, hogy minden módosított bitumen (mind a gumiőrleménnyel, mind az SBS polimerrel adalékolt) érteke nagyobb volt. További növekedést tapasztaltam ebben az értékben mind az alapbitumen, mind a gumibitumen (GmB), mind pedig a polimerrel módosított bitumen (PmB) alapú minták esetén a biokomponens alkalmazásával. A növekvő hatás a biokomponens koncentrációjának növelésével tendenciózusan növekedett, a csak biokomponens adalékot tartalmazó minták esetén azonban csak elhanyagolható mértékben. Ebből arra következtettem, hogy a biokomponens és a gumiőrlemény, illetve az SBS adalékanyag együttes alkalmazása felerősítheti egymás lágyuláspont-növelő hatását, szinergia lép fel.

A penetráció vizsgálatok során a lágyuláspont méréshez hasonló tendenciát tapasztaltam. A biokomponens adagolása tovább keményítette a mintát, ezt elsősorban a merevebb, keményebb polimerek bevitele okozhatta.

A vékony filmes öregítési teszt során nyert eredményekből megállapítottam, hogy az öregítés hatására a lágyuláspont valamennyi minta esetén növekedett. Ennek megfelelően a penetráció értéke csökkent valamennyi esetben. Továbbá megállapítottam, hogy a GmB és PmB minták esetén kisebb volt az öregítés hatása a minták tulajdonságaira, köztük a penetráció értékére. Ezen minták esetén a biokomponens tartalom növelésével a minták keményedéssel szembeni ellenállóképessége jelentősen javult, 10 m/m% bioolaj nehéz maradék tartalom esetén nem tapasztaltam változást az öregítetlen mintához képest a penetráció értékét tekintve.

Az így nyert mérési eredményeket összevetettem a Magyarországon jelenleg érvényben lévő útügyi műszaki előírásokkal. A csak biokomponens adalékot tartalmazó minták esetén valamennyi minta teljesítette az 50/70 fokozatú útépítési bitumennel szemben támasztott MSZ EN 12591 szabványban foglalt követelményeket – természetesen csak a vizsgált tulajdonságokra vetítve. Magyarországon a gumibitumenek követelményeit az MSZ 930:2015 szabvány tárgyalja. A GmB alapú minták esetén az 5 és 10 m/m% biokomponens adalékot tartalmazó minták penetráció értékei kevéssel az előírt érték alatt maradtak (45-80 0,1 mm), a lágyuláspont és a keményedéssel szembeni ellenállóképesség tekintetében azonban valamennyi GmB alapú minta teljesítette a követelményeket. A polimerrel modifikált bitumenek követelményeit az MSZ EN 14023 szabvány foglalja magában. Magyarországon a két legnagyobb mennyiségben használt PmB (10/40-65, 25/55-65) kötelezően előírt minőségi paramétereivel vetettem össze a PmB alapú minták mérési eredményeit. Megállapítottam, hogy valamennyi PmB alapú minta teljesítette ezen követelményeket.

3.5.2. Reológiai vizsgálatok

A következőkben a mintákon végzett reológiai vizsgálatok eredményeit és azok értékelését mutatom be.

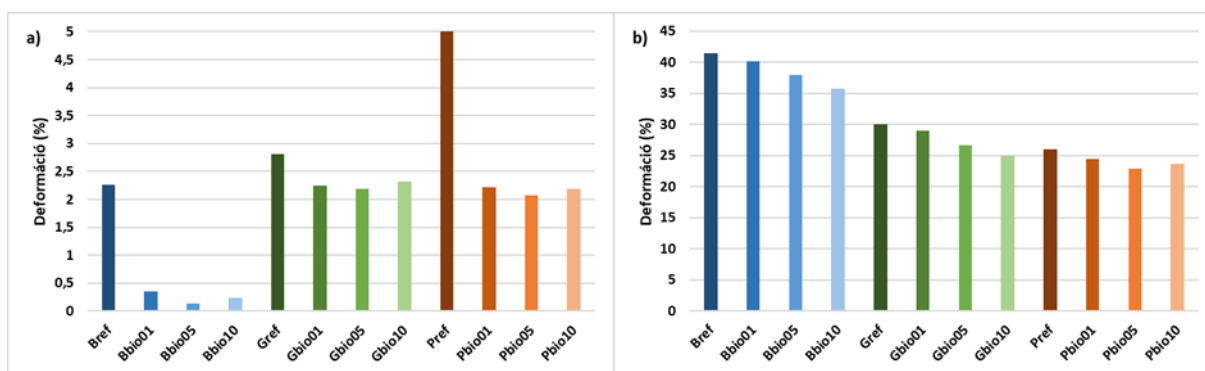
- **Amplitúdó terhelés-léptetés (amplitude sweep)**

Az amplitúdó terhelés-léptetés mérés eredményeiből megállapítottam, hogy közepes aszfalthőmérsékleten (10°C) mind a gumiörleménnyel, mind az SBS polimerrel módosított minták esetén növekedett az elérhető deformáció értéke, azaz szélesedett a lineáris viszkoelasztikus (LVE) tartomány. Ez a kiugró érték azonban a PmB alapú minták esetén a biokomponens adalékolásával mérséklődött. A biokomponens hozzáadása valamennyi esetben szűkítette az LVE tartományt, azaz a merev komponens bevitelével a deformációnak

kevésbé ellenálló, merevebb szerkezeti anyag jött létre. A csökkenés mértéke a biokomponenssel módosított alapbitumen esetén jelentős volt, míg a GmB, illetve a PmB alapú, biokomponens adalékot is tartalmazó minták esetén ez kevésbé volt számottevő és a koncentráció növelése sem volt szignifikáns hatással ezen tulajdonságra. Azaz ebben az esetekben a bitumen mátrix kedvezően tudta ellensúlyozni a bioadalék hatását.

A 60°C-on végzett vizsgálatok kisebb mértékű elérhető deformáció értéket tapasztaltam. A GmB és PmB alapú minták esetén azonban – hasonlóan a 10°C-on végzett mérések eredményeihez – nem tapasztaltam jelentős csökkenést a biokomponens koncentrációjának növelésével.

A minták amplitúdó terhelés-léptetés vizsgálatának eredményeit az **1. ábra** mutatja be.



1. ábra: Minták LVE tartománya - a) 10°C-on, b) 60°C-on.

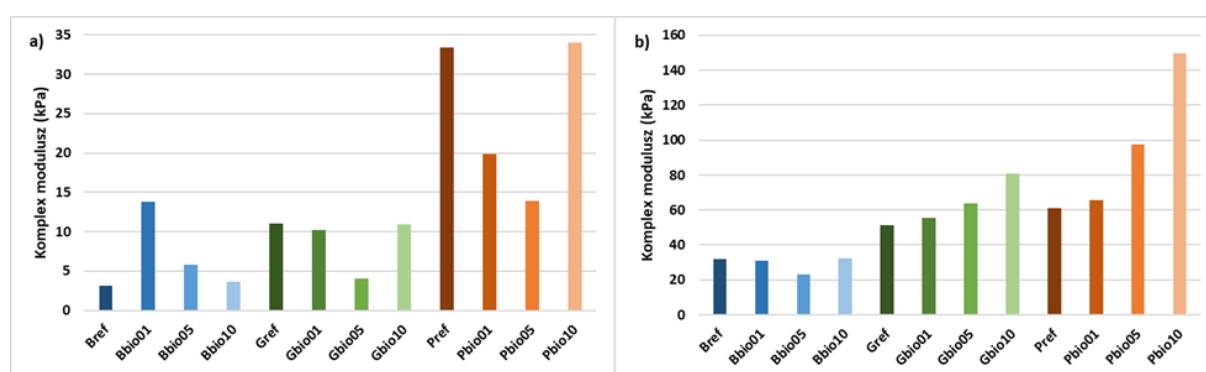
- Frekvencia terhelés-léptetés (frequency sweep)**

A frekvencia terhelés-léptetés vizsgálatok eredményeiből 10°C-on a 25 Hz, 60°C-on a 30 Hz vizsgáló frekvenciához tartozó értékeket ábrázoltam és értékeltem. A frekvencia terhelés-léptetés vizsgálat eredményeit a **2. ábra** mutatja be.

Megállapítottam, hogy 10°C-on valamennyi módosított kompozíció esetén (Gref és Pref) előnyösen nagyobb volta komplex modulusz ($|G^*|$), azaz a merevség értékét a referencia alapbitumen mintához (Bref jelű) képest. A csak biokomponens adalékot tartalmazó minták esetén az adalék koncentrációjának növelésével azonban a kezdeti növekedés után, csökkent a $|G^*|$ értéke, a Bbio10 jelű minta (10 m/m%) esetén már a referenciával megegyező értéket mértem. A GmB és a PmB alapú minták esetén azonos viselkedést figyeltem meg, a biokomponens adalékolásával kis koncentrációban – Gbio05 és Pbio05 jelű mintákig (5 m/m%) – csökkent a merevség, azonban ezzel összhangban a fáradási tulajdonság javult. A biokomponenst legnagyobb koncentrációban tartalmazó Gbio10 és Pbio10 jelű minták (10 m/m%) merevség értéke már megfelel a referencia gumibitumen és polimerrel módosított

bitumen minták (Gref és Pref jelű) értékeinek, így az aszfaltmerektség is megfelelő lehet 10 m/m% biokomponens koncentráció esetén. Ez a következtetés a Bbio10 jelű minta (10 m/m%) esetén is elmondható. Azonban ezt a nem tendenciózus változást a későbbiekben további vizsgálatokkal szükséges tanulmányozni, a hatás mélyebb megértésének érdekében.

A magas aszfalthőmérsékletnek megfelelő 60°C-on végzett vizsgálatokból megállapítottam, hogy a komplex modulusz értékét a gumiőrlemény és az SBS adalékolása is kedvezően növelte, utóbbi adalék nagyobb mértékben. A csak biokomponens adalékot tartalmazó minták esetén nem tapasztaltam jelentős változást a referencia mintához képest, elhanyagolható volt az adalék tulajdonságmódosító hatása. A GmB és PmB alapú minták esetén a biokomponens koncentrációjának növelésével tendenciózusan növekvő merevség értéket figyeltem meg. A Pbio10 jelű minta (10 m/m%) esetén szignifikánsan nőtt a komplex modulusz értéke a referencia polimerrel módosított bitumen mintához képest, így az aszfaltmerektség is jelentős mértékben nő.



2. ábra: Komplex modulusz frekvenciafüggése – a) 10°C, 25 Hz frekvencia, b) 60°C, 30 Hz frekvencia.

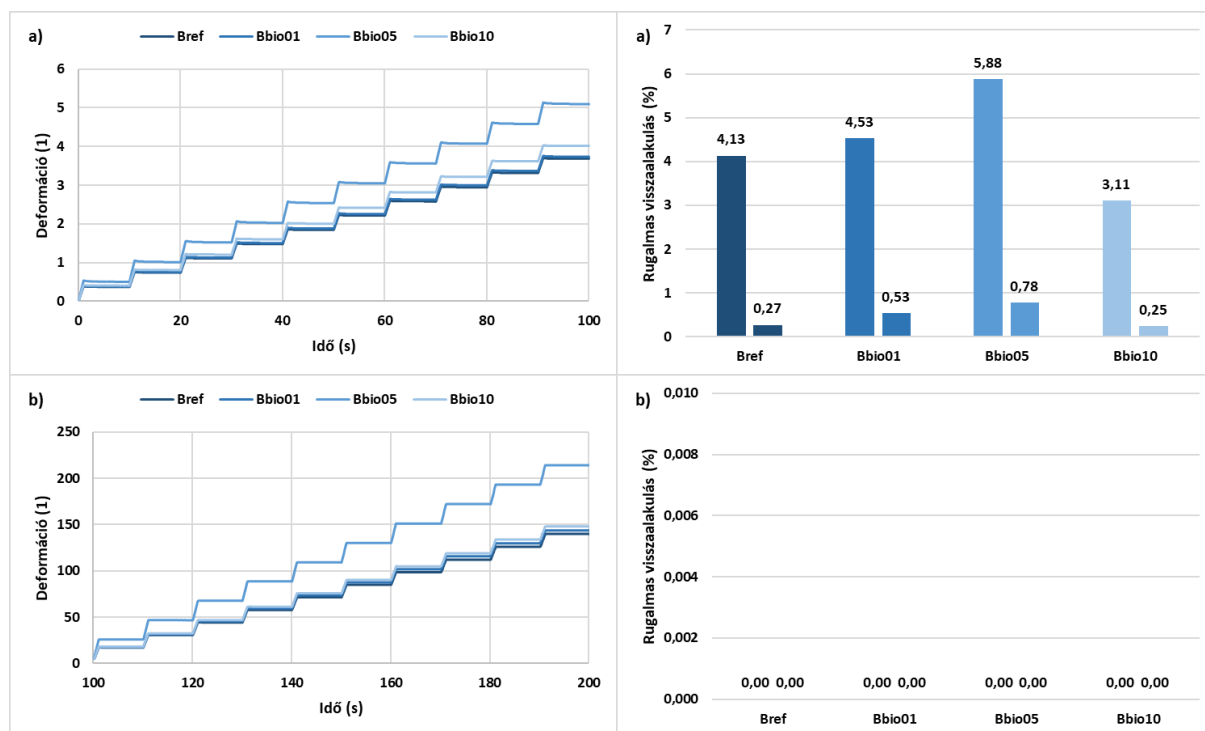
- **Ismételt kúszás-relaxáció (MSCR, multiple stress creep recovery)**

Az adalékok a kompozíció deformációval szembeni ellenállására és rugalmasságára, rugalmas visszaalakulására gyakorolt hatását az ismételt kúszás-relaxáció vizsgálattal határoztam meg. A következőkben előbb az alapbitumen, a GmB és a PmB alapú mintákat külön-külön tárgyalom, végül összevetem a kapott értékeket valamennyi minta esetén.

A csak biokomponens adalékot tartalmazó minták esetén megállapítottam, hogy a kisebb adalékkoncentrációk esetén (1 és 5 m/m%) a biokomponens előnyösen befolyásolta a rugalmas tulajdonságot. Kis terhelő erő (100 N) esetén, növekedett a minták rugalmas visszaalakulásának értéke. A Bbio10 jelű minta (10 m/m%) esetén azonban csökkent a rugalmas visszaalakulás a referencia mintához (Bref jelű) képest, azaz a kisebb szerkezeti

erősségű – melyre az amplitúdó terhelés-léptetés vizsgálat során is lehetett következtetni – biokomponens adalék nagyobb mennyiségben történő bekeverésével növekedett a minta deformációra való érzékenysége. Azaz ebben az esetben már a merevebb szerkezetű biokomponens hatása lehetett a domináns. Az MSCR vizsgálat szabványának megfelelően, nagyobb terhelő erő, 3200 N esetén is elvégeztem a vizsgálatot 10 mérési ciklust lefolytatva. 3200 N mellett a maximális deformáció értéke valamennyi minta esetén növekedett, azaz az alapbitument kedvezőtlenül befolyásolta a biokomponens adalék. A minták rugalmas visszaalakulása elhanyagolhatóan csekély volt, a minták rugalmas tulajdonsága gyakorlatilag megszűnt az adott vizsgálati körülmények között, teljesen a viszkózus karakter dominált.

A biokomponens adalékot tartalmazó alapbitumen minták MSCR vizsgálatának eredményeit a **3. ábra** mutatja be. A mérés 10 ciklusában elvégzett, egymást követő terheléses és relaxációs szakaszait a bal oldali diagramokon, a rugalmas visszaalakulás százalékos értékeit az 1. és a 10. ciklus végén pedig a jobb oldali diagramokon ábrázoltam.

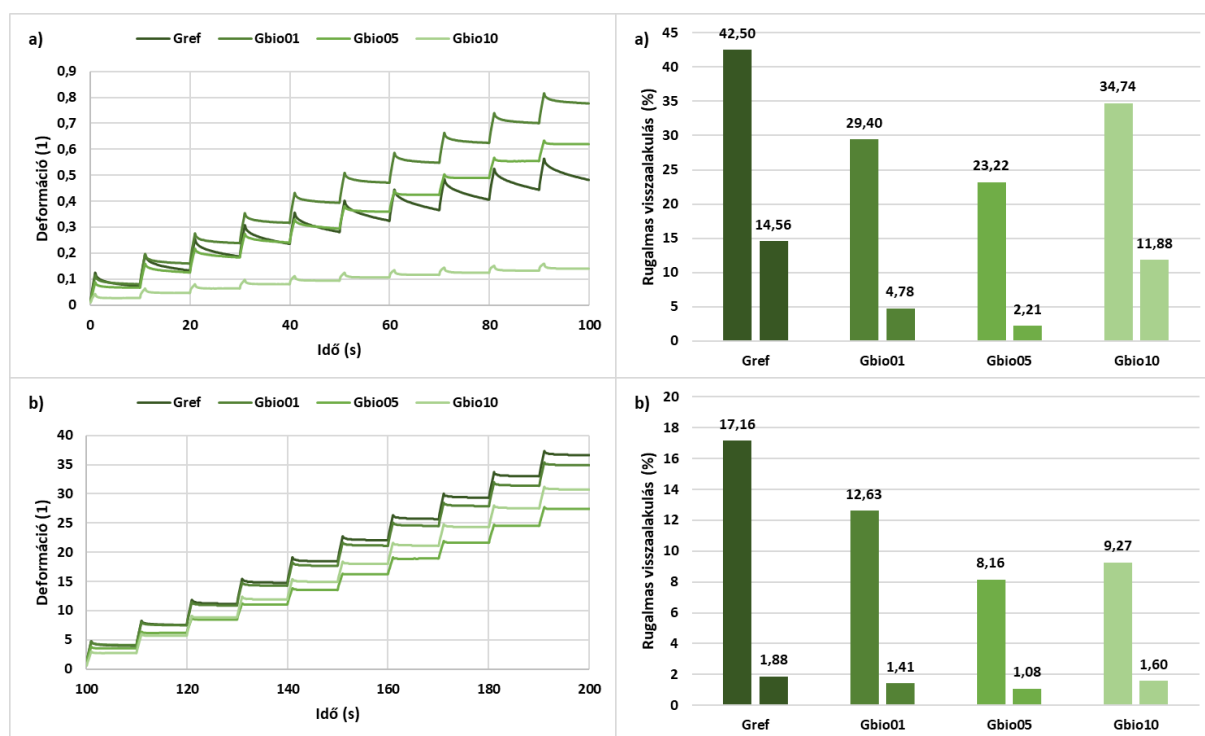


3. ábra: A biokomponenst tartalmazó alapbitumen minták 60°C-on végzett MSCR vizsgálatának eredményei - a) 100 N, b) 3200 N terhelő erő esetén.

A GmB alapú minták 100 N terhelő erő mellett végzett vizsgálata esetén megállapítottam, hogy a maximális deformáció kezdetben növekedett a biokomponens adalékolásával, azonban az adalék koncentrációjának növelésével csökkenő tendenciát figyeltem meg. A GBio10 jelű minta (10 m/m%) esetén már a referencia Gref jelű mintánál

kisebb maximális deformáció értéket mértem, kedvezően javult ennek értéke. Feltételeztem, hogy ebben az esetben a nagyobb merevséget biztosító adalék kedvező hatással bírt ezen tulajdonságra. A rugalmas visszaalakulás valamennyi minta esetén csökkent, azonban a GBio10 jelű minta esetén kisebb mértékben. A 3200 N terhelő erő mellett végzett vizsgálatok eredményeiből megállapítottam, hogy a maximális deformáció értéke valamennyi esetben kedvezően csökkent, azonban a rugalmas visszaalakulás százalékos értéke is csökkent a merev szerkezetű biokomponens adalékolásával.

A GmB alapú minták MSCR vizsgálatának eredményeit a **4. ábra** mutatja be.



