

4.4. fejezet CSAPADÉKKÉPZÉS

Dr. Pécs Miklós
Dr. Fehér Csaba



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Csapadékképzés

Túlteltett oldatból amorf (rendezetlen szerkezetű) szilárd fázis leválasztása.

Ha rendezett a szerkezet = kristályosítás, lásd később.
Az amorf anyag sok szennyezést visz magával.

1. Túltelítés

2. A kicsapást mindig szilárd-folyadék elválasztás követi (szűrés/centrifugálás)

3. Visszaoldás: a kicsapás legyen reverzibilis, és a visszaoldott termék tartsa meg a biológiai aktivitását.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Csapadékképzés

A túltelítés létrehozása:

- Kiszózás (ionerősség növelése)
- Oldószeres kicsapás (polaritás csökkentése)
- Hőmérséklet-változtatás. Lehet:
 - emeléssel: fehérjék kicsapása/denaturálása
 - (bepárlás +) hűtéssel: mint a kristályosítáznál

Mindegyiknél: pH állítás → az izoelektromos pontra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

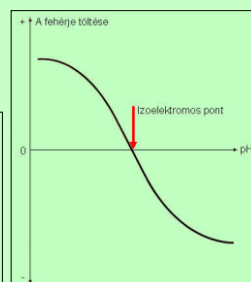
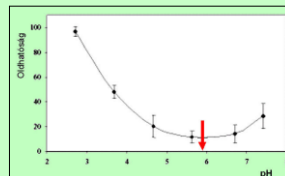
3

A pH hatása

A fehérjék töltése függ a pH-tól:

Ha a molekuláknak töltése van
→ taszítják egymást

Ha az eredő töltés megszűnik
→ könnyen összetapaszthatók



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Oldószeres kicsapás

Vizes oldathoz elegendő szerves oldószert (alkohol, aceton) adunk, ezzel az oldószer polaritása csökken. A poláris fehérjék oldhatósága csökken → kicsapódnak. Fokozatos adagolás esetén polaritási sorban válnak le (vérfehérjék Cohn féle frakcionálása →).

Fordítva: kicsapás/kristályosítás oldószerből vízzel. Apoláris anyagok (szteroidok, egyes antibiotikumok) oldószeres oldathoz vizet adunk, ezzel csapjuk ki a hatóanyagot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Oldószeres kicsapás

Irányelvek:

- Célszerű alacsony hőmérsékleten végezni, mert:
 - Csökken az oldhatóság, jobb a kihozatal
 - Csökken a denaturálódás
 - Lehet 0 °C alatt is végezni, mert az oldószer-víz elegyek fagyáspontja alacsony.
- Célszerű az ionerősséget alacsonyan (0,05-0,20) tartani (pufferolás kell, de a só növeli a polaritást)
- Hasonló fehérjék közül a nagyobb móltömegű csapódik ki először: pl. vérplazma fehérjékre:
 - aceton tf% = 1,8 - 0,12 * ln(móltömeg)
- Nem ideális oldatok, a fehérjék csökkentik egymás oldhatóságát

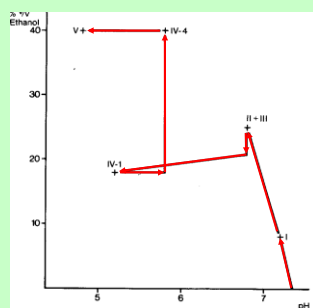


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Vérplazma frakcionálása etanollal

Cohn féle hideg etanolos eljárás (1946) a pH és az alkoholtartalom változtatásával lépésről lépésre csapja ki az egyes frakciókat



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Vérplazma frakcionálása etanollal

Frakció	Etanol %	pH	Fehérjék
I	8	7,2	Fibrinogén, Faktor VIII, Fibronectin, Komplement komponensek
II-III	25	6,9	IgG, IgA, IgM, Faktor II, VII, IX, X, globulinok
IV-1	18	5,2	α - és β -globulinok, AT-III, α 1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	α - és β -globulinok, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin (α - és β -globulinok)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Vérplazma frakcionálása etanollal

Előny:

- Egyszerű, olcsó anyagok, berendezések
- Sokszorosan ellenőrzött
- Léptéknövelhető
- Befertőződés esélye kicsi

Hátrány:

- Sok tiszta etanol kell (regenerálás energiaigényes)
- Egyes komponensek denaturálódnak
- Termékből etanol eltávolítás (liofilizálás, bepárlás, ultraszűrés, gélkromatográfia)
- Folyamatos hűtés (energiaigény)
- Szakaszos (centrifugálás – energiaigény)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Kiszózás