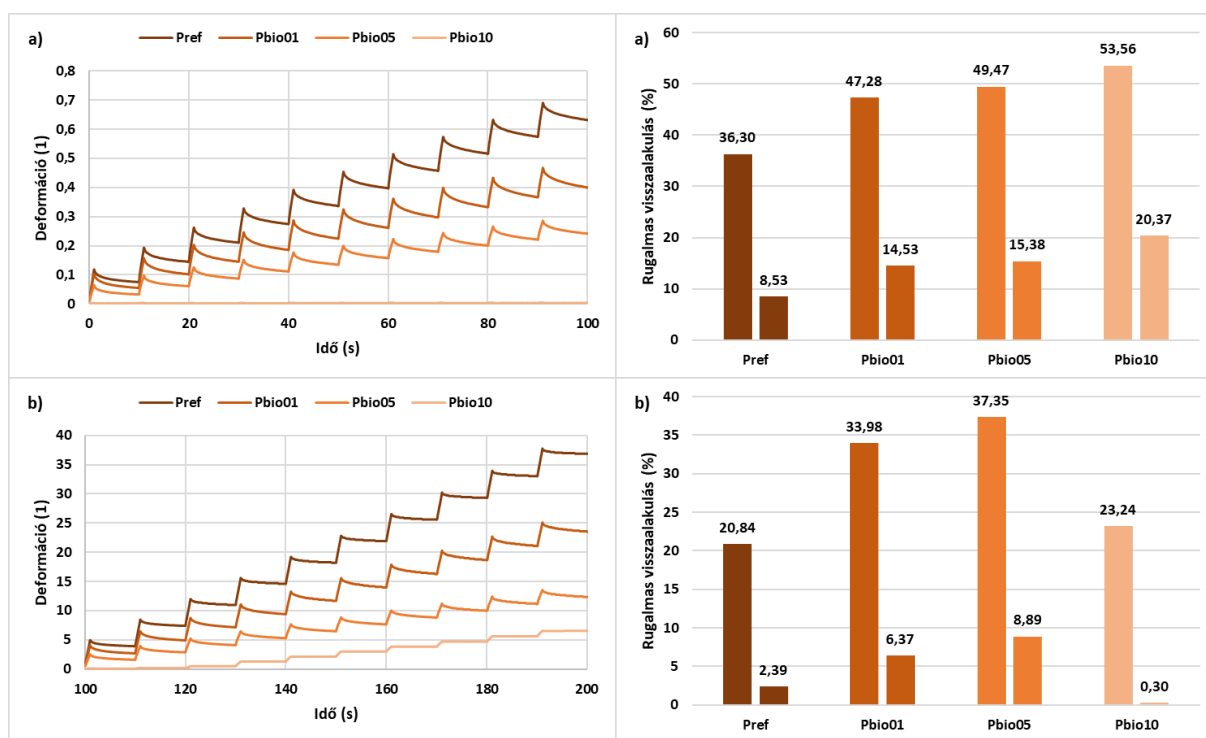
4. ábra: A GmB alapú minták 60°C-on végzett MSCR vizsgálatának eredményei - a) 100 N, b) 3200 N terhelő erő esetén.

A PmB alapú minták 100 N terhelő erő mellett végzett vizsgálatának eredményeiből megállapítottam, hogy a biokomponens adalék valamennyi esetben kedvezően befolyásolta a rugalmas tulajdonságot. Csökkent a maximális deformáció értéke az adalékolás hatására, a rugalmas visszaalakulás pedig ezzel összhangban növekedett, ezek következtében a minták kedvezőbb nyomvályú képződéssel szembeni ellenállóképességgel rendelkeztek. Az adalékolás koncentrációjának növelésével növekedett a kedvező tulajdonságmódosító hatás is. Nagyobb terhelő erő esetén hasonló tendencia figyelhető meg, azzal a kiegészítéssel, hogy a rugalmas visszaalakulás százalékos értéke csökkent a Pbio10 jelű minta (10 m/m%) esetén a

többi biokomponens adalékot tartalmazó mintához képest, azonban még ennél a mintánál is kedvező, a referencia Pref jelű mintával közel megegyező értéket mértem.

A PmB alapú minták kedvező értékei azzal magyarázhatók, hogy a biokomponens adalék nem befolyásolta a PmB mátrix rugalmasságát, míg merev szerkezetével – ismét visszautalva az amplitúdó terhelés-léptetés vizsgálat során a biokomponenssel kapcsolatos tapasztalatokra – csökkentette a deformációra való hajlamot.

A PmB alapú minták 60°C-on végzett MSCR vizsgálatának eredményeit az **5. ábra** mutatja be.



5. ábra: A PmB alapú minták 60°C-on végzett MSCR vizsgálatának eredményei - a) 100 N, b) 3200 N terhelő erő esetén.

Valamennyi minta mért értékeit összevetve megállapítottam, hogy a gumiörleménnyel és az SBS polimerrel módosított minták rugalmas tulajdonsága jelentősen kedvezőbb az alapbitumen mintához képest. A napjainkban megnövekedett igényű műszaki gyakorlatnak megfelelő, alacsony nyomvályú képződési hajlammal rendelkező kötőanyag kompozíció létrehozásához feltétlenül szükséges az adalékolás. A mérési eredményekből arra következtettem, hogy a biokomponens adalék önmagában nem nyújt megoldást erre a problémára, azonban gumiörleménnyel vagy SBS polimerrel együttesen alkalmazva kedvező adalékanyag lehet.

- **Hőmérséklet terhelés-léptetés (temperature sweep)**

A hőmérséklet terhelés-léptetés vizsgálat során a komplex modulusz, valamint a komplex viszkozitás hőmérsékletfüggését követtem nyomon. A komplex modulusz hőmérsékletfüggését a **6. ábra** mutatja be.

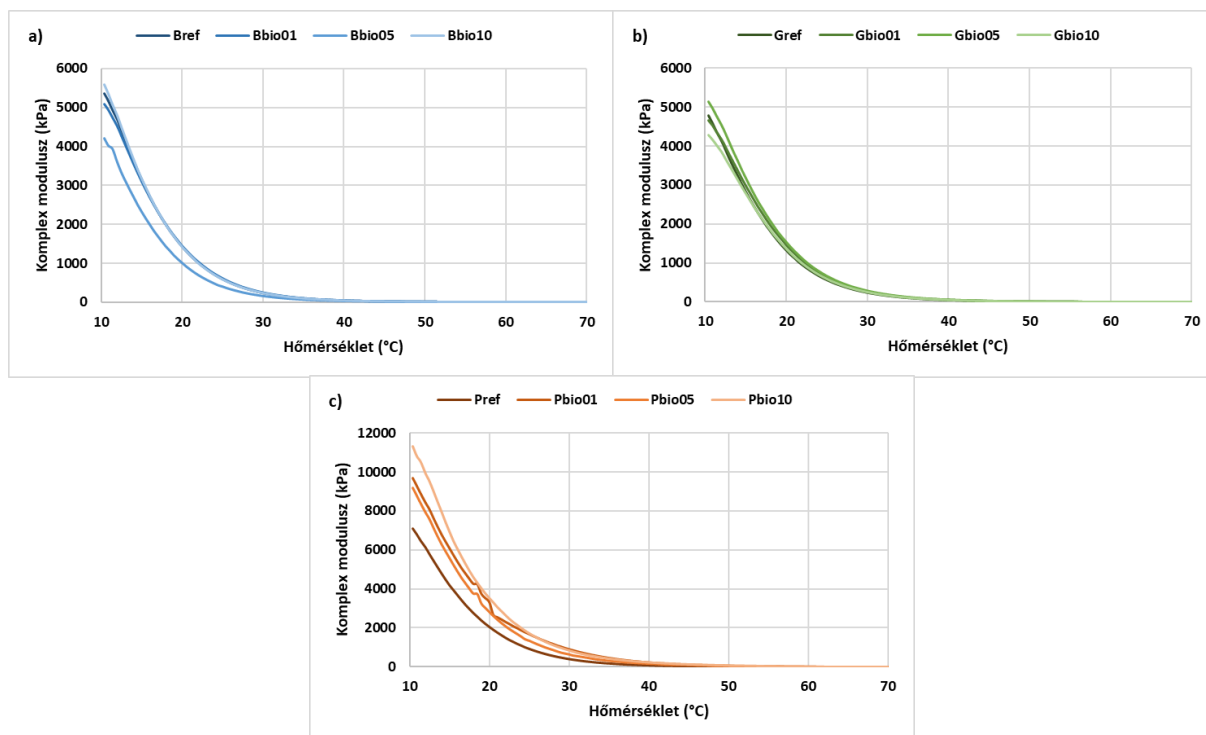
A mért adatokat elemezve megállapítottam, hogy a csak biokomponens adalékot tartalmazó alapbitumen minták esetén a referencia Bref jelű mintához képest a Bbio05 jelű mintáig (5 m/m%) csökkent a komplex modulusz értéke. A 10 m/m% biokomponens adalékot tartalmazó Bbio10 jelű minta esetén azonban már a referencia mintával közel megegyező $|G^*|$ értékeket mértem.

A Gref jelű minta komplex moduluszának értéke alacsonyabb hőmérsékleti intervallumban elmaradt az alapbitumenhez képest (Bref jelű minta) mintegy 28°C-ig, magasabb hőmérsékleti tartományban azonban növekedett a merevség értéke a gumiőrlemény adalékolásának hatására. A GmB alapú minták $|G^*|$ értéke kisebb biokomponens tartalom esetén kis mértékben növekedett a referencia Gref jelű mintához képest, így kedvezőbb lehet az aszfaltmerevség. A Gbio10 jelű minta (10 m/m%) esetén alacsony hőmérsékleti tartományban mintegy 17°C-ig csökkent a merevség értéke, ezt követően azonban ennél a mintánál is növekedést tapasztaltam a referencia mintához képest.

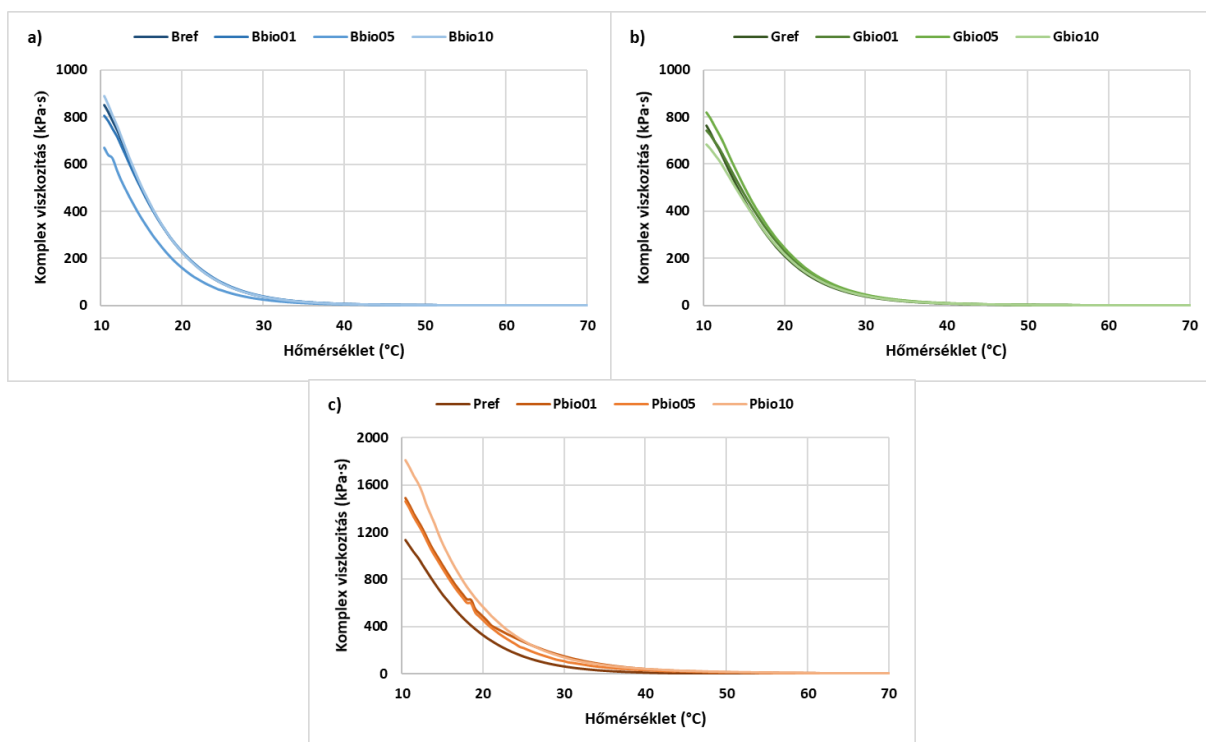
A PmB alapú minták eredményeit tekintve megállapítottam, hogy valamennyi minta esetén növekedett a komplex modulusz az alapbitumenhez képest. A biokomponens adalék koncentrációjának növelésével a merevség értéke tovább növekedett, melynek következtében az aszfaltmerevség ezen kompozíciók esetén is kedvező lehet.

A mérések során a komplex viszkozitás hőmérsékletfüggését is nyomon követtem. Ezen mérések eredményeképpen a komplex modulusz hőmérsékletfüggéséhez hasonló tendenciát figyeltem meg. A mérési eredményeket a **7. ábra** mutatja be.

Az eredményeket tekintve megállapítható, hogy biokomponens adalékolása során megfigyelhető tendencia azonos volt a komplex modulusz hőmérsékletfüggésénél leírtakkal. A PmB alapú minták esetén a komplex viszkozitás jelentősen nőtt az alapbitumenhez képest a polimerrel, illetve biokomponenssel történő adalékolás hatására, a biokomponens koncentrációjának növelésével pedig tovább növekedett.



6. ábra: Komplex modulusz hőmérsékletfüggése - a) csak biokomponenst tartalmazó alapbitumen minták esetén, b) GmB alapú minták esetén, c) PmB alapú minták esetén.



7. ábra: Komplex viszkozitás hőmérsékletfüggése - a) csak biokomponenst tartalmazó alapbitumen minták esetén, b) GmB alapú minták esetén, c) PmB alapú minták esetén.

4. Összefoglalás

A kőolajból származó bitumenek részleges helyettesítésére az egyik hosszú távú megoldás lehet a nem fosszilis eredetű alternatív alapanyagok használata, mely hozzájárulhat a fenntartható fejlődéshez. Az utóbbi időben több kutató vizsgálta különböző eredetű pirolízis olajok felhasználhatóságát bitumen elegyek adalékanyagaként. Úgy találták, hogy megfelelő minőségjavítási lépések után kedvező lehet a felhasználásuk, mivel javíthatják a bitumenes kötőanyagok deformációval szembeni ellenálló képességét.

A környezetvédelmi törekvések mellett figyelmet kell fordítani a napjainkban nagymértékben fokozódó útügyi műszaki követelményekre, melyek következtében a nagyobb forgalmi terhelhetőségű, hosszabb élettartamú aszfaltok kifejlesztése intenzíven kutatott területté vált. Ezen követelményeket nagyobb teljesítményű kötőanyagok kifejlesztésével lehet elérni, ilyen kötőanyag kompozíciók például a különböző polimerekkel modifikált bitumenek, valamint a gumibitumen.

Szakmai munkám során 50/70 penetráció fokozatú útépítési alapbitumenben, 4 m/m% lineáris SBS-tartalmú modifikált bitumenben, valamint gumibitumenben alkalmaztam adalékként fa pirolíziséből származó kezelt bioolaj nehéz maradékot, 1, 5, illetve 10 m/m%-os koncentrációban. Célom volt a komponensek bitumenre gyakorolt tulajdonságmódosító hatásának vizsgálata hagyományos alapvizsgálatok, valamint reológiai mérések segítségével.

Az alaptulajdonságokat tekintve, a lágyuláspontot a gumiőrlemény, az SBS polimer, illetve a biokomponens egyaránt növelte, két adalék együttes alkalmazása esetén szinergikus hatást is tapasztaltam. Ezzel összhangban a penetráció értékek valamennyi adalék hatására csökkentek, keményedtek a minták. Az öregítés utáni eredményekből megállapítottam, hogy a gumibitumen és a polimerrel modifikált bitumen alapú minták esetén a biokomponens javította a keményedéssel szembeni ellenálló képességet. Két minta kivételével (5 és 10 m/m% biokomponens adalékot tartalmazó gumibitumen minták) valamennyi teljesítette a Magyarországon jelenleg érvényben lévő útügyi műszaki előírásokat.

Megállapítottam, hogy a lineáris viszkoelasztikus tartományt a bioolaj nehéz maradék valamennyi esetben szűkítette, a merev komponens bevitelével a deformációnak kevésbé ellenálló, merevebb szerkezeti anyag jött létre. A biokomponens gumiőrleménnyel vagy SBS polimerrel történő együttes alkalmazásával azonban ez a hatás elhanyagolható mértékű volt.

A frekvenciafüggést vizsgálva közepes aszfalt hőmérsékleten (10°C) megállapítottam, hogy a biokomponens kis koncentrációkban tartalmazó minták esetén csökkent a komplex modulusz, azaz a merevség, azonban ezzel együtt a fáradási tulajdonság javult. A 10 m/m% biokomponens adalékot tartalmazó mintáknál az adott referencia bitumennel megegyező értékeket mértem. A 60°C-on végzett vizsgálat során valamennyi mintánál növekedést figyeltem meg a merevség értékében a biokomponens koncentrációjának növelésével, így összességében megállapítottam, hogy az aszfaltmerevség kedvező lehet.

A rugalmas tulajdonságokat tekintve, a bioolaj nehéz maradék önmagában történő adagolása nem elegendő az 50/70 fokozatú alapbitumen rugalmas tulajdonságainak javításához, azonban mind gumiőrleménnyel, mind pedig SBS polimerrel együttesen megfelelő nyomvályú képződéssel szembeni ellenállóképességű kompozíciót kaphatunk.

A hőmérsékletfüggést vizsgálva megállapítottam, hogy magasabb hőmérsékleti tartományban a két adalékot együttesen tartalmazó minták esetén növekedett a komplex modulusz értéke a referencia mintához képest, a polimerrel modifikált bitumen alapú minták esetén jelentősebb mértékben.

A célkitűzésnek megfelelően elmondható, hogy ezen mérési eredmények alapján a bioolaj nehéz maradék 10 m/m%-ban hozzákeverhető lehet az általam vizsgált bitumenekhez. Nem hanyagolható el a tény, hogy gazdasági és környezetvédelmi szempontból tekintve a hulladék gumiabroncsokból előállítható gumiőrlemény hasznosítása a kedvezményezett más polimer módosítószerrel szemben. A műszaki és gazdasági tekintetben legjobb kötőanyag kompozíció pontos és hiteles megállapításához további ellenőrző tesztek elvégzése szükséges, köztük a stabilitás vizsgálat is. Emellett meg kell vizsgálni a biokomponens beadagolásának és a biokomponens előkezelésének további módjait, mely lehetővé teheti jobb mechanikai tulajdonságú kötőanyag, esetlegesen nagyobb biokomponens részaránnyal, történő előállítását. További vizsgálatok szükségesek a kőolajból, polimerből, gumiőrleményből, valamint biomasszából előállított komplex rendszerek tudományos-gazdaságossági összefüggéseinek mélyebb feltárásához is.

Irodalomjegyzék

- [1] Read, J., & Whiteoak, D. (2003). The shell bitumen handbook. Thomas Telford.
- [2] Geiger, A., Holló, A., & Fehér, P. (2012). MOL Rubber bitumen–Part 1. *MOL Group Scientific Magazine*, 2012/2, 54-61.
- [3] Holló, A., Geiger, A., & Gergó, P. (2017). Upgrading options of heavy residues, rubber modified bitumen case study. *Fuels and Lubricants*, 1(1), 18-23.
- [4] Yang, X., You, Z., Dai, Q., & Mills-Beale, J. (2014). Mechanical-performance of asphalt mixtures modified by bio-oils derived from waste wood resources. *Construction and Building Materials*, 51, 424-431.
- [5] Chailleux, E., Audo, M., Bujoli, B., Queffelec, C., Legrand, J., & Lepine, O. (2012). Alternative Binder from microalgae: Algoroute project. *Workshop alternative binders for sustainable asphalt pavements*, 7-14.
- [6] Fini, E. H., Kalberer, E. W., & Shahbazi, A. (2011). Biobinder from swine manure: Sustainable alternative for asphalt binder. *Transportation Research Board 90th Annual Meeting, Washington, DC*. (No. 11-3453)
- [7] Mills-Beale, J., You, Z., Fini, E., Zada, B., Lee, C. H., & Yap, Y. K. (2012). Aging influence on rheology properties of petroleum-based asphalt modified with biobinder. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 26(2), 358-366.
- [8] Raouf, M. A., & Williams, R. C. (2010). Rheology of fractionated cornstover bio-oil as a pavement material. *International Journal of Pavements*, 9, 58-69.
- [9] Hill, D. R., & Jennings, A. A. (2011). Bioasphalt from Urban Yard Waste Carbonization. *A Student Study for the Ohio Department of Transportation Office of Research and Development* (State Job Number 134464)
- [10] Uzun, B. B., Apaydin-Varol, E., Ateş, F., Özbay, N., & Pütün, A. E. (2010). Synthetic fuel production from tea waste: characterisation of bio-oil and bio-char. *Fuel*, 89(1), 176-184.
- [11] Chaiya, C. (2011). Production of bio-oil from coffee residue using pyrolysis process. *Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science* (Vol. 2.), 19-21.
- [12] Onay, O., & Koçkar, O. M. (2006). Pyrolysis of rapeseed in a free fall reactor for production of bio-oil. *Fuel*, 85(12), 1921-1928.
- [13] Şensöz, S., & Kaynar, İ. (2006). Bio-oil production from soybean (*Glycine max* L.); fuel properties of Bio-oil. *Industrial Crops and Products*, 23(1), 99-105.

- [14] Európai Parlament & Európai Tanács. (2009). Irányelvek – Az Európai Parlament és a Tanács 2009/28/EK irányelve. *Az Európai Unió Hivatalos Lapja*
- [15] The International Council on Clean Transportation. (2018) Final recast renewable energy directive for 2021-2030 in the European Union. *ICCT Policy Update*
- [16] Giavarini, C. (1984). Visbreaker and straight-run bitumens. *Fuel*, 63(11), 1515-1517.
- [17] Dinkov, R. K., Kirilov, K., Stratiev, D. S., Sharafutdinov, I. M., Dobrev, D., Nguyen-Hong, D., ... & Yordanov, D. I. (2018). Feasibility of bitumen production from unconverted vacuum tower bottom from H-Oil ebullated bed residue hydrocracking. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(6), 2003-2013.
- [18] MOL Magyarország, Bitumenek.
<https://mol.hu/hu/vallalati-ugyfelek/bitumenek/> (megtekintve: 2018.03.01.)
- [19] Pyshyev, S., Gunka, V., Grytsenko, Y. & Bratychak M. (2016). Polymer modified bitumen: review. *Chemical Technology*, 10, No. 4(s)
- [20] Yildirim, Y. (2007). Polymer modified asphalt binders. *Construction and Building Materials*, 21(1), 66-72.
- [21] DuPont, Elvaloy® RET Asphalt Modifier.
<http://www.dupont.com/products-and-services/plastics-polymers-resins/ethylene-copolymers/brands/elvaloy-ethylene-copolymer-resins/products/elvaloy-ret-polymer-modified-asphalt-resin.html> (megtekintve: 2018.10.21.)
- [22] Zhu, J., Birgisson, B., & Kringos, N. (2014). Polymer modification of bitumen: Advances and challenges. *European Polymer Journal*, 54, 18-38.
- [23] Bulatović, V. O., Rek, V., & Marković, K. J. (2012). Polymer modified bitumen. *Materials research innovations*, 16(1), 1-6.
- [24] Airey, G. D. (2003). Rheological properties of styrene butadiene styrene polymer modified road bitumens. *Fuel*, 82(14), 1709-1719.
- [25] Presti, D. L. (2013). Recycled tyre rubber modified bitumens for road asphalt mixtures: a literature review. *Construction and Building Materials*, 49, 863-881.
- [26] Gawel, I., Piłat, J., Radziszewski, P., Kowalski, K. J., & Król, J. B. (2011). Rubber modified bitumen. *Polymer modified bitumen*, 72-97.
- [27] Geiger, A., Gáspár, L., Holló, A., Péter, M., Durgó, R., Csőke, Cs. & Czibor, S. (2014). MOL Rubber bitumen–Part 2. *MOL Group Scientific Magazine*, 2014/2, 74-83.

- [28] Mashaan, N. S., & Karim, M. R. (2013). Investigating the rheological properties of crumb rubber modified bitumen and its correlation with temperature susceptibility. *Materials Research*, 16(1), 116-127.
- [29] Kök, B. V., & Çolak, H. (2011). Laboratory comparison of the crumb-rubber and SBS modified bitumen and hot mix asphalt. *Construction and Building Materials*, 25(8), 3204-3212.
- [30] Bridgwater, A. V. (2012). Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and bioenergy*, 38, 68-94.
- [31] Patwardhan, P. R. (2010). Understanding the product distribution from biomass fast pyrolysis. *Iowa State University*
- [32] Graça, I., Lopes, J. M., Cerqueira, H. S., & Ribeiro, M. F. (2012). Bio-oils upgrading for second generation biofuels. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(1), 275-287.
- [33] Hossain, A. K., & Davies, P. A. (2013). Pyrolysis liquids and gases as alternative fuels in internal combustion engines—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 165-189.
- [34] Papari, S., & Hawboldt, K. (2015). A review on the pyrolysis of woody biomass to bio-oil: Focus on kinetic models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 1580-1595.
- [35] Williams, R. C., Satrio, J., Rover, M., Brown, R. C., & Teng, S. (2009). Utilization of fractionated bio oil in asphalt. *Transportation Research Board 88th Annual Meeting, Washington, DC*. (No. 09-3187)
- [36] Vignesh, H., Ramesh, B. N. G., Manivasagan, V., Suganya, S., & Eajas, B. M. (2013). Emerging trends in greener pavements. *International Journal of Engineering Research & Technology* (Vol. 2. Issue 2.)
- [37] Metwally, M., Raouf, M. A., & Williams, R. C. (2010). Development of non-petroleum based binders for use in flexible pavements. *InTrans Project Reports, Paper 17*.
- [38] Yang, X., & You, Z. (2015). High temperature performance evaluation of bio-oil modified asphalt binders using the DSR and MSCR tests. *Construction and Building Materials*, 76, 380-387.
- [39] Zabelkin, S., Grachev, A., Fayzrakhmanova, G., Makarov, A., & Bashkirov, V. (2016). Application of the water-insoluble pyrolysis oil fraction as an organic binder. *Construction and Building Materials*, 102, 59-64.

- [40] Sun, Z., Yi, J., Huang, Y., Feng, D., & Guo, C. (2016). Properties of asphalt binder modified by bio-oil derived from waste cooking oil. *Construction and Building Materials*, 102, 496-504.
- [41] Su, N., Xiao, F., Wang, J., Cong, L., & Amirkhanian, S. (2018). Productions and applications of bio-asphalts—A review. *Construction and Building Materials*, 183, 578-591.
- [42] Geiger, A., Holló, A., Thernesz, A., Durgó, R., Czibor, S., Bartha, L., & Gergó, P. (2012) Chemically Stabilized Rubber Bitumen. *5th Eurasphalt & Eurobitume Congress, Istanbul*, 1-8.
- [43] BTG-BTL, Pyrolysis oil properties.
<http://www.btg-btl.com/en/applications/oilproperties/> (megtekintve: 2018.02.20.)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Holló András tanszékvezető egyetemi docensnek a tudományos diákköri munka elkészítése során nyújtott támogatásért, a szakmai hitelesség biztosításáért és nem utolsósorban a jelentős mennyiségű időért, melyet munkám létrejöttére fordított.

Külön szeretném megköszönni konzulensemnek, Gergő Péter tanszéki mérnöknek a kísérletek elvégzése során nyújtott rendkívül sok segítséget, a dolgozat megírásához szükséges elméleti és gyakorlati alapok biztosítását, és hogy kérdés esetén mindig fordulhattam hozzá.

Köszönöm a MOL Nyrt. dolgozóinak a minták és egyes vizsgálatok biztosítását.



EMBERI ERŐFORRÁSOK
MINISZTERIUMA

A TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT AZ EMBERI ERŐFORRÁSOK MINISZTERIUMA
ÚNKP-18-2 KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2018**



**Bicikli-ABS működésének vizsgálata és fékteljesítményének
mérése saját tervezésű tesztpadon**

Készítette: Viola Gergely

Témavezető: Dr. Fodor Dénes

Mérnöki Kar, Gépészmérnöki Intézet, Járműmechatronika Intézeti
Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Motiváció.....	355
2. A fékezés matematikai leírása	356
2.1. A fékezés során ható erők számítása	356
3. A tervezés lépéseinek bemutatása	362
3.1. Az ékfék mechanizmus működésének ismertetése.....	362
3.2. A koncepció kialakítása.....	363
3.3. A berendezés felépítése	364
3.4. A lánckerekes áttételek számítása	365
3.5. Az áttétel felépítése, működése	365
3.6. A mérőeszköz elektromos rendszere	367
4. A működéshez szükséges szoftverek.....	368
4.1. A mikrokontrolleren futó program	369
4.2. A LabVIEW program bemutatása	369
5. A megépítés lépéseinek bemutatása.....	372
5.1. A váz és a hajtómű elkészítése	372
5.2. Összeszerelés és festés.....	373
6. A berendezés kalibrációja.....	375
6.1. A mérőcella kalibrációjának bemutatása	375
6.2. A mérések kiértékelése és a kapott adatok feldolgozása	377
6.3. A hitelesítéshez készített LabVIEW kód.....	381
6.4. A blokkolási nyomaték kalibrációja	382
7. Próbamérések.....	384
7.1. Egyszerű fékezés esete	384
7.2. Fék karakterisztika mérése	386
7.3. ABS működés vizsgálata	387
8. Összefoglalás.....	390
Irodalomjegyzék.....	391

Ábrajegyzék

1. ábra - A kerékpár fékezésekor fellépő erők	357
2. ábra - Az ékfék mechanizmus működési elve.....	362
3. ábra - Az elkészült szerkezet 3D modellje.....	364
4. ábra - A láncos áttétel	365
5. ábra - A mérőpad villamos rendszerének sematikus ábrája.....	367
6. ábra - A LabVIEW program felhasználói felülete	369
7. ábra - A lánckerekes hajtómű gyártása	372
8. ábra - Az erőmérés pontosságát növelő lemezek.....	373
9. ábra - A láncfeszesség beállítása	373
10. ábra - Az elektronikus alkatrészek és a védőburkolat.....	374
11. ábra - Az elkészült mérőberendezés le- és felszerelt lábakkal.....	374
12. ábra - Az erőmérő cella kalibrációjához készített segédeszköz.....	375
13. ábra - A szenzor kalibrálására készített program	376
14. ábra - Az erőmérő cella kalibrációjához használt súlyok	376
15. ábra - A vízzel végzett mérések alapján készített egyenes	378
16. ábra - A súlyzókkal végzett mérések alapján készített egyenes	379
17. ábra - A mérőbéllyeg kalibrációjának abszolút hibája.....	380
18. ábra - A mérőbéllyeg kalibrációjának százalékos hibája	380
19. ábra - 0,5kg-os súly mérésének eredménye	381
20. ábra - Az ABS kalibrációja	382
21. ábra - Egyszerű fékezés vizsgálata	384
22. ábra - Egyszerű mérés eredménye Excelben feldolgozva.....	385
23. ábra - A fékező nyomaték, a fordulatszám és a teljesítmény.....	385
24. ábra - A fék karakterisztika mérése	386
25. ábra - A Shimano hidraulikus fék karakterisztikája.....	386
26. ábra - Kis fékező nyomaték és lassú ABS beavatkozás.....	387
27. ábra - A kezelői felület ABS fék vizsgálatakor	388
28. ábra - Nagyobb fékező nyomaték és gyors ABS beavatkozás.....	388
29. ábra - A fordulatszám és a nyomaték közötti összefüggés	389

1. Motiváció

A Pannon Egyetem Járműmechanika intézetében különböző fékmechanizmusokkal és ABS szabályozó algoritmusokkal kapcsolatos kutatások folynak. Az eddig elkészült elméleteket, terveket, modelleket szeretttük volna a gyakorlatban is kipróbálni, erre kerestem megoldást. Amennyiben egy új fékmechanizmust egy igazi kerékpárra szerelünk fel, az adatok kiolvasása nehézkes és a mérést rengeteg tényező (a kerékpár, a gumik, a fékrendszer állapota, az aszfalt minősége, a környezeti hőmérséklet, a nedvesség, a vezető személye, fizikai állapota, stb.) befolyásolja. Ezek összessége azt okozza, hogy a mérés megismétlése esetén nem biztos, hogy az eredmény ugyanaz lesz, tehát nem teljesen reprodukálható, a mérések hitelessége így megkérdőjelezhető. Egy prototípus esetén nem zárható ki a rendellenes működés sem, a hibásan működő fék a kerékpáros sérülését is okozhatja. Ezekből kifolyólag célszerűnek tűnt egy olyan teszteszköz megépítése, amelyikkel a fékek működése minél egyszerűbben, biztonságosabban, pontosabban vizsgálható.

Ehhez a feladathoz terveztem egy olyan berendezést, melyen egy forgó féktárcsát fékezünk, a fékezés közben fellépő fékező nyomatékot mérhetjük, és a mérés adatait könnyen feldolgozhatjuk. A berendezést úgy terveztem, hogy használható legyen a féknyomaték mérésére is, illetve alkalmas legyen ABS algoritmusok vizsgálata esetén különböző körülmények emulálására.

A dolgozatban bemutatom a tervezés lépéseit, az alkalmazott számítási elveket, a megvalósítás folyamatát, és néhány egyszerű mérés eredményét. Kitérek az ékfék mechanizmus és az ABS rendszerek működésének ismertetésére is, ennek kapcsán magyarázva el, miért ezt a konstrukciót választottam. Annak bizonyítására, hogy a tesztberendezés megfelelőségét bizonyítsam, elvégeztem néhány mérést, hogy az eredményeket összevetve a tervezés során kiszámított értékekkel bizonyíthassam az elkészült berendezés működésének helyességét.

A dolgozatom felépítésében és nyelvezetében törekszem az egyszerűsége, és a könnyen érthető megfogalmazásra, igyekszem mindent pontosan, érthetően, mégis kellő tudományossággal elmagyarázni.

2. A fékezés matematikai leírása A fékezés során ható erők számítása

Ahhoz, hogy a munkát elkezdjem, szükséges volt meghatározni, hogy milyen erők, nyomatékok hatnak egy kerékpár fékezése esetén. Számításaimat azzal kezdtem, hogy meghatároztam bizonyos kiindulási feltevéseket, amelyek egy átlagos kerékpár fékezése közben körülbelül helytállóak lehetnek [3].

A számítások elvégzéséhez az alábbi adatokat vettem alapul:

1. táblázat - A számítások alapjául szolgáló adatok

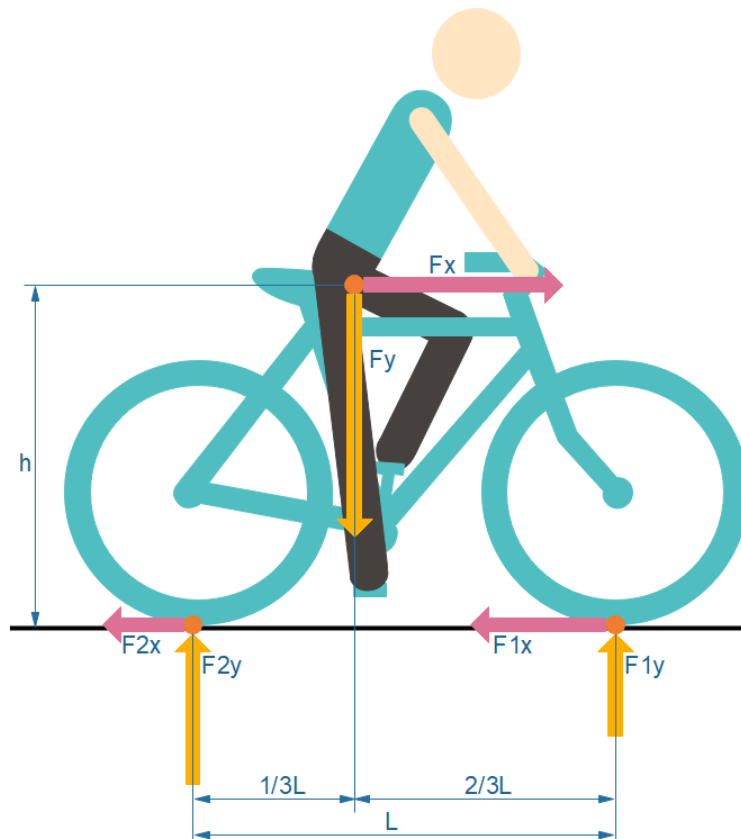
A kerékpár tömege ($m_{\text{kerékpár}}$)	20 kg
A kerékpáros tömege ($m_{\text{kerékpáros}}$)	80 kg
Az első kerékre jutó tömeg ($m_{\text{első}}$)	33,3 kg
A hátsó kerékre jutó tömeg ($m_{\text{hátsó}}$)	66,6 kg
A tömegközéppont magassága (h)	1,2 m
A kerékpár kerekének sugara ($r_{\text{kerék}}$)	0.33 m
A kerékpár tengelytávja (L)	1,2 m
A kerék és az aszfalt közötti tapadási együttható (μ)	0.8
A megengedhető maximális lassulás (a_{max})	3 m/s ²
A kerékpár kezdeti haladási sebessége (v_{kezd})	10 m/s

A táblázatban felsorolt értékek közelítő jellegűek, sok mindentől függhetnek, de jó alapot adnak olyan általános számítások elvégzéséhez, amik segítségével kiszámítható, hogy milyen nagyságrendű erőkkel és nyomatékokkal kell számolni egy kerékpár fékezése esetén.

A kerékpár haladásakor – sík úton, állandó sebességgel haladva, a légellenállást és a gördülési ellenállást elhanyagolva – csak függőleges erők hatnak. A kerékpáros tömegéből és a gravitációs gyorsulásból adódó nyomóerő (F_y) lefelé hat, ennek tart ellen a kerekek és az útfelület érintkezési pontjaiban ébredő F_{1y} és F_{2y} erő. Az F_{1y} és F_{2y} erők aránya a tömegközéppont helyzetéből adódik, ami függ a kerékpár méretétől, típusától, a vezető személyétől és a testhelyzetétől is, de általánosságban elmondható, hogy a vezető tömege az első és a hátsó kerék között 1/3 – 2/3 arányban oszlik el, úgy, hogy a nagyobb teher a hátsó kerékre jut.