A kiszózás mechanizmusára többféle modell is létezik:

- Az oldószer polaritásának növelése (ellentétes az oldószeres kicsapással, az apoláris fehérjéket csapja ki).
- A hidrátburok elvonása (ionerősség és anyagi minőség is)
- A fehérjék ionpárokat képeznek a só ionjaival, erre formálisan felírható egy oldhatósági szorzat:

$$K = [\text{fehérje}][\text{NH}_4]^m[\text{SO}_4]^n$$

A só koncentrációjának növelésével az oldott fehérje koncentrációjának csökkennie kell \rightarrow kicsapódik



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Kiszózás

Irányelvek

Az ionok hatékonysága: Hofmeister sorozat:

most stabilizing strongly hydrated anions	most destabilizing weakly hydrated anions
citrate ³⁻ >sulfate ²⁻ >phosphate ²⁻ >F ⁻ >Cl ⁻ >Br ⁻ >I ⁻ >NO ₃ ⁻ >ClO ₄ ⁻	
N(CH ₃) ₄ ⁺ >NH ₄ ⁺ >Cs ⁺ >Rb ⁺ >K ⁺ >Na ⁺ >H ⁺ >Ca ²⁺ >Mg ²⁺ >Al ³⁺	
weakly hydrated cations	strongly hydrated cations

Vizsgáljuk meg az oldat és a csapadék sűrűségkülönbségét
Minél kevésbé hígítsunk a só hozzáadásánál (meleg, telített oldat, esetleg szilárd só).

Ipari méretben számít a só ára \rightarrow legyen olcsó

Legtöbbször az ammónium-szulfát a legjobb.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

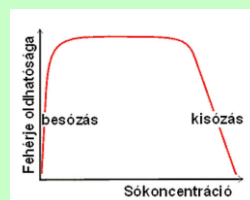
11

A sókoncentráció hatása



Általános modell:

$$\ln(\text{fehérje oldhatóság}) = K_1 - K_2 \cdot \text{sókoncentráció}$$



Specifikus kicsapószerkeket nukleinsavakra: sztreptomycin-szulfát, mangán-klorid, protamin-szulfát, poli-etilénimin



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Kicsapás hővel

= szelektív denaturálás → nem a terméket csapijuk ki, hanem a szennyezőt inaktíváljuk.

Példa: kétféle élesztő dehidrogenáz

Hődenaturálódásuk: $dP/dt = -kP$ $k = k_0 \exp(-E/RT)$

	20°C-on	50°C-on
$k_A = 5 \cdot 10^{57} \text{ sec}^{-1} \cdot \exp(380 \text{ kJ}/RT)$	$= 8,3 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
$k_B = 4,2 \cdot 10^{64} \text{ sec}^{-1} \cdot \exp(415 \text{ kJ}/RT)$	$= 4 \cdot 10^{-10}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$



Kicsapás hővel

10 perces hőkezelés után a maradék aktivitás (C/C_0):

	20°C-on	50°C-on
A	>0,999	0,91
B	>0,999	0,17

A B enzim eliminálható az A mellől.



A csapadékképzés mechanizmusa

Szakaszai:

1. Átkeverés
2. Gócképzés
3. Gócnövekedés (diffúzió által limitált)
4. Gócnövekedés (áramlás által limitált)
5. Aggregáció
6. Elválásztás

A csapadékképzés reprodukciója, léptéknövelése nehéz, mert lokálisan, a molekulák, részecskék felületén kell azonos feltételeket biztosítani: koncentrációk (túltelítés), anyagtranszportok



Átkeverés

A kicsapás kiváltása mindig valamilyen folyadék hozzáadásával történik. Ennek elkeveredése sohasem pillanatszerű. Az átkeveredési idő számítható:

$$t = \frac{l^2}{4D} \quad \text{ahol:}$$

l - a turbulens örvények átlagos mérete
 D - diffúziós állandó

Az örvény mérete:

$$l = \left(\frac{\rho v^3}{P/V} \right)^{1/4}$$

ρ – sűrűség v - viszkozitás
 P – teljesítmény V - térfogat



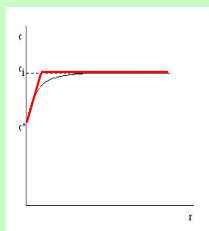
Gócképződés - gócnövekedés

A csapadékképződésnél a gócképződés gyors és spontán (ellentétben a kristályosítással).