Így felírható az egyensúlyi helyzetre az alábbi erőegyenlet:

$$-Fy + F1y + F2y = 0N \quad 1$$



1. ábra - A kerékpár fékezésekor fellépő erők

A függőleges irányú erők kiszámítása:

$$Fy = (m_{\text{kerékpár}} + m_{\text{kerékpáros}})g = 981 N \quad 2$$

$$F1y = \frac{1}{3}Fy = 327 N \quad 3$$

$$F2y = \frac{2}{3}Fy = 654 N \quad 4$$

A fékezés során a fékszerkezet a fékbetéteket a tárcsának szorítja, az összeszorító erő miatt az alkatrészek között súrlódási erő lép fel, mely a tárcsa sugarával egyenlő karon hat, így forgatónyomatékot hoz létre. Ez a fékező nyomaték a forgó kereket igyekszik megállítani. Mivel a kereket a vezető és a kerékpáros tömege az aszfalthoz nyomja, az nem áll meg, a kerék megállását az aszfalt és a gumibroncs között fellépő súrlódási erő akadályozza meg. Ez az erő a kerék sugarával egyenlő karon hat, így nyomaték ébred, mely nagyságát tekintve egyenlő a fékező nyomatékkal, de értelme ellentétes. A fékezés során ez a két nyomaték ellentart egymásnak, tehát egyensúlyban van. [5]

Ha a fékezéskor bekövetkező bólintási jelenséget elhanyagolnánk, az átvihető fékező erő az alábbi módon lenne számítható:

$$F1x = F1y\mu = 261,6 \text{ N} \quad 5$$

$$F2x = F2y\mu = 523,2 \text{ N} \quad 6$$

Ezt összeadva megkaphatjuk a teljes átvihető fékező erőt:

$$F_{x\max} = F1x + F2x = 784,8 \text{ N} \quad 7$$

Mivel ezt az erőt a kerékpár kerekének sugarával egyenlő karon hat, kiszámítható, hogy ez mekkora fékező nyomatékot jelent:

$$M_{\text{fékező}} = F_{x\max} r_{\text{kerék}} = 259 \text{ Nm} \quad 8$$

Newton második törvénye ($F = ma$) alapján ekkor kiszámíthatjuk az elérhető lassulást:

$$a_{\max} = \frac{F_{x\max}}{m} = 7,848 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} = 0,8 \text{ g} \quad 9$$

Ez akkor lenne helytálló, ha a tömegközéppont megfelelően alacsonyan lenne, de a valóságban figyelembe kell vennünk a kerékpár szerkezeti felépítéséből adódó fizikai jelenséget, a bólintást. Ez azt okozza, hogy a fékezés során a terhelés az első keréken megnő, a hátsó keréken pedig csökken, így a kerekeken átvihető erő is változik (az első keréken nagyobb fékező erőt vihetünk át, a hátsón kisebbet). Mivel a fékezés során a vezető és a kerékpár együttes tömege a kerékpárt igyekszik vízszintes irányban tovább mozgatni, fellép egy tehetetlenségi erő (F_x). Ez az erő a lassulás mértékével és a tömeggel arányos. Newton 2. törvényét ismét felhasználva felírhatjuk, hogy:

$$F_x = (m_{\text{kerékpár}} + m_{\text{kerékpáros}})a \quad 10$$

Ahol „ a ” a kerékpár lassulása.

Ez az erő tehát a lassulással arányosan növekszik. Mivel a tömegközéppont és a talaj között távolság van, ezért a tehetetlenségi erő olyan forgatónyomatékot okoz, amelyik a kerékpárt igyekszik a haladás irányába forgatni, tehát ez okozza az első kerékre jutó terhelés megnövekedését, és a hátsóra jutó csökkenését.

A forgatónyomaték értéke az alábbi módon számítható ki:

$$M = F_x h \quad 11$$

Ez a forgató hatás oly mértékű is lehet, hogy a hátsó kerékre jutó függőleges irányú erő 0. Ez az állapot a határhelyzet, amikor már nem növelhető tovább a lassulás, mert a kerékpáros előre bukna. Ekkor az erők egyensúlya alapján a függőleges erők az alábbi módon egyenlítik ki egymást:

$$-F_y + F1y = 0 \quad 12$$

A határhelyzetben a hátsó kerék és a talaj érintkezési pontjára felírhatjuk az alábbi nyomatéki egyenletet:

$$-F_y \frac{1}{3}L + F1yL - M = 0 \quad 13$$

A 12. egyenlet alapján ($F_{ly} = F_y$):

$$F_y \frac{2}{3} L - M = 0 \quad 14$$

$$F_y \frac{2}{3} L = M \quad 15$$

A 15. egyenletbe a 2. 10. és 11. egyenleteket behelyettesítve és átrendezve:

$$(m_{\text{kerékpár}} + m_{\text{kerékpáros}}) g \frac{2}{3} L = (m_{\text{kerékpár}} + m_{\text{kerékpáros}}) a h \quad 16$$

Ezt egyszerűsítve és átrendezve látható, hogy a maximálisan elérhető lassulás:

$$a = g \frac{2L}{3h} = 6,54 \frac{m}{s^2} \quad 17$$

Ez a kerékpár felépítéséből adódó maximum. Ez az érték változhat a kerékpártól és kerékpáros személyétől függően, de látható, hogy jó tapadási körülmények között ez a meghatározó érték, ennél nagyobb lassulást semmiképp sem érhetünk el.

Hogy ezt a lassulást elérjük, Newton II. törvényét felhasználva kiszámítható, hogy

$$F_{\text{súrlódás}} = (m_{\text{kerékpár}} + m_{\text{kerékpáros}}) a = 654 \text{ N} \quad 18$$

fékező erőt kell kifejtenuk a kerékpárra és a kerékpárosra együttesen.

A kerékpár kívánt mértékben történő lelassításához tehát a mozgó tömegre ezzel az erővel kell hatni. A szükséges fékező erőt azonban nem közvetlenül a kerékpárra vagy a kerékpárosra fejtjük ki. Az erő talaj és a kerék érintkezési pontjában lép fel, és a kerék közvetíti, mégpedig úgy, hogy a kerékpárra szerelt – tehát a mozgó tömeghez rögzített – fékkel a forgó féktárcsát szorítjuk, így ott a tárcsa sugarával ($r_{\text{féktárcsa}}$) egyenlő karon a féknyereggel erőt fejtünk ki (F_{fek}), tehát egy fékező nyomatékot ($M_{\text{fékező}}$) hozunk létre. Amennyiben egy levegőben forgó kereket fékeznénk, a forgási sebesség csökkentéséhez csak a kerék tehetetlenségét kéne legyőzni, de mivel itt a kerék egy mozgó tömeghez van rögzítve, a forgási sebességének csökkentéséhez azt az erőt is le kell győzni, ami a forgását okozza. Ez az ok pedig nem más, mint hogy a mozgó kerékpár és kerékpáros együttes tömege a kereket a talajhoz szorítja, és a talaj és a kerék érintkezésénél emiatt fellépő súrlódási erő a kereket forgásba hozza. A kerék fékezése során tehát a kerékpár a tehetetlenség miatt igyekszik az eddigi sebességével tovább haladni, így a kerék nem tud hirtelen lelassulni a fékező hatás miatt és a talaj érintkezési pontjánál olyan súrlódási erő ébred ($F_{\text{súrlódás}}$), melynek mértéke arányos a kifejtett fékező nyomatékkal és a kerék sugarával ($r_{\text{kerék}}$) egyenlő karon hat, irányát tekintve pedig olyan, hogy a kerék forgását fent tartsa. Tehát itt is egy nyomaték lép fel, mely egyensúlyt tart a fékező nyomatékkal ($M_{\text{hajtó}}$).

A fent említett jelenséget az alábbi egyenletekkel írhatjuk le:

A nyomatékok egyensúlya:

$$M_{f\acute{e}kez\acute{o}} = M_{hajt\acute{o}} \quad 19$$

A kereket fékező nyomaték:

$$M_{f\acute{e}kez\acute{o}} = F_{f\acute{e}k} r_{f\acute{e}kt\acute{a}rcsa} = 215 \text{ Nm} \quad 20$$

A tárcsa és a betét összeszorításánál ébredő fékező erő:

$$F_{f\acute{e}k} = F_{nyom\acute{o}} \mu_{f\acute{e}k\text{bet}\acute{e}t-t\acute{a}rcsa} \quad 21$$

A kerékpár mozgásából adódó, a kereket továbbra is forgatni igyekvő nyomaték:

$$M_{hajt\acute{o}} = F_{s\acute{u}rl\acute{o}d\acute{a}s} r_{ker\acute{e}k} \quad 22$$

Az abroncs és az aszfalt közötti súrlódó erő:

$$F_{s\acute{u}rl\acute{o}d\acute{a}s} = F_{nyom\acute{o}} \mu \quad 23$$

Az abroncs és az aszfalt között fellépő nyomóerő:

$$F_{nyom\acute{o}} = mg \quad 24$$

A maximálisan elérhető fékező nyomaték szerkezeti felépítés okozta korlátja tehát 215 Nm. Kiszámítható, hogy ekkor a felületeket összeszorító erő és a fellépő súrlódási erő hányadosa:

$$\mu > \frac{F_{s\acute{u}rl\acute{o}d\acute{a}s}}{F_y} = 0,72 \quad 25$$

Ez az a kritikus súrlódási tényező, amely fölött az előre billenés miatt nem lehet nagyobb fékező nyomatékot kifejteni, ez alatt pedig a súrlódási tényező határozza meg a kifejthető nyomaték értékét, túl nagy fékező nyomaték esetén megcsúszik a kerék, ami a jármű instabilitását okozza, a kerékpár irányíthatatlanságához, boruláshoz vezetve.

Ezek az elméletben elérhető maximumok, de a gyakorlati mérések azt bizonyítják, hogy egy átlagos kerékpáros 0,3g körüli lassulást ítél komfortosnak, biztonságosnak. Az ekkor ható erők és nyomatékok az alábbi módon számíthatók ki:

A fékezéshez szükséges erő:

$$Fx = (m_{ker\acute{e}kp\acute{a}r} + m_{ker\acute{e}kp\acute{a}ros})a = 327 \text{ N} \quad 26$$

Ekkor a kerékpár mindkét kereke a talajon van, tehát mindegyik visz át fékező erőt, és az átvitt erő mértéke messze van attól, ahol a kerék megcsúszik, tehát feltételezhetjük, hogy a kerékpár mindkét kerekét egyforma fékerőt visz át.

$$F1x = F2x = 165,5 \text{ N} \quad 27$$

Ez az erő a kerék sugarával egyenlő karon hat, tehát a fékező nyomaték:

$$M_{f\acute{e}k} = F1x r_{ker\acute{e}k} = 54,6 \text{ Nm} \quad 28$$

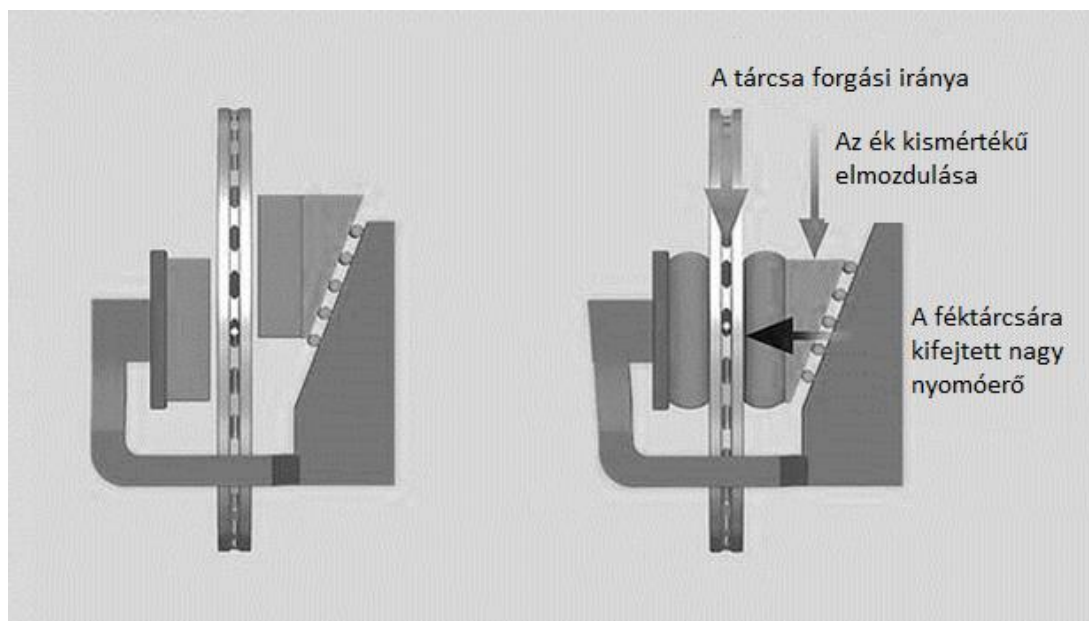
Az ilyen mértékű lassulás eléréséhez szükséges minimális tapadási tényező:

$$\mu > \frac{F_{s\acute{u}rl\acute{o}d\acute{a}s}}{F_y} = 0,17 \quad 29$$

A számítások alapján olyan berendezés tervezésébe kezdtem, mely képes ezeknek az erőknek, nyomatékoknak a mérésére. A célom az volt, hogy a mérések minél nagyobb tartományban elvégezhetőek és minél pontosabbak legyenek.

3. A tervezés lépéseinek bemutatása Az ékfék mechanizmus működésének ismertetése

Az általam tervezett mérőberendezésnek alkalmasnak kellett lennie a hagyományos fékrendszerek és egy újszerű ékfék mechanizmussal működő féknyereg működésének vizsgálatára is. Hogy a teszteléshez megfelelő eszközt készíthessek, elengedhetetlen volt az ékfék mechanizmus megismerése.



2. ábra - Az ékfék mechanizmus működési elve

Az ékfék előnye a hagyományos rendszerekkel szemben, hogy száraz, tehát nem szükséges se fékfolyadék, se fékcsövek, se munkahengerek. A működéséhez csak megfelelő tápellátásra és elektronikus vezérlésre van szükség. A működése azon alapszik, hogy az ék alakú fékpofa a golyókkal ellátott felületen elmozdul, így közelebb kerül a féktárcsához. A hagyományos fékeknel a fékdugattyú a féktárcsára merőleges nyomást fejt ki, ezzel szemben az ékféknél az ék erősítő hatását használják ki, ami azt jelenti, hogy a fékpofa a golyókkal érintkező ferde felület mentén egységnyit mozdul el, a tárcsára merőleges irányú elmozdulás ennek csak töredéke lesz. Amennyivel kevesebbet mozdul el a tárcsára merőlegesen, mint a ferde felület mentén, annyival nagyobb erőt képes kifejteni ebbe az irányba, mint amennyi az elmozdításához szükséges volt. Ez az arány az ék szögétől függ, nagyobb ékszög esetén azonos fékező erőhöz nagyobb mozgóerő szükséges, míg kisebb ékszög esetén kisebb. Az ék szöge csak bizonyos mértékig csökkenthető, mert a kúpok kb. 3° alatt önzáróak (pl. szerszámgépek esetén Morse kúpok), ez azt jelenti, hogy a kúpos felületek összeszorulnak,

így a visszamozdításhoz nagyon nagy erő szükséges, a fékmechanizmus „beszorul”. [6], [7], [8], [9]

3.2. A koncepció kialakítása

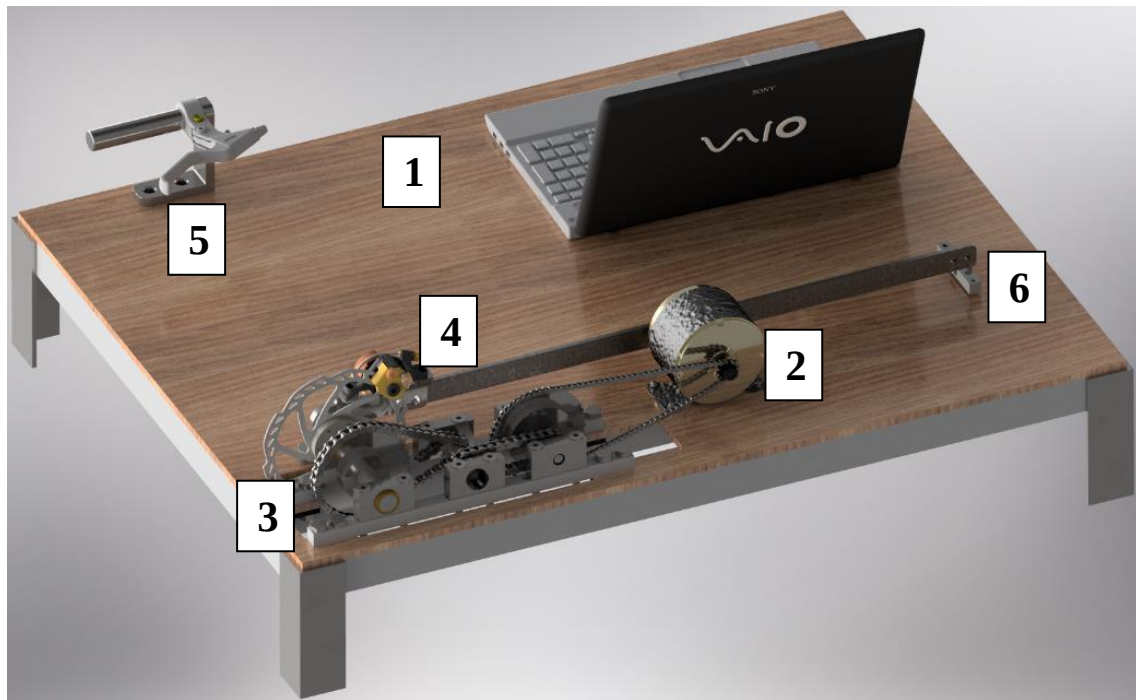
A számítások elvégzése után mérlegeltem, hogy mik azok a fontos szempontok, kritériumok, amelyeket a tesztberendezésnek teljesítenie kell, hogy a fék vizsgálatára alkalmas legyen, illetve az ABS algoritmusok tesztelhetők legyenek rajta. Az ABS működésének legfontosabb alapelve az, hogy képes detektálni a blokkoló kereket, és ilyen esetben a fékerőt csökkenteni. A kerék blokkolása különböző körülmények esetén különböző féknyomatéknál következik be. Így olyan berendezésben kezdtem gondolkodni, ami a féknyomaték mérésére alkalmas, valamint képes emulálni a kerék megcsúszását.

A fékezéshez szükséges teljesítmény vizsgálatához hatalmas teljesítményű berendezést kellett volna építenem, ez kizárólag annyiban tudott volna többet, hogy a fék valóban úgy melegedett volna, ahogy a fékezés során, de az ABS működése nem a fékbetét hőmérsékletétől függ, ezért ennek mérését másodlagosnak tekintettem.

A féknyomaték mérésének legegyszerűbb és legelegánsabb módja az lett volna, ha a féktárcsa tengelye és a hajtó tengely közé egy tengelyek közé szerelhető nyomatékmérőt szereltem volna, de az ilyen eszközök ára nagyon magas, így más megoldást választottam.

A megvalósításra került ötlet lényege, hogy egy villanymotorral egy állítelen át egy féktárcsát forgatok, majd azt fékezem. A féknyereg egy elfordulni képes konzolra van felerősítve, így a fékezéskor a forgó tárcsa igyekszik a féknyeret és a tartó konzolját is magával forgatni. A konzolra egy hosszú kar is rögzítve van, amelyiknek a másik vége egy erőmérő cellát nyom. Az erőmérő cella adataiból és a kar hosszából így már kiszámítható, hogy mekkora fékező nyomaték ébred. Bár közvetlenül nem mérjük, az is kiszámítható, (illetve a súrlódási együtthatók pontos értékének hiányában becsülhető), hogy mekkora erővel nyomja a fékbetét a tárcsát. A megoldás hátránya, hogy nem alkalmas melegedési és kopási vizsgálatokra, mert a tárcsa lassabban forog, mint ahogy egy valódi kerékpáron használva forogna [1].

A tárcsa meghajtására DC motort használtam az egyszerű szabályozhatósága miatt, az adatok gyűjtésére Arduinot, a számítógépen futó program megírására pedig LabVIEW-t, mert volt már velük tapasztalatom, illetve a kommunikáció könnyen megvalósítható a kettő között.



3. ábra - Az elkészült szerkezet 3D modellje

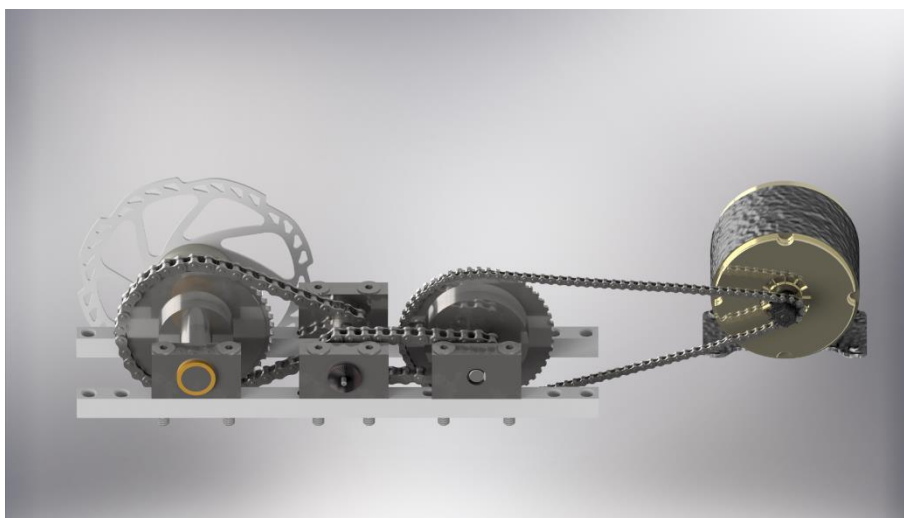
3.3. A berendezés felépítése

A mérőpad az alábbi részegységekből áll össze:

1. Asztalkeret az asztallappal – Szerepe a berendezés többi elemének stabil helyzetben tartása
2. Villanymotor – 24 V-os, 250 W teljesítményű keféss DC motor, mely a hajtást biztosítja.
3. Hajtómű – A villanymotor által leadott teljesítményt a féktárcsa forgatásához és a méréshez megfelelő mértékben alakítja át.
4. Féknyereg tartó konzol – A féknyereg megfelelő rögzítését és az erőmérő cella nyomását biztosítja.
5. Fékkar tartó – A rendszert működtető fékkar rögzítésére kialakított hely.
6. Erőmérő cella – A féknyereg tartójára rögzített kar által nyomott erőmérő.
7. Mikrovezérlő – Arduino nano, az erőmérő cella és a fordulatszámérő adatait dolgozza fel és küldi a számítógépnek, valamint a számítógéptől kapott információk alapján jelet ad a motorvezérlőnek (nem szerepel a rajzon)
8. Motorvezérlő elektronika – a mikrovezérlő jelének megfelelően változtatja a motorra adott feszültséget (nem szerepel a rajzon)
9. Fordulatszámérő – Optikai enkóder, mely a kimenetén magas, vagy alacsony jelet ad ki, attól függően, hogy a keréknek épp lyukas vagy teli része áll a LED és a fototranzisztor között (nem szerepel a rajzon)

3.4. A lánckerekes áttételek számítása

A kerékpár lassítására használt fék egy átlagos fékezéskor a fékezett keréken mérve kb. 50 Nm lassító nyomatékot hoz létre. A méréshez arra van szükség, hogy a motor ekkora, vagy nagyobb hajtó nyomatékot biztosítson. Ezt a tengelyén mérve egy 24 V-os DC motor nem tudja előállítani. Hogy ekkora nyomatékot tudjak elérni, áttételre van szükség. Az áttétel megvalósítása több módon lehetséges, én a láncos megoldás mellett döntöttem egyszerű megvalósíthatósága és alacsony ára miatt. A fordulatszám csökkentését és a nyomaték növelését egy háromfokozatú láncos áttétel biztosítja, mely az alábbi ábrán látható:



4. ábra - A láncos áttétel

3.5. Az áttétel felépítése, működése

A berendezés meghajtására egy 250 W teljesítményű 24 V-os DC motort használtam, melyet részletesebben a fejezetben mutatok be. Ez a motor a kihajtó tengelyén 04B fogaskerékkel rendelkezik, így az első áttételnél a lánc típusa adott volt már.

A lánckerekes hajtás megtervezésénél először kiszámítottam a szükséges végállítást, tehát abból indultam ki, hogy a motor által leadott nyomatéknak hányszorosára van szüksége a mérésekhez. A számítások alapján arra jutottam, hogy körülbelül 50 szorosára kell növelni a motor nyomatékát, ezt pedig egy fokozattal lehetetlen megoldani, hiszen a motor tengelyén 11 fogú fogaskerék volt, ez azt jelentené, hogy a megfelelő áttétel biztosításához a másik oldalon 550 fogúra lenne szükség. Ez nyilvánvalóan nem járható út. Ezután a kereskedelemben kapható lánckerekeket tanulmányozva, és a geometriai szempontokat is figyelembe véve arra jutottam, hogy három fokozatú lánckerekes hajtóművet építek. Az áttételek meghatározása

után kiszámítottam az egyes lánckerekek fordulatszámát, a tengelyeken ébredő nyomatékokat, a láncokat terhelő húzóerőket. A lánckerekes hajtás adatait az alábbi táblázat tartalmazza:

2. táblázat - A lánckerékáttételhez használt lánckerekek adatai

Megnevezés	Típus	Fogsám	Osztókör	Fordulatszám
1. Lánckerék	04B	11	21,30	2750
2. Lánckerék	04B	50	95,55	605
3. Lánckerék	06B	8	24,89	605
4. Lánckerék	06B	16	48,82	302
5. Lánckerék	06B	8	24,89	302
6. Lánckerék	06B	50	151,69	48

Az első áttétel tehát egy 11/50-es, a második egy 8/16-os, a harmadik pedig egy 8/50-es áttétel. Ez így összesen 0,0176-os áttétel, tehát a fordulatszám 0,0176-od részére csökken (ami a névleges fordulatszám esetén percenként 48,4-es fordulatszámot jelent), a nyomaték pedig 56,8-szeresére nő (mely a névleges nyomaték esetén 49,4 Nm-t jelent).

Ezek a névleges értékek, de a motor a névlegesnél nagyobb terhelés esetén a fordulatszám csökkenése és a felvett áram növekedése mellett a névleges nyomaték többszörösét is képes leadni, tehát elegendő lesz a kerékpárok fékberendezései által leadott fékező nyomaték legyőzésére.

A láncajtás tervezésénél kiszámítottam, hogy az egyes fordulatszám és nyomaték értékek ismeretében milyen erő terheli a láncot. Számításaimat arra az esetre alapoztam, hogy 150 Nm fékező nyomatékot hozok létre a féktárcsa tengelyén. Az erők és fordulatszámok meghatározása után egy katalógus ajánlása alapján lánc típust választottam. A magasabb fordulatszámon forgó, de kisebb terhelésű áttétel esetén, a motor tengelyén lévő lánckerék adott volt, így az első lánc típusát ez alapján választottam. A másik két – kisebb fordulatszámú, de nagyobb nyomatékú – áttételhez erősebb, 06B típusú láncokat és lánckerekeket használtam. Az általam használt láncok erősen túl vannak méretezve, de mivel egy kísérleti eszközök mérésére is használandó fékpadról van szó, így előfordulhatnak nem várt esetek is. [4] A működés közben fellépő erőket és nyomatékokat az alábbi táblázat tartalmazza:

3. táblázat - A hajtómű tengelyein ébredő nyomatékok

Tengely	Tengelyen ható nyomaték
3.Tengely	150Nm
2.Tengely	24Nm
1.Tengely	12Nm
Motor tengelye	2,64Nm

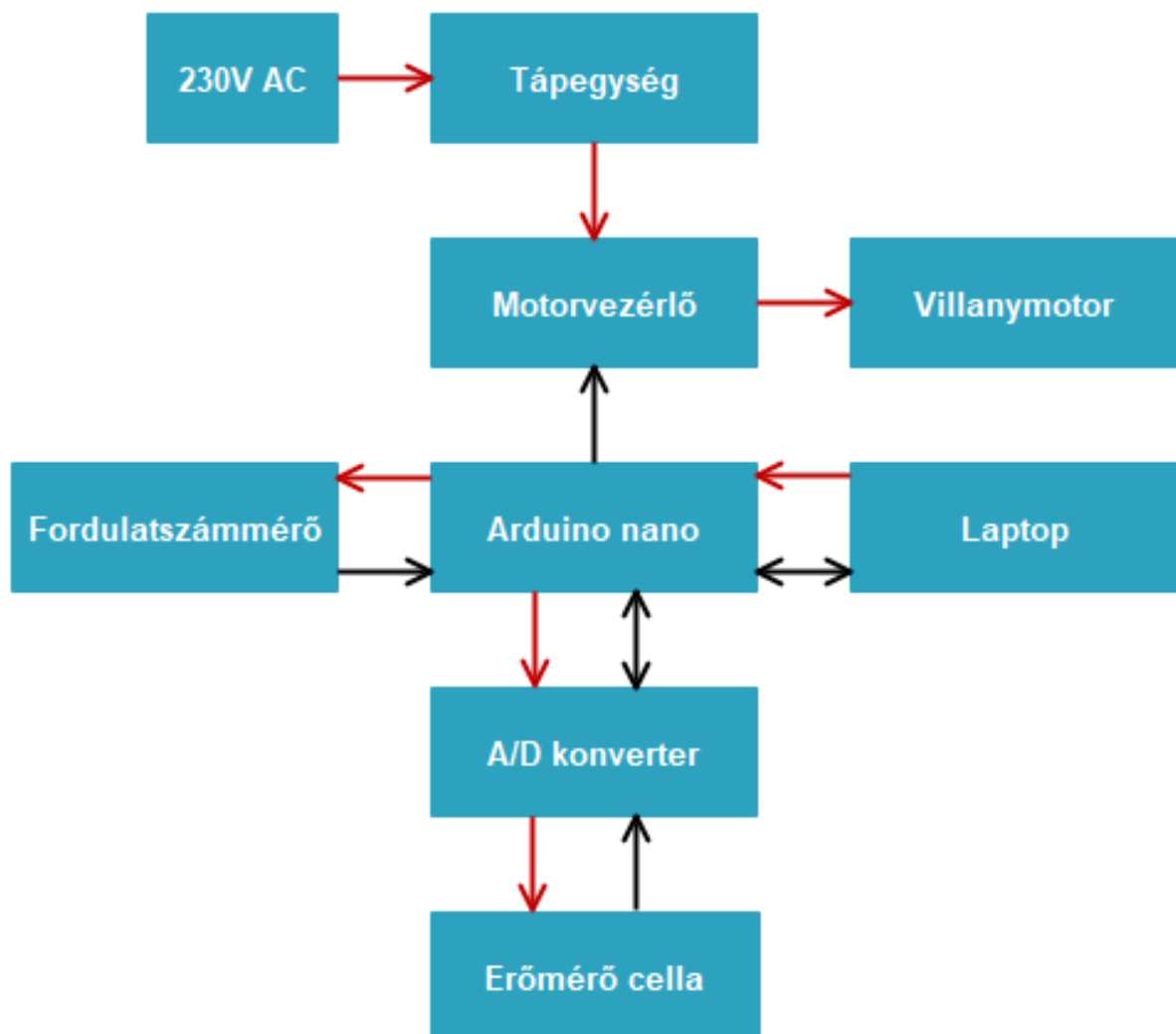
4. táblázat - A hajtómű láncaira ható erők

Lánc	Típusa	Megengedett terhelés	Fellépő terhelés
1.Lánc	04B-1	3000N	264N
2.Lánc	06B-1	9000N	1200N
3.Lánc	06B-1	9000N	2500N

3.6. A mérőeszköz elektromos rendszere

Az elkészült berendezés villamos szempontból elég egyszerű, egy tápegységből, egy mikrokontrollerből, egy erőmérő cellából, egy A/D konverterből és egy fordulatszámérő egységből áll.

Az áttekinthetőség kedvéért és az esetleges javítások, módosítások egyszerűbb elvégezhetősége érdekében készítettem egy sematikus ábrát, mely bemutatja az eszköz villamos hálózatának felépítését.



5. ábra - A mérőpad villamos rendszerének sematikus ábrája

Az ábrán a tápvonalakat pirossal, az adatvonalakat feketével jelöltem. Ahogy a képen látható, a motor tápellátását a tápegység biztosítja, a mérőeszközöknek pedig elég a laptopból az USB csatlakozón keresztül érkező áram. A tápegység egy kapcsolóüzemű tápegység, mely a hálózati 230 V-ból 12 V egyenfeszültséget állít elő, és legfeljebb 20 A-t képes leadni. Ez csatlakozik a motorvezérlő bemenő felére, így tehát annak kimenő oldalán tehát ez a maximálisan kivehető áram és feszültség (a motorvezérlő áramkör veszteségeitől eltekintve).

A mikrokontroller a számítógép USB csatlakozóján keresztül kapja a tápellátást, a többi eszköz pedig a mikrokontrollertől. A fordulatszámérőnek tápként 0 és +5 V kell, így a kimenetén is 0 vagy +5 V jelenik meg, attól függően, hogy az enkódertárcsa teli vagy lyukas része van épp az optokapu előtt. A mikrokontroller ezekből az adatokból számítja ki a fordulatszámot. Az A/D konverternek szintén 0 és +5 V feszültség kell, valamint egy órajel és egy adatvonal. Ehhez csatlakozik az erőmérő cella, mely valójában 4 nyúlásmérő bélyeg Wheatstone hídba kapcsolva.

Mivel a motorvezérlő áramkört is a mikrokontrollerről vezérem, a két külön áramköri rész földjeit közösítettem.

4. A működéshez szükséges szoftverek

4.1. A mikrokontrolleren futó program

A mechanikai tervezés befejezése után nekiláttam az Arduino program megtervezésének és megírásának. A programot a lehető legegyszerűbbre próbáltam készíteni.

A program 6 jól elkülöníthető részből áll. Ezek mindegyike különböző feladatot lát el.

- A programban szereplő változók létrehozása, inicializálása
- A mikrokontroller és a számítógép közötti kommunikációs beállítások elvégzése
- Főprogram, melyben a megírt függvényeket meghívom
- Az erőmérő cella adatait feldolgozó függvény
- A fordulatszámot számító függvény
- A motor vezérlését biztosító függvény

4.2. A LabVIEW program bemutatása

A programhoz egy olyan felhasználói felületet készítettem, amiről minden lényeges információ leolvasható, mégis egyszerűen áttekinthető.



6. ábra - A LabVIEW program felhasználói felülete

A felületen bal oldalt felülről lefelé haladva az alábbi elemek találhatók:

- A blokkolási nyomaték beállítására szolgáló adatbeviteli mező – Az ABS működésének szimulációja úgy valósítható meg, ha a féktárcsa forgása ténylegesen leáll. Az, hogy a

valóságban a kerék mekkora fékező nyomaték esetén blokkol, a 2. fejezetben tárgyalt módon számítható ki. Amennyiben kiszámítottunk egy bizonyos értéket, és ezt az adott helyzetet szeretnénk emulálni, a kiszámított nyomatékokat ebbe a mezőbe írjuk be. Ekkor ennek az értéknek az elérésekor a tárcsa tényleg állóra fékeződik, ahogy az a valóságos kerékpár esetén történne, amikor a kerék megcsúszik. Ha a fékkart visszaengedjük, a féktárcsát szorító erő csökken. Amint ez az erő a kritikus érték alá ér, a tárcsa újra forgásba jön, ahogy a valóságos kerékpár esetén is ismét forogni kezd a kerék, ha a fékerőt csökkentjük.

- Kijelző mezők – Ezekben a mezőkben láthatjuk a mérés eredményét. A pontosabb eredmény és a könnyebb leolvashatóság érdekében a program nem a pillanatnyi értéket jelzi ki, hanem egy futó átlaggal simított értéket, amelynek lényegét a későbbiekben fejtem ki. A legfontosabb mért jellemző a fék által kifejtett fékező nyomaték, ez került felülre. Alatta a fékteljesítmény, ami lényegesen alacsonyabb, mint a tényleges fékezéskor, hiszen a tárcsa körülbelül tized akkora fordulatszámon forog. Az eredmény azonban alkalmas a mért fordulatszám és nyomaték adatok valóságának újbóli ellenőrzésére, mert a motor teljesítménye ismert (250 W), és mivel a 24 V-os feszültség helyett csak 12 V-ról táplálom meg, 125 W a maximális teljesítmény, ami kivehető belőle. Ebből még lejönnek a láncos áttételek és a csapágysíkok gördülési, súrlódási veszteségei, így összesen körülbelül 100 W teljesítményt tud leadni a rendszer. A mérések során a fékteljesítmény értéke 100 W alatt volt, így ez is igazolja, hogy a mért nyomaték és fordulatszám értékek hihető tartományban vannak.
- A korrekciókért felelős részek – Az első a null korrekció, erre azért van szükség, mert az alkatrészek pontatlansága miatt van egy kis ütése a féktárcsának, amely így időnként akkor is minimálisan hozzáér a fékbetéthez, amikor a fékkar elengedett állapotában van. Ez 1-2 Nm eltérést jelent, ami nem nagy eltérés, de jobbnak láttam egy ilyen korrekciós lehetőség bevezetését.

A másik a blokkolási nyomaték korrekciója. A beállított nyomaték elérése esetén történő blokkolást úgy valósítom meg, hogy egy kalibrációs folyamat során meghatároztam, hogy az egyes PWM kitöltési tényezők esetén milyen maximális nyomaték leadására képes a motor. Ezekre az adatokra egyenest illesztettem, majd a képletet átalakítva visszakaptam, hogy a kívánt maximális nyomaték eléréséhez milyen kitöltési tényezőt kell beállítanom. Az egyenes illeszkedésének pontatlansága, és az alkatrészek melegedéséből adódó, működés közben bekövetkező változások miatt előfordulhat, hogy a szerkezet nem a beállított nyomaték esetén fékeződik állóra. Ennek elkerülése érdekében egy korrekciós

lehetőséget adtam hozzá, amellyel precízen beállítható, hogy a szerkezet mindig pontosan a kívánt nyomaték esetén fékezze állóra a tárcsát.

- Akciógombok
 - Nullázás – Az előbb említett null korrekció automatikus elvégzése. A gombra történő kattintás után a program automatikusan elvégzi a korrekciózást. Addig állítja magát, amíg a hiba a programban előre definiált határok közé nem kerül
 - Korrekció – A gomb alkalmas a tárcsa blokkolása esetén a blokkolási nyomaték finom korrekciójára. A használatához a tárcsát állóra kell fékezni, majd a gombot nyomva tartani.
 - Adatok mentése – A három grafikonon látható adatok Excel táblázatba mentése. Az adatok kimentése .csv formátumban történik, amely később könnyen kezelhető Excelben az adatok feldolgozása, a mérés kiértékelése szempontjából.
 - Forog – Ez egy indikátor. Ha a tárcsa megállt, a színe és a felirata megváltozik, jelezve, hogy a féknyomaték elérte a beállított értéket.
 - Stop – A program megállítása, ekkor a program a motort is leállítja.
- Port - A program indítása előtt itt kell kiválasztani, hogy a számítógépen melyik COM portra van csatlakoztatva a mikrokontroller. Amennyiben a csatlakozás megfelelő, a program zölddel kiírja, hogy „nincs kommunikációs hiba”, ha nem megfelelő portot választottunk, pirossal írja, hogy „kommunikációs hiba”
 - Diagramok – Mindhárom diagramban közös, hogy két adatsor látható rajtuk egyidejűleg. Az egyik a pillanatnyi érték (pontokkal jelölve), ami a mikrokontrollerből épp érkezik. Ez gyorsabban követi a változásokat, de zajjal terhelt, ezért alkalmazom a második görbét (folytonos vonal), amely egy mozgó átlaggal simított érték.
 - A felső diagramon a fékező nyomaték látható. A berendezés alapvetően a fékező nyomaték mérésére való, ezért ez a legfontosabb mérendő mennyiség, ezt tettem a középpontba. A függőleges skála 0-100 Nm, mert nagyjából ebben a tartományban várhatóak az eredmények.