Diffúziós gócnövekedés: A góc elég kicsi ahhoz, hogy Brown mozgást végezzen → tiszta diffúzió → Fick II. törvény

$$\frac{dc_i}{dt} = k(c_i - c^*)^2$$

$$K = 8 \cdot \pi \cdot d \cdot D \cdot N$$



Gócnövekedés

Áramlási gócnövekedés:

A góc túl nagy ahhoz, hogy a hómogzs megmozdítsa → a turbulens áramlás pótolja a felületen a molekulákat.

$$\frac{dc_i}{dt} = k(c_i - c^*)^2$$

Ez is másodrendű, de a k értelme más:

$$k = 2/3 \cdot \alpha \cdot N \cdot d^2 \cdot [(P/V)/(\rho \cdot v)]^{1/2}$$

α – tapadási faktor

$[(P/V)/(\rho \cdot v)]^{1/2}$ - sebesség-gradiens a folyadékban



Aggregáció

A növekvő góccok összetapadása előnyös → könnyebben ülepednek.

A koaguláció – flokkuláció szavakat többféle értelemben használják, ezért itt destabilizációról és aggregációról lesz szó.

Destabilizáció: a stabil kolloid megbontása, az egymást taszító részecskék töltésének lecsökkentése.

Aggregáció: a részecskék összetapadása

Mindezt különböző anyagok hozzáadásával lehet kiváltani.



Felületi töltések

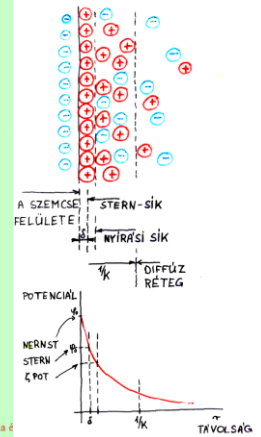
A kolloid részecskék felületén töltések vannak → erre az ellentétes töltésű ionokból kettősréteg rakódik le.

A felület → Nernst potenciál

Stern sík → Stern potenciál

Nyírás sík → ζ potenciál

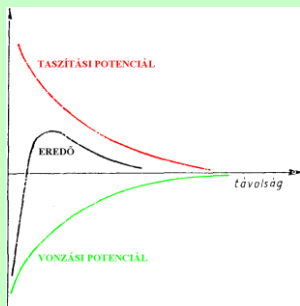
Diffúzió réteg határa



Aggregáció sóadagolással

A töltött rétegek taszító erőt, a van der Waals kölcsönhatások vonzást generálnak. Az eredő egy potenciálgát, amin át kell lépni az összekapcsolódáshoz.

Erős elektrolitok (ásványi sók) összenyomják a felületi rétegeket → meredekebb a taszítási görbe → kisebb lesz a potenciálgát



Sweep floc coagulation

= párhuzamos csapadékképzés. Kémiai reakcióval nagy felületű, hidroxid típusú csapadékot választunk le, amelyek pelyhei eltávolítják a kolloid szemcséket.

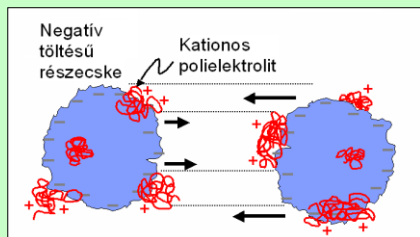
Leggyakrabban $Al(OH)_3$, $Mg(OH)_2$, $Fe(OH)_3$ csapadék, fémsó adagolása + pH állítás.

Az idegen anyag szennyezi a csapadékot → derítésre jó



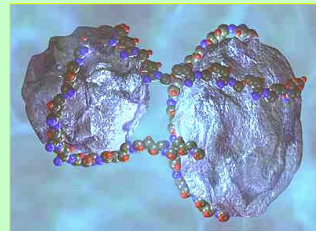
Aggregáció ionpárképzéssel

A felületi töltéseket leárnéykolhatjuk megfelelő ellenionokkal, vagy ellentétes töltésű polielektrolitokkal.



Hídképző molekulák

Hosszú láncú, tapadásra képes molekulák egyszerre több részecske felületén is kötődhetnek, ezzel „összehorgonyozzák” a szemcséket.



A keverés intenzitása

A csapadékképzés különböző szakaszaiban eltérő keverési intenzitás szükséges.

- | | |
|---------------------------|-------------------|
| 1. Átkeverés | intenzív keverés |
| 2. Gócképzés | nincs hatása |
| 3. Diffúziós gócnövekedés | nincs hatása |
| 4. Áramlási gócnövekedés | mérsékelt keverés |
| 5. Aggregáció | csak kavará |

Az egyes szakaszok nem különülnek el élesen, párhuzamosan is zajlanak, ezért a szokásos keverési profil: fokozatosan lassuló keverés, kezdetben intenzív, a végén csak ülepedésgátló.