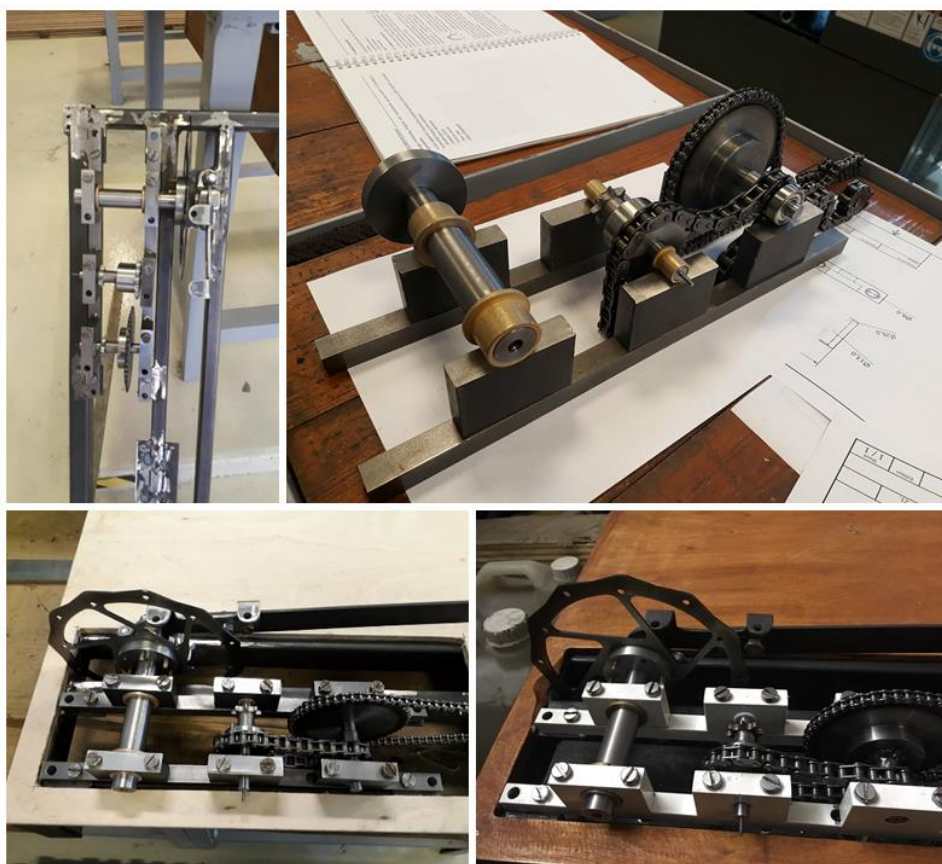
A bal alsó diagram a féktárcsa fordulatszámát mutatja. A mikrokontroller a lánckerekes hajtómű közepső tengelyének fordulatszámát méri és küldi a számítógép felé, de az áttétel ismeretében ebből már könnyen kiszámítható a féktárcsa fordulatszáma, és ezt a fordulatszámot mutatja ez a grafikon.

A jobb alsó diagramon a fékteljesítmény látható. A mérés során a féktárcsa fordulatszáma végig meglehetősen alacsony, így a fékteljesítmény is kicsi.

5. A megépítés lépéseinek bemutatása

5.1. A váz és a hajtómű elkészítése

A tervek elkészülte után költségtervet készítettem, majd a kereskedelemben kapható alkatrészeket megrendeltem, a vázszerkezethez és a hajtómű tengelyeihez pedig megvásároltam az alapanyagokat. A vázszerkezetet én magam gyártottam le, ahogy a hajtómű tengelyeit is. A vázszerkezetet a JK-Horsetrucks kft. hegesztőműhelyében készítettem el, ahogyan az asztallábakat és a féknyereg felfogatóját, és az ahhoz csatlakozó kart is. Az esztergályos és szerelési munkákat az egyetem műhelyében végeztem.



7. ábra - A lánckerekes hajtómű gyártása

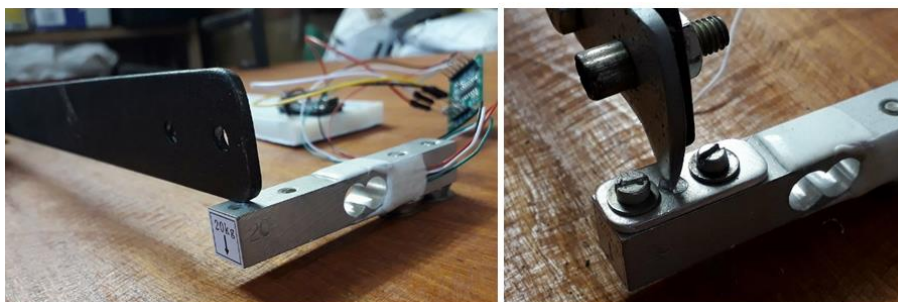
A vázszerkezetet a rajzoknak megfelelően készítettem el, az asztal alján rövid, zártszelvényből készült csomópontokat helyeztem el, ezekre csatlakoznak az asztal lábai, így a szerkezet szétszedhető, szállítható.

A tengelyek elkészítése után a lánckerekeket is meg kellett munkálni, mert ezek gyárilag egy adott méretű furattal készülnek, ezt esztergán a megfelelő méretűre bővítettem.

A következő lépés a csapágyházak elkészítése volt, ezeket a terveim alapján az egyetemi műhelyben készítették el. Ezzel párhuzamosan elkészítettem a fa asztallapot.

5.2. Összeszerelés és festés

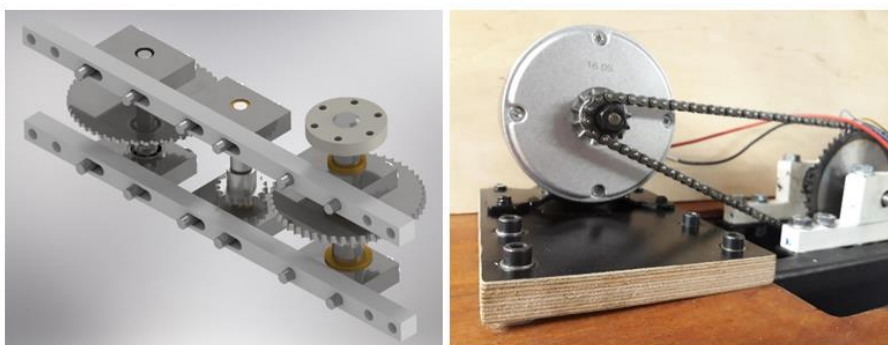
A szerkezetet elkészülte után darabjaira szedtem, lefestettem, majd ismét összeszereltem. A festés és összeszerelés után rájöttem, hogy a mérőcellát nyomó kar, melyet 35x3mm-es szerkezeti acélból készítettem, ezen a hosszon képes oldalirányban kihajlani, így az erőmérő cellát nem mindig pontosan ugyanott nyomja, így az nem azonos mértékben hajlik le, ezért hamis eredményt mutat.



8. ábra - Az erőmérés pontosságát növelő lemezek

A pontosság javítása érdekében az erőmérő cellára egy pozicionáló furattal ellátott lemezt erősítettem, az azt nyomó karra pedig egy tűske alakút. A mérés során a nyomótűske beleül a pozicionáló furatba, így mindig pontosan ugyanott nyomja a cellát, így azonos erő – tehát azonos fékező nyomaték – hatására mindig azonosan mindig ugyanannyit hajlik le az erőmérő, így ugyanazt az értéket mutatja.

A láncos hajtás megfelelő működéséhez szükséges a lánc megfelelő feszességének beállítása. A hajtóműben az első tengely (amelyikre a féktárcsa rögzítve van) rögzített helyen van, a másik két tengelyt tartó csapágyházak alatt a sínen azonban ovális furatok vannak, melyek lehetőséget biztosítanak arra, hogy a tengelyeket elmozdítsuk. Így beállítható az egyenes futás és a láncfeszesség is.



9. ábra - A láncfeszesség beállítása

Az összeszerelés során kiderült, hogy a három lánc feszességének megfelelő beállításához szükséges a motor mozgathatósága is, így a motort egy dönthető lemezre

helyeztem. A dőlésszög megváltoztatásával változik a lánc feszessége. A lemezt jobban megdöntve a lánc lazább lesz, kisebb szög esetén pedig feszesebb.

A festés és összeszerelés után felhelyeztem az enkódert és elvégeztem az elektromos bekötést, illetve rögzítettem az elektronikus alkatrészeket az asztallaphoz. Ezután egy plexiből készült védőburkolatot készítettem a lánckeres hajtómű köré az esetleges balesetek elkerülése érdekében.



10. ábra - Az elektronikus alkatrészek és a védőburkolat

Utolsó lépésként elkészítettem és lefestettem a berendezés lábait, melyek könnyen le és felszerelhetők, így az eszköz könnyen tárolható, szállítható.



11. ábra - Az elkészült mérőberendezés le- és felszerelt lábakkal

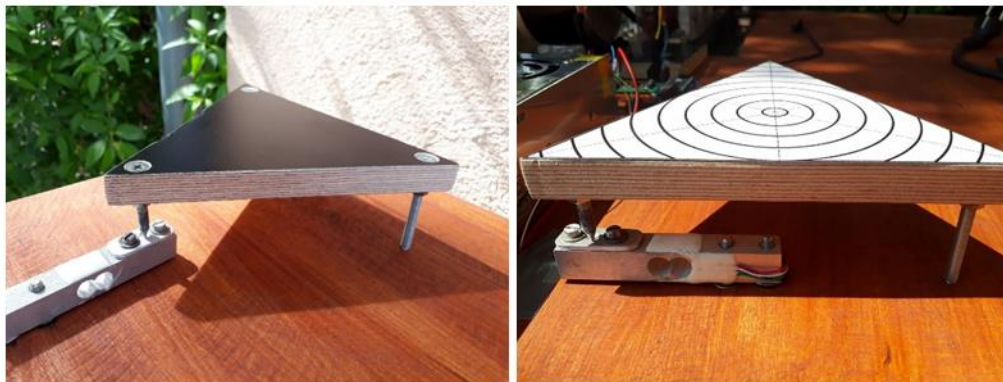
A berendezés így könnyen összeállítható, egy mérés megkezdéséhez csupán fel kell szerelni a lábakat, elektromos hálózathoz csatlakoztatni, és a számítógéppel összekötni.

6. A berendezés kalibrációja

6.1. A mérőcella kalibrációjának bemutatása

Az egész berendezés működése a mérőbéllyeg által szolgáltatott adatokon alapszik, ezért elengedhetetlen, hogy minél pontosabban kalibráljuk, minél pontosabban dolgozzuk fel az abból kijövő adatokat. Ebben a fejezetben bemutatom, hogy milyen módon kalibráltam a mérőbéllyeget.

A kalibráció ebben az esetben annak meghatározását jelenti, hogy az A/D konverterből kapott nyers adatok és a cella terhelése között milyen összefüggés van. Ennek meghatározáshoz először az szükséges, hogy a cellát különböző, ismert tömegekkel terheljük és leolvassuk az A/D konverterből kapott értéket, majd a kettőt táblázatba mentjük.



12. ábra - Az erőmérő cella kalibrációjához készített segédeszköz

Az erőmérő cella kialakítása és mérete miatt nem egyszerű súlyokat helyezni rá, ezért a kalibrációhoz egy segédeszközt készítettem. A segédeszköz egy három lábon álló háromszög, melynek három lába közül kettő egyforma, a harmadik pedig hegyes és annyival rövidebb, hogy amikor ez az erőmérő cellára szerelt lemez pozicionáló furatába van állítva, a háromszög egyenesen álljon. Abban az esetben, ha a terhelés a háromszöget a közepén éri, egyenletesen oszlik el a három láb között. Ennek elérésére egy olyan laminált lapot készítettem és ragasztottam a háromszögre, melyen koncentrikus körök vannak, így a kalibrációhoz használt súly könnyen középre helyezhető.

Második lépésként készítettem egy egyszerű LabVIEW programot, amely az erőmérő cella adatait beolvassa, kiírja és grafikonon is ábrázolja. Az Arduino kiolvassa az A/D konverter által küldött adatokat, majd továbbítja a számítógép felé, ahol egy LabView felületen jelenítem meg őket. A mérőcellából jövő nyers adatok zajjal terheltek, ezért hogy kisimítsam a jelet, az utolsó húsz adatból mozgó átlagot számoltatok a programmal, az így

kapott jel már nem zajos. A mérések során használt program esetén 10 pontból készíttem a mozgó átlagot, mert ott cél, hogy a kijelzett számérték és a képernyőn megjelenő ábra megfelelően gyorsan kövesse a valóságban bekövetkező változásokat. A kalibrációs folyamat során ezzel szemben statikus terhelést alkalmaztam, így a cél a zaj minimalizálása volt, ezért nagy mintaelemszámú szűrést alkalmaztam.



13. ábra - A szenzor kalibrálására készített program

A 13. ábra mutatja az elkészített program felhasználói felületét. Az ábrán azt az átmenetet láthatjuk, amikor egy nagyobb súlyt helyezek a mérőbéllyegre. A zöld keresztek jelölik a szenzor pillanatnyi adatait, a piros vonal pedig a simított értéket. Megfelelően hosszú idő eltelte után ez beáll egy jó közelítéssel állandónak mondható értékre, ezt felül középen egy kijelzőn jelenítettem meg.

A kalibrációs folyamat során egy Excel táblázatot készítettem, melybe feljegyeztem a háromszögre helyezett súlyt, és a hozzá tartozó nyers adatokat.

A kalibrációt két különböző súlykészlettel végeztem el.



14. ábra - Az erőmérő cella kalibrációjához használt súlyok

Először egy mérőpoharat helyeztem a háromszögre, feljegyeztem az üres állapotában kapott adatokat, majd különböző, ismert mennyiségű vizet töltöttem bele, és az így kapott adatokat is feljegyeztem. Mivel a víz sűrűsége jó közelítéssel 1 kg/dm^3 , ezért megfelelőnek tűnt a kalibráció elvégzéséhez. A mérőpoháron az osztások 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 és 600 ml-nél voltak, így egy finom osztású skálát kaptam, viszonylag kis lépésközzel, egy kis tartományon.

A második módszeremhez egy súlyzókészletet használtam. A háromszöget ugyanúgy megtartottam, majd a súlyzókészletből összeállított különböző nagyságú súlyokat helyeztem rá. A súlyzókat összesen hatféleképpen tudtam összerakni, így 1.25, 2.5, 3.3, 5, 6.25 és 7.7 kg-nál tudtam mérni.

Az összes eredményt egy Excel táblázatba jegyeztem fel. Különvettem az első és a második mérés adatait, mindkettőből diagramot készítettem, majd ezeket összehasonlítottam.

6.2. A mérések kiértékelése és a kapott adatok feldolgozása

Az adatok tárolásához és kiértékeléséhez az alábbi táblázatokat készítettem:

5. táblázat - A kalibrációs folyamat során végzett mérések eredményei

Kis tömeggel (vízzel) való mérések											
Állapot/terhelés	Szám	Teljes terhelő tömeg [kg]	Terhelés ami a bélyegre kerül	Mutatott érték ha a nullát kivonjuk	A tömeg az adatokból visszaszámolva	A nullánál lévő adattal korrigálva	A bélyegen lévő összes tömeg	A háromszög és a pohár tömegét kivonva	Százalékos hiba	Az eltérés kilogrammban	
Üresen	8619750	-	-	-8200	-0.0635	-0.0716	0,0000	-	-	-	
Rajta van a háromszög	8624480	-	-	-3470	-0.0222	-0.0303	0,1239	-	-	-	
Rajta van a mérőpohár	8627950	0	0.00	0	0.0081	0.0000	0,2148	-	-	-	
50ml	8628440	0,05	0,02	490	0,0124	0,0043	0,2276	0,0128	74,3%	-0,0372	
100ml	8630500	0,1	0,03	2550	0,0304	0,0223	0,2816	0,0668	33,2%	-0,0332	
200ml	8634290	0,2	0,07	6340	0,0635	0,0554	0,3809	0,1661	17,0%	-0,0339	
300ml	8638280	0,3	0,10	10330	0,0983	0,0902	0,4854	0,2706	9,8%	-0,0294	
400ml	8642470	0,4	0,13	14520	0,1349	0,1268	0,5952	0,3804	4,9%	-0,0196	
500ml	8646530	0,5	0,17	18580	0,1704	0,1622	0,7015	0,4867	2,7%	-0,0133	
600ml	8649760	0,6	0,20	21810	0,1986	0,1904	0,7861	0,5713	4,8%	-0,0287	
Nagy tömeggel (súlyzókkal) mért értékek											
Állapot/terhelés	Szám	Teljes terhelő tömeg [kg]	Terhelés ami a bélyegre kerül	Mutatott érték ha a nullát kivonjuk	A tömeg az adatokból visszaszámolva	A nullánál lévő adattal korrigálva	A bélyegen lévő összes tömeg	A háromszög tömegét kivonva	Százalékos hiba	Az eltérés kilogrammban	
Üresen	8619750	-	-	-4730	-0.0658	-0.0444	0,0000	-	-	-	
Rajta van a háromszög	8624480	0	0,00	0	-0.0214	0,0000	0,1333	0,0000	-	-	
1,25kg	8670380	1,25	0,42	45900	0,4097	0,4311	1,4266	1,2933	-3,5%	0,043286	
2,5kg	8717450	2,5	0,83	92970	0,8518	0,8732	2,7528	2,6195	-4,8%	0,119537	
3,75kg	8762950	3,75	1,25	138470	1,2792	1,3005	4,0348	3,9016	-4,0%	0,151553	
5kg	8804250	5	1,67	179770	1,6671	1,6884	5,1985	5,0652	-1,3%	0,065228	
6,25kg	8848640	6,25	2,08	224160	2,0840	2,1053	6,4492	6,3160	-1,1%	0,065967	
7,5kg	8890770	7,5	2,50	266290	2,4797	2,5010	7,6363	7,5030	0,0%	0,003029	

A kalibrációhoz először meg kellett határoznom a 0 terheléshez tartozó értéket. Mivel a mérést az első esetben úgy hajtottam végre, hogy a háromszög és a mérőpohár is folyamatosan rajta volt az eszközön, azt vettem 0 értéknek, amikor a mérőpohár rajta volt a háromszögön, de üres volt. A második esetben azt az állapotot neveztem 0-nak, amikor az üres háromszög terhelte a berendezést. Erre azért volt szükség, mert a háromszög, illetve a

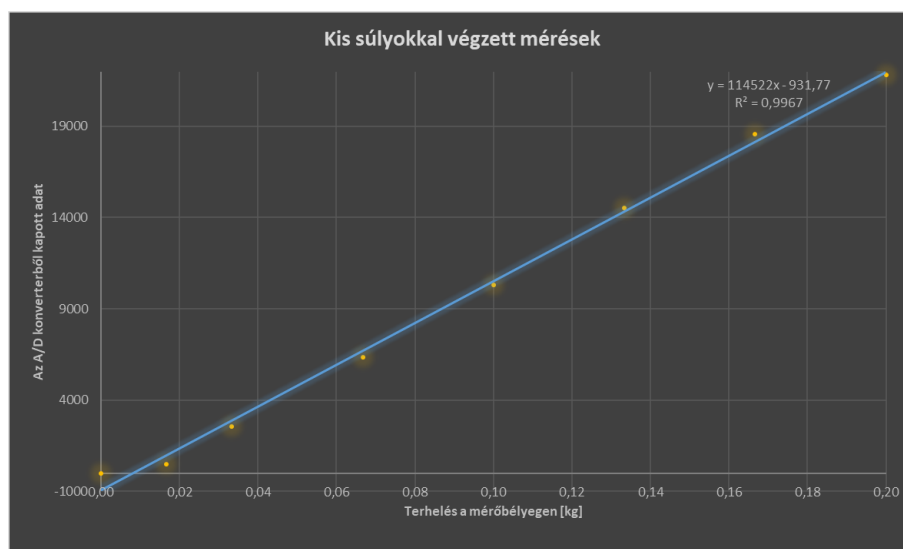
mérőpohár tömege ismeretlen volt, így amennyiben a terheletlen eszközt vettem volna 0 értéknek, az összes ráhelyezett súlyhoz még hozzá kellett volna adni egy ismeretlen értéket. Ezzel a módszerrel azonban fel tudtam venni egy megfelelő kalibrációs egyenest, ami alapján utólag kiszámítottam a mérőpohár és a háromszög tömegét.

Mivel lineáris az összefüggés az eszközre helyezett tömeg és a mutatott érték között, az eljárás nem torzítja a mérési eredményt, a kalibrációs egyenest csupán el kell tolni, hogy a terheletlen eszközhöz képesti valós adatokat mutasson.

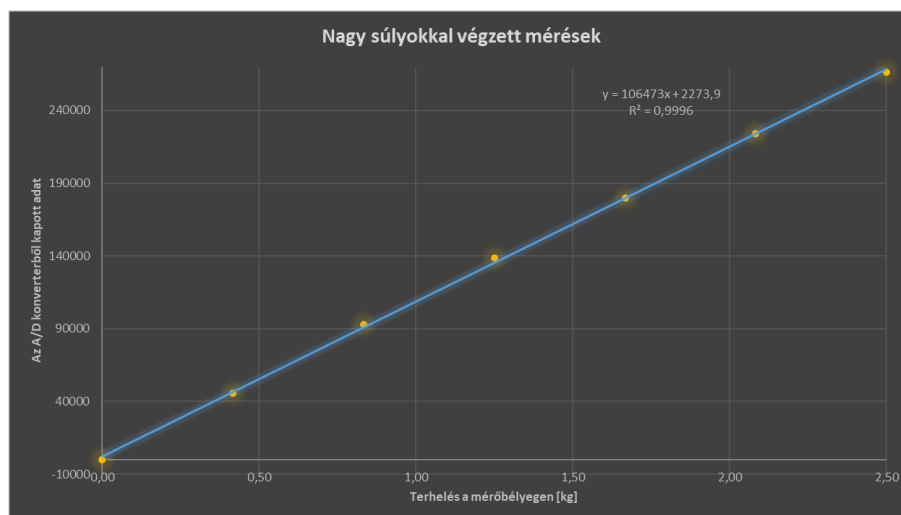
A következő lépésben a súlyt elosztottam hárommal, hiszen a háromszög alakú lap miatt csak a harmada jut az erőmérő cellát terhelő lábra.

Ezután a nulla (a mérőpohár esetén az üres mérőpohár, a súlyok esetén az üres lap) terheléshez tartozó értéket kivontam minden értékből.

A mért adatok alapján elkészíthettem a grafikonokat, amik megmutatják az összefüggést a terhelő tömeg és az erőmérő cella által mutatott érték között:



15. ábra - A vízzel végzett mérések alapján készített egyenes



16. ábra - A súlyzókkal végzett mérések alapján készített egyenes

A diagramokon látszik, hogy az összefüggés a vártan megfelelően lineáris. A pontokra trendvonalat illesztettem, melynek az illeszkedését is kiírtattam. A trendvonal illeszkedése a kis súlyokkal történő mérés esetén is jónak mondható (0,9967), de a nagyobb súlyokkal történő mérés esetén az illeszkedés még pontosabb (0,9996), ebből sejthető volt, hogy ez az egyenlet jobb eredményt fog adni, a későbbi számításaim során ez be is bizonyosodott.

Az $y = mx + b$ alakú egyenletet x -re rendezve ($x = (y - b) / m$ alakra alakítva) visszaszámolhattam, hogy az az egyenlet alapján az erőmérő adatai mekkora súlynak felelnek meg.

A képletbe a terheletlen erőmérő bélyeg adatait behelyettesítve a várt 0 eredmény helyett a trendvonal tökéletlen illeszkedése miatt nem nullát kaptam, ezért az itt kapott értékkel korrigáltam az összes adatot.

Ekkor már megkaptam a felvett nullához képest az igazi nulla (a terheletlen bélyeg) értékét, ez mindkét súlykészlettel történő mérés esetén a várakozásoknak megfelelően egy negatív szám lett. Ezt kivonva és hárommal az egészet megszorozva (a háromlábú tartó miatt) megkaptam, hogy a nullához képest mekkora súly terheli a berendezést, ez minden esetben működik, akkor is, amikor csak az üres háromszög van a berendezésen, és akkor is mikor a háromszög és a mérőpohár, így azoknak a tömege is meghatározható.

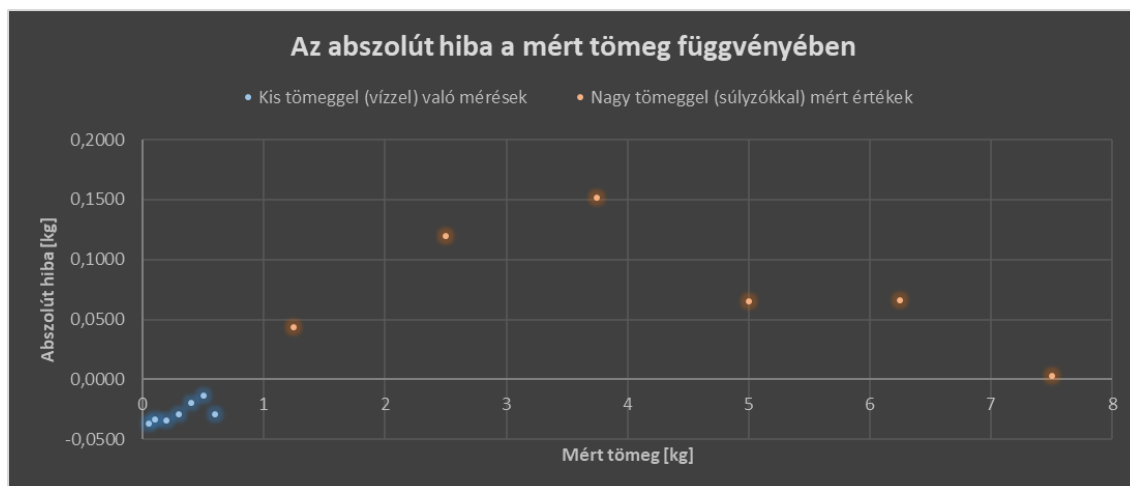
Ezekre az alábbi eredményeket kaptam:

6. táblázat - A kalibrációhoz használt eszközök tömege

	Kis súlyokkal végzett mérés	Nagy súlyokkal végzett mérés	Átlag
A háromszög tömege [kg]	0,124	0,133	0,1285
A mérőpohár tömege [kg]	0,0909	-	-

Ezután az összes mérési eredményből kivontam az adott mérésnél a nullpont eltolásához szükséges eszközök tömegét (a háromszög, illetve a háromszög és a mérőpohár együtt). Így megkaptam, hogy a kapott adatokból az általam meghatározott egyenlettel visszaszámolva mekkora lehetett az egyes esetekben a bélyegre helyezett súly.

Az így kapott adatokból és az eredeti adatokból kiszámoltam a köztük lévő eltérést, majd diagramon ábrázoltam:



17. ábra - A mérőbélyeg kalibrációjának abszolút hibája

Az ábra alapján úgy tűnik, hogy a kis tömeggel történt mérések pontosabbak, de az abszolút hiba számításánál megfelelőbb módszer a százalékos hiba számítása, mely megmutatja, hogy mekkora az eltérés a terheléshez viszonyítva.



18. ábra - A mérőbélyeg kalibrációjának százalékos hibája

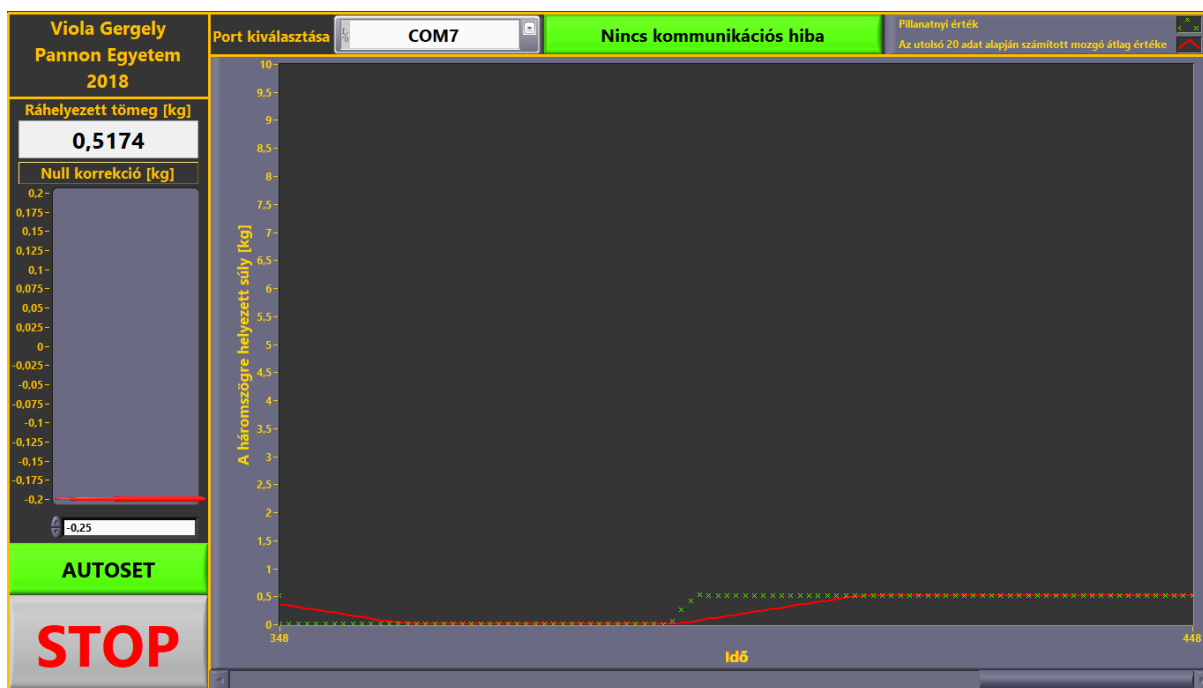
Az ábrán látható, hogy a nagyobb tömegekkel (a súlyzókészlettel) végzett mérések esetén jóval kisebb a százalékos hiba. Ezért, az adatsor nagyobb tartományon történő eloszlása miatt, és az illesztett trendvonal jobb illeszkedése miatt az ezekre az adatokra illesztett egyenest használtam fel a LabView kódوم készítésénél.

A nyers adatok kilogrammá alakítását az alábbi összefüggéssel írhatjuk le:

$$\text{Kilogramm} = \frac{\text{Nyersadat} - 8619750 - 2273,9}{106473} \quad 30$$

6.3. A hitelesítéshez készített LabVIEW kód

Miután a nyers adat és a terhelő tömeg közötti összefüggést meghatároztam, készítettem egy LabVIEW programot, amely mint egy mérleg működik az előbbi összefüggés alapján, tehát a háromszögre egy mérendő tárgyat helyezve meghatjuk annak tömegét. A mérés indítása után először a háromszöget helyezzük a helyére, majd nyomjuk meg az „autoset” gombot. Ekkor megtörténik a nullázás, ez a terhelés lesz a kiindulási helyzet, ami a 0 kg terhelésnek felel meg, a program is 0 kg-t fog mutatni. Ezután helyezzük el a súlyt középen, majd várjunk, amíg a program által mutatott érték megáll (a hosszú zajszűrési idő miatt ez pár másodperc). Ekkor a kezelőfelületről leolvashatjuk a ráhelyezett tárgy tömegét.



19. ábra – 0,5kg-os súly mérésének eredménye

A méréshez egy 0,5 kg-os súlyt helyeztem a háromszögre, majd megvártam, amíg a kijelző állandó értéket mutatott. A 0,5 kg-os súlyt 0,5174 kg-nak mértem, ez nagyon jó pontosság, bőven elég a kívánt feladatom elvégzésére.

6.4. A blokkolási nyomaték kalibrációja

Az ABS működésének teszteléséhez szükség van egy blokkoló kerék emulálására. Különböző helyzetekben különböző az a fékező nyomaték, amelynél a kerék blokkol. Ahhoz, hogy az ABS működését különböző nyomatéktartományokban vizsgálhassuk, olyan berendezés szükséges, amelynél a tárcsa állítható módon, különböző féknyomaték esetén blokkol.

Az általam készített eszköznél a blokkolás a villanymotor lefojtását jelenti. A villanymotor által kifejthető nyomaték leginkább a motoráramtól függ, amely pedig a motor kapcsaira adott feszültségtől. A mikrokontrollerrel kiadott PWM jel kitöltési tényezőjének növelése egyenértékű a motorvezérlő vezérlő jelének növelésével. A vezérlő jel növelése esetén az áramkör kimenő feszültsége is nagyobb lesz, a motor tehát nagyobb erőt képes kifejteni, mielőtt blokkolna.

Olyan összefüggést kellett találnom, amely megmutatja, hogy a mikrokontrollerrel milyen jelet kell küldennem a motorvezérlőnek, hogy a megfelelő fékező nyomaték esetén blokkoljon a féktárcsa. Az összefüggés meghatározásához a mikrokontroller kimenő jelét fokozatosan növeltem, majd kézzel állóra fékeztem a tárcsát, és ekkor leolvastam a kifejtett fékező nyomatékot. A mérések alapján az alábbi grafikont készítettem:



20. ábra - Az ABS kalibrációja

Az adatpontokra egyenest illesztettem, majd kiírtam az egyenletét, így meghatározhattam, hogy mekkora PWM jelhez mekkora maximálisan kifejthető nyomaték tartozik. Mivel a kezelőfelületen az elérni kívánt nyomatékot adjuk meg, ezt az összefüggést is át kell rendezni $x = (y - b) / m$ alakra.

$$PWM = \frac{Nyomaték + 4,2338}{0,373}$$

31

Így a kezelőfelületen beállított nyomaték értékből a LabVIEW program kiszámítja, hogy a mikrokontrollernek milyen üzenetet kell küldenie ahhoz, hogy a motor a kívánt nyomatéknál blokkoljon. Az elérhető nyomaték így legfeljebb 90 Nm.

7. Próbamérések

A berendezés elkészülte után végeztem néhány mérést, annak igazolására, hogy a berendezés képes a tervezett feladatok ellátására. Három mérést fogok bemutatni, az első egy általános fékezés, a másik a fék karakterisztikájának felvétele, a harmadik pedig az ABS működés vizsgálata. A harmadik mérés esetén valódi ABS-el szerelt fék hiányában magam húztam be, engedtem vissza a fékkart a tárcsa blokkolásakor, így szimulálva az ABS működését.

7.1. Egyszerű fékezés esete

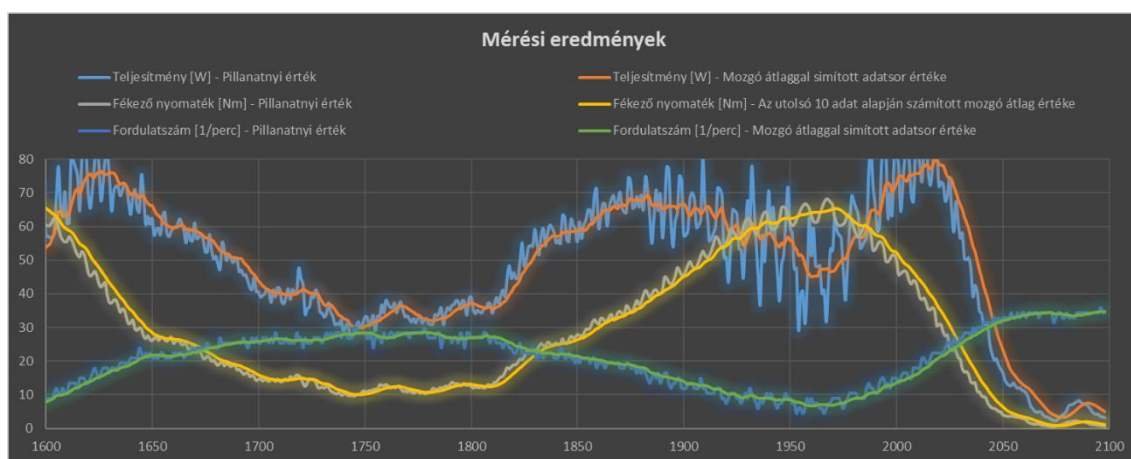
A berendezés működése legjobban egy egyszerű fékezés szimulálásával tesztelhető. Az elérhető fékező nyomatékot a maximálisra állítva és a fékkart húzva folyamatosan láthatjuk a fékező nyomaték és a fordulatszám értékét. A mérés során a kezelőfelületen az alábbihoz hasonló eredményeket láthatunk:



21. ábra - Egyszerű fékezés vizsgálata

Látható, hogy az értékek az elvárt tartományban mozognak, illetve ahogy a nyomaték növekedésekor csökken a fordulatszám. Az adatokat Excelbe exportálhatjuk, majd elemezhetjük. Ekkor attól függően, hogy milyen eredményekre vagyunk kíváncsiak, különböző diagramokat, kimutatásokat készíthetünk.

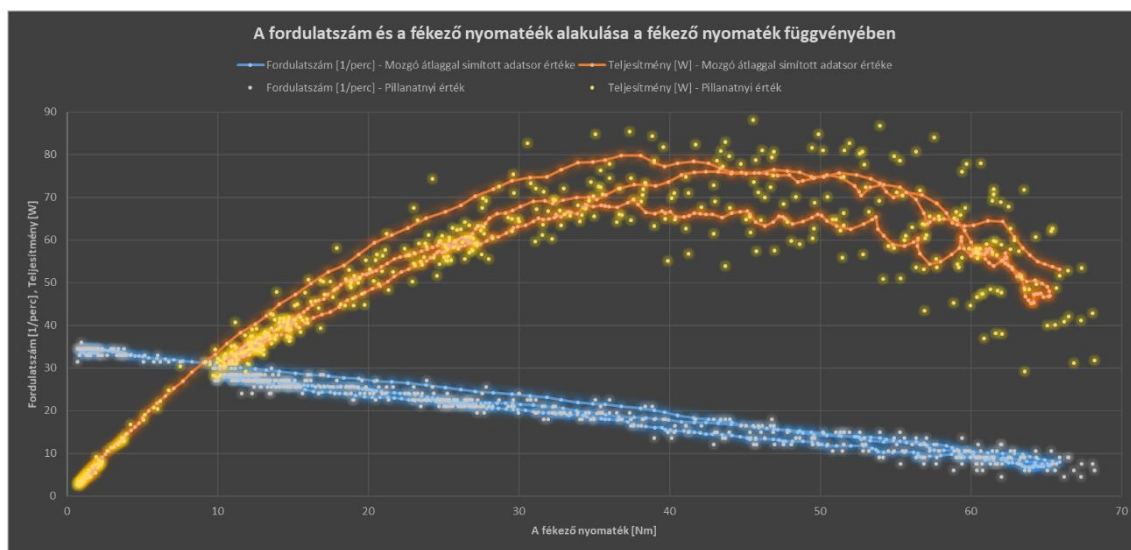
Az adatok legegyszerűbb, idő szerinti ábrázolása esetén, a vízszintes tengelyen az időt, a függőleges tengelyen pedig a három mért mennyiséget láthatjuk. Mivel számszerűleg hasonló értékűek, közös diagramon is ábrázolhatjuk őket.



22. ábra - Egyszerű mérés eredménye Excelben feldolgozva

Itt is látható, hogy a nyomaték csökkenésével arányosan nő a fordulatszám, valamint hogy a mozgó átlaggal történő zajszűrés mennyit változtat a mérés eredményén.

Amennyiben a vízszintes tengelyen a fékező nyomatékot ábrázoljuk, a függőlegesen pedig a másik két mennyiséget, az alábbi diagram készíthető:

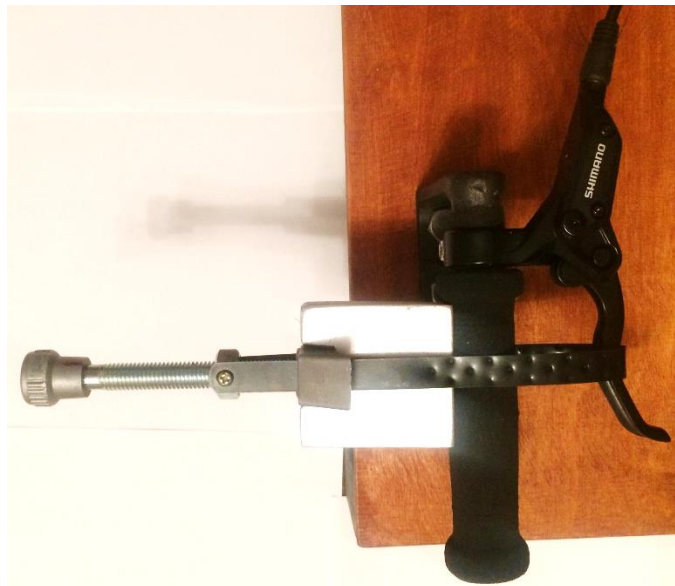


23. ábra - A fékező nyomaték, a fordulatszám és a teljesítmény

Az ábrán látható, hogy a fordulatszám a nyomaték növekedésével arányosan csökken. A teljesítmény azonban egy bizonyos ideig nő, majd csökkenni kezd. Mivel a berendezést egy DC motor hajtja, a görbék egy DC motor tipikus karakterisztikáját rajzolják ki.

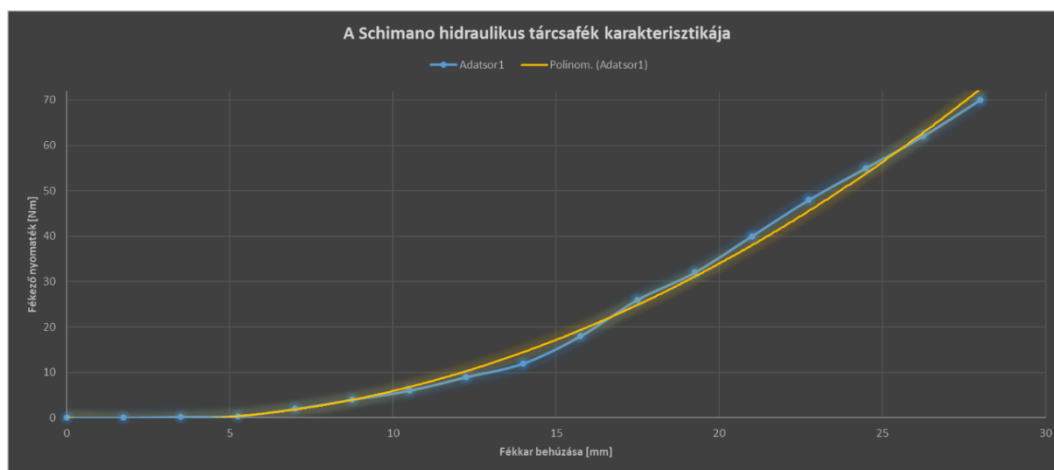
7.2. Fék karakterisztika mérése

Az általam épített mérőeszköz lehetőséget ad a fék karakterisztika felvételére is. A méréshez egy olajsűrű leszedőt és egy, annak rögzítéséhez készített tartót használtam.



24. ábra - A fék karakterisztika mérése

A karakterisztika felvételéhez a menetes rész végére egy jelölést készítettem, majd egész fordulatokat tekertem rajta és leolvastam a program által jelzett eredményeket. A menetes orsó menetemelkedése 2 mm volt, tehát minden teljes fordulat 2 mm behúzásnak felelt meg. A kapott adatokat feljegyeztem és diagramot készítettem belőlük.



25. ábra - A Shimano hidraulikus fék karakterisztikája

A féket kézzel húzva is érezhető, hogy egy darabig könnyű behúzni, majd felkeményedik, így exponenciális karakterisztikát sejttem, a diagramon látszik, hogy ez bebizonyosodott, a mért adatokra valóban jól illik egy exponenciális görbe. A mérés tartalmaz hibákat, lehetett volna pontosabban kivitelezni, többször ismételni, kisebb lépésközzel

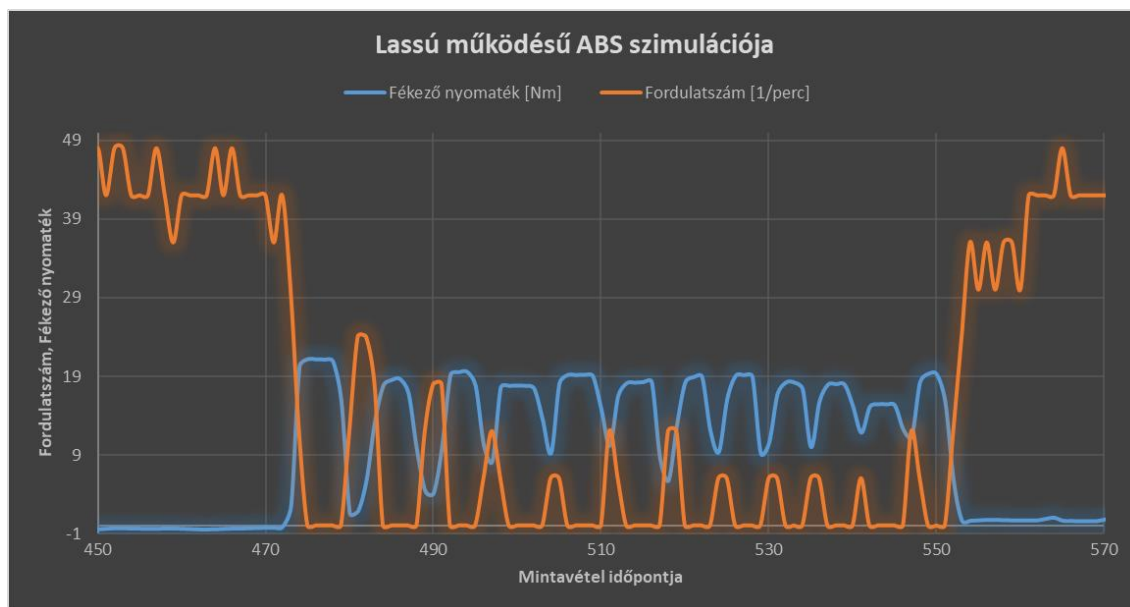
dolgozni, de a célom a méréssel nem a fék tökéletes karakterisztikájának felvétele volt, hanem a berendezés vizsgálata, annak bizonyítása, hogy alkalmas a feladatra.

7.3. ABS működés vizsgálata

A berendezés alkalmas az ABS-el szerelt fékek vizsgálatára. Ehhez arra van szükség, hogy az ABS számára valóságosnak tűnő környezetet teremtsen. Az ABS számára valóságos környezetnek tekinthető az az eset, amikor egy meghatározott mértékű fékező nyomaték esetén a tárcsa blokkol. Mivel a berendezésen nincs állítható csúszó tengelykapcsoló, ezt úgy érhetjük el, hogy a motort lefojtjuk. A kezelőfelületen előre beállított fékező nyomaték esetén fog a motor leállni. Az ABS vezérlő érzékeli, hogy a tárcsa leállt, így csökkenti a fékerőt. A csökkenő fékerő hatására a tárcsa újra forgásba jön, amit a vezérlő ismét érzékel, így növeli a fékerőt.

Ennek a szakszerű vizsgálatához szükségem lett volna egy működő, ABS-el szerelt fékre, mely sajnos nem állt rendelkezésemre, így a féket kézzel húztam, míg a tárcsa megállt, majd visszaengedtem, így utánózva egy ABS beavatkozást. A mérést többször is elvégeztem, két mérés eredményét mutatom be:

Lassú beavatkozás



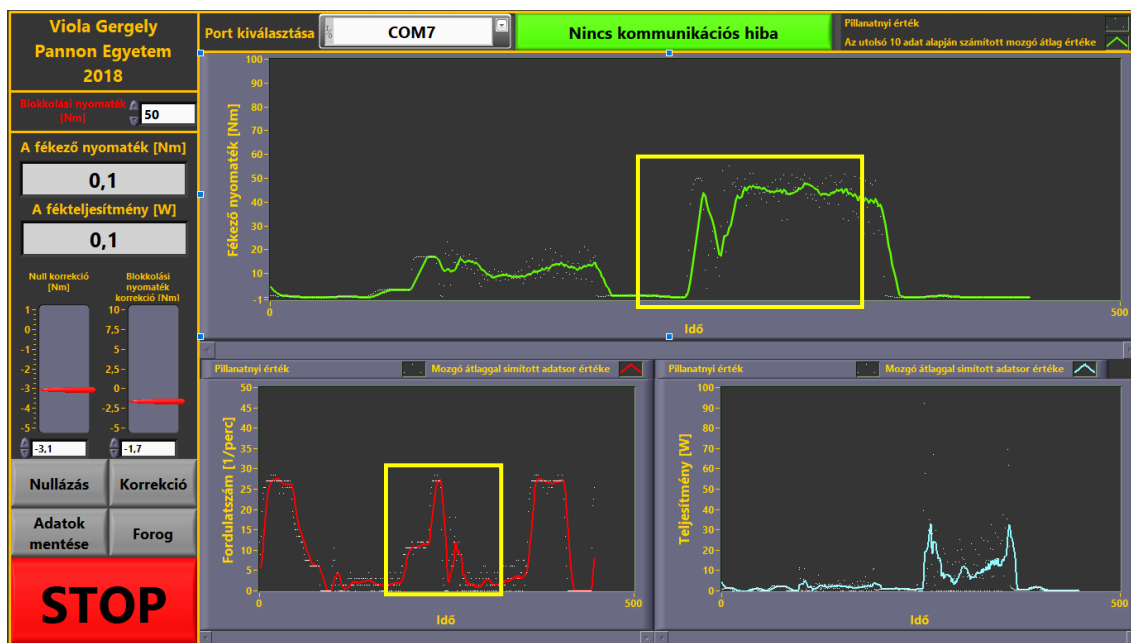
26. ábra - Kis fékező nyomaték és lassú ABS beavatkozás

Az első esetben a blokkolási nyomatékot 20 Nm-re állítottam, és a blokkoláskor a féket tovább húzva tartottam, visszaengedés után pedig egy kis ideig hagytam forogni a motort, mielőtt újra növeltem volna a fékerőt. A mérés alapján készített diagramon tisztán látszik, ahogy a fékerő eléri a beállított értéket, a tárcsa blokkol, amikor a féknyomaték csökken, a tárcsa újra forogni kezd.

Gyors beavatkozás

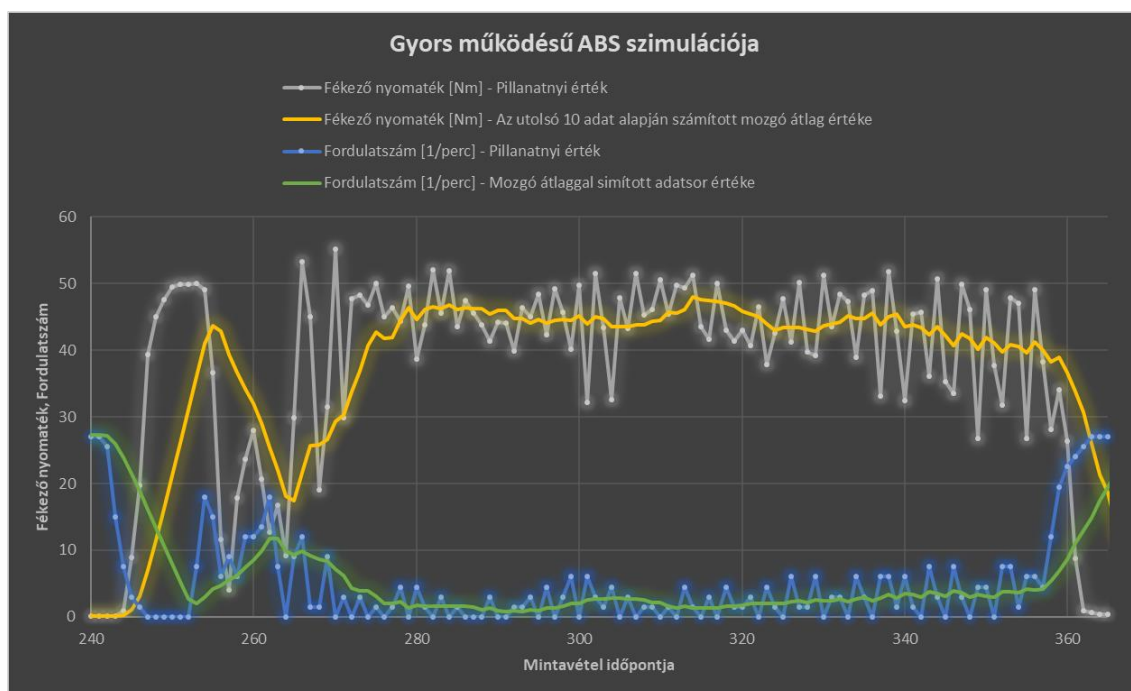
A második esetben a mérést nagyobb blokkolási nyomatékkal végeztem és a beavatkozás gyorsaságát is növeltem, így a diagramon látható eredmények kevésbé tiszták, de ez a viselkedés jobban közelíti egy valós ABS beavatkozás milyenségét.

A mérés során a LabVIEW program felhasználói felületén az alábbi képet láthatjuk:



27. ábra - A kezelői felület ABS fék vizsgálatakor

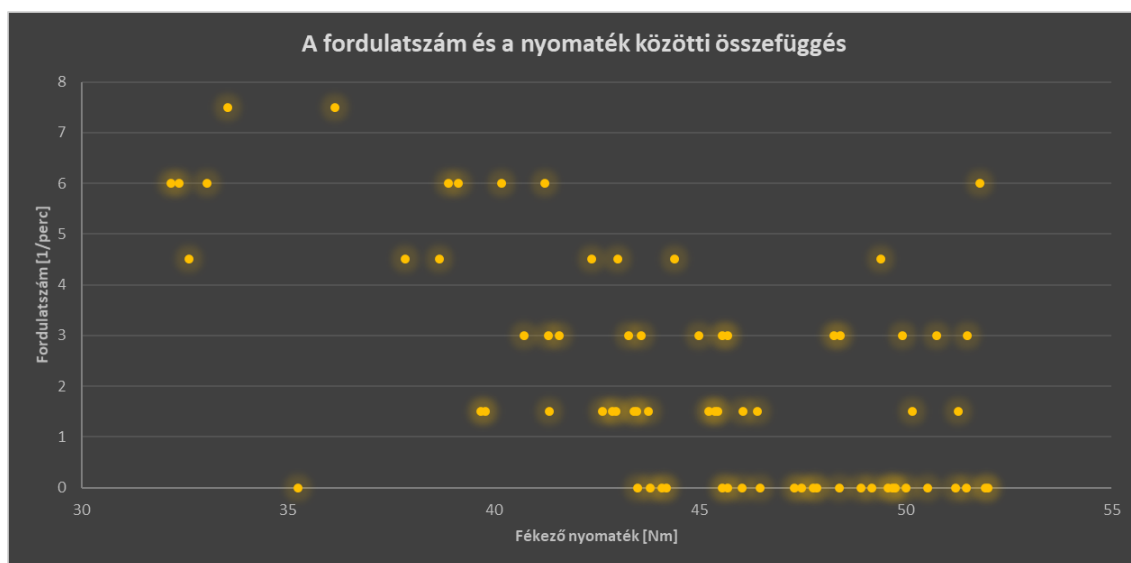
A felhasználói felületen láthatóak a mérés eredményei, de én a jobb elemezhetőség érdekében az Excel-be exportált adatok közül kiemeltem a sárga négyzettel jelölt részletet.



28. ábra - Nagyobb fékező nyomaték és gyors ABS beavatkozás

Az ábrán a fékező nyomaték és a fordulatszám pillanatnyi és mozgó átlaggal simított értékei is láthatóak. Látható, hogy az egyszerű féknyomaték mérésnél használt, jól működő átlagolási módszer itt nem megfelelő, mert túl lassan követi a jel változását. Az ABS-nek a tárcsa megállása után amilyen gyorsan lehet, be kell avatkoznia, tehát vagy a pillanatnyi érték, vagy valamilyen más szűrő algoritmussal szűrt adat alapján kell, hogy működjön.

A mért adatok alapján megvizsgáltam, hogy mennyire pontosan a beállított fékező nyomaték értékének elérésekor blokkol a tárcsa. Ennek megállapítására egy diagramot készítettem, mely megmutatja a fékező nyomaték és a fordulatszám közötti összefüggést az ABS beavatkozás közben.



29. ábra - A fordulatszám és a nyomaték közötti összefüggés

A diagram alapján látható, hogy a fékező nyomaték növekedésével csökken a fordulatszám, majd egy bizonyos érték elérése esetén a tárcsa blokkol. A blokkoláskor mért fékező nyomaték értékek szórnak beállított 50 Nm körül. Ennek oka lehet a szerkezet forgó részeinek pontatlansága, ütése, a motor felépítéséből adódó, különböző szögben megállított rotor esetén különböző kifejthető nyomaték, a felhasznált mérőeszközök pontatlansága, illetve az is, hogy a tényleges ABS beavatkozás helyett én mozgattam kézzel a fékkart.

8. Összefoglalás

A munka során megterveztem és megépítettem egy olyan berendezést, mely alkalmas a kerékpárokon használt tárcsafékek által kifejtett fékező nyomaték mérésére, illetve arra, hogy ABS-el szerelt rendszerek esetén olyan környezetet biztosítson, amelyben az ABS működése vizsgálható. A munka kezdetén megismertem a kerékpár fékezésének fizikáját, az ekkor fellépő erőket, nyomatékokat és az ezeket leíró egyenleteket, így ezeknek tudatában kezdtem a szilárdsági méretezésbe. A szerkezet egy acél vázra épül, melyen egy DC motor lánckerekes áttételen keresztül forgatja a féktárcsát. A féknyereg egy karral ellátott, egy csap körül elfordulni képes konzolra van rögzítve. A működés során a féknyereg szorítja a forgó tárcsát, így az igyekszik magával fordítani a nyeret és a tartó konzolját. A konzolt a rászertelt kar akadályozza az elfordulásban, melynek vége egy erőmérő cellát nyom. Az erőmérő adatait egy mikrokontroller beolvassa és továbbítja a számítógép felé. A mikrokontrollertől jövő adatokat a számítógépen egy LabVIEW program fogadja és dolgozza fel.

A berendezés megépítése és a szoftverek megírása után elvégeztem a szükséges kalibrációs folyamatokat, hogy a mért nyers adatokból valódi, a mérés szempontjából érdekes eredményeket számíthassak.

A berendezés a féknyomaték mérésén kívül alkalmas arra is, hogy az ABS működése szempontjából valóságosnak tűnő környezetet biztosítson. A különböző helyzetekben, különböző tapadási tényezők esetén történő fékezések során a megcsúszás különböző fékező nyomaték esetén következik be, ennek emulálására az eszköz kezelőfelületén beállítható, hogy a féktárcsa milyen fékező nyomaték esetén fékeződjön állóra.

Az eszköz működőképességének vizsgálatára elvégeztem néhány próbamérést, melyeknek eredményeit Excel táblázatba mentettem, diagramokat készítettem belőlük és a kapott eredményeket kiértékeltem. A kiértékelés során megállapítottam, hogy a mérés során fellépő erők, nyomatékok, fordulatszám értékek a vártaknak megfelelnek, a berendezés alkalmas a kitűzött feladat elvégzésére.

Irodalomjegyzék

- [1] BSc Clemens Oerter, DI Heinz Neuberger, Anton Sabo – Construction of a test bench for bicycle rim and disc brakes, University of Applied Sciences Technikum Wien, 2010
- [2] Dezamics Zoltán – Hidraulikus fékrendszerek felépítése, Nemzeti Szakképzési és Felnőttképzési Intézet, Budapest, 2008
- [3] Gunnar Olsson – Brake performance and stability for bicycles, SAFER &SVEA seminar „Vehicle Dynamics Challenges”, Göteborg, 2013.05.15
- [4] Dr. Szenté József – Görgős lánchajtás tervezése, Miskolci Egyetem, Miskolc, 2008
- [5] Dr. Tímár Imre – Műszaki mechanika I. Statika, Pannon Egyetemi Kiadó
- [6] Weinhoffer Krisztián – Az elektronikus ékfék vizsgálata véges elemes módszerrel, Pannon Egyetem, 2017
- [7] Balogh Levente: Control design of an Electro-mechanic Wedge Brake (EWB) for commercial vehicles. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 2011
- [8] Pordán Mihály: Az elektronikus ékes fék. Autótechnika, 2007/2
- [9] Vasily A. Ivanov, Beshah Ayalew: Adjustable electromechanical wedge brakes with reduced energy consumption. Proceedings of the ASME 2011 International Mechanical Engineering Congress & Exposition, 2011