

4.4. fejezet CSAPADÉKKÉPZÉS

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



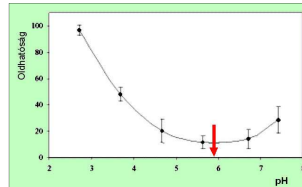
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

Csapadékképzés

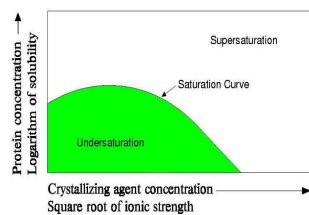
Túltelített oldatból amorf (rendetlen szerkezetű) szilárd fázis leválasztása.

Ha rendezett a szerkezet = kristályosítás, lásd később.
Az amorf anyag sok szennyeződést 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

Oldószeres kicsapás

Vizes oldathoz elegyedő 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 oldatához vizet adunk, ezzel csapjuk ki a hatóanyagot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Csapadékképzés

A túltelítés létrehozása:

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

Mindegyiknél: pH állítás → az izoelektromos pontra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

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% = $1,8 - 0,12 \cdot \ln(\text{móltömeg})$
- 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

Kisózás

Irányelvek
Az ionok hatékonysága: Hofmeister sorozat:

most stabilizing strongly hydrated anions	most destabilizing weakly hydrated anions
$\text{citrate}^{3-} > \text{sulfate}^{2-} > \text{phosphate}^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^-$	
weakly hydrated cations	strongly hydrated cations
$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Al}^{3+}$	

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 → legyen olcsó
Legtöbbször az ammónium-szulfát a legjobb.

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

A sókoncentráció hatása

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

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kiszózás

A kiszózás mechanizmusára többféle modell is létezik:

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

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

A só koncentrációjának növelésével az oldott fehérje koncentrációjának csökkennie kell → kicsapódik

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kicsapás hővel

= szelektív denaturálás → nem a terméket csapjuk 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
$k_A = 5 \cdot 10^{57} \text{ sec}^{-1} \cdot \exp(380\text{kJ}/RT)$	$= 8,3 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
$k_B = 4,2 \cdot 10^{64} \text{ sec}^{-1} \cdot \exp(415\text{kJ}/RT)$	$= 4 \cdot 10^{-10}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

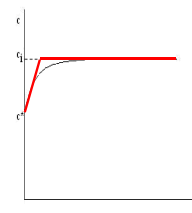
Gócképződés - gócnövekedés

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

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

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

A csapadékképzés mechanizmusa

Szakaszai:

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Gócnövekedés

Áramlási gócnövekedés:

A góc túl nagy ahhoz, hogy a hőmozgás 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:

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

α – tapadási faktor

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Átkeverés

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

$$t = \frac{l^2}{4D}$$

ahol:
l - a turbulens örvények átlagos mérete
D - diffúziós állandó

Az örvény mérete:

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Aggregáció

A növekvő gócek összetapadása előnyös → könnyebben ülepednek.

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

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

Aggregáció: a részecskék összetapadása

Mindezt különböző anyagok hozzáadásával lehet kiváltani.



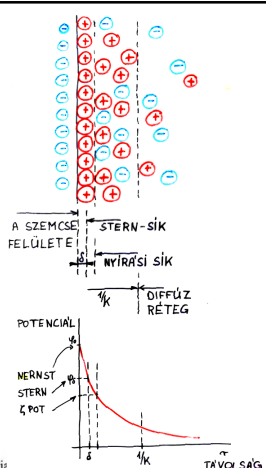
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Felületi töltések

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

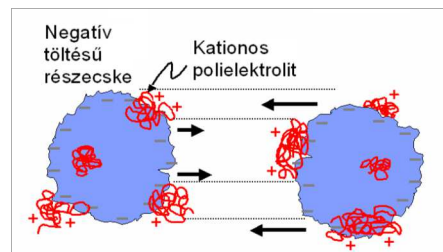
A felület → Nernst potenciál
Stern sík → Stern potenciál
Nyírási sík → ζ potenciál
Diffúzió réteg határa



BME Alkalmazott Biotechnológia

Aggregáció ionpárképzéssel

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



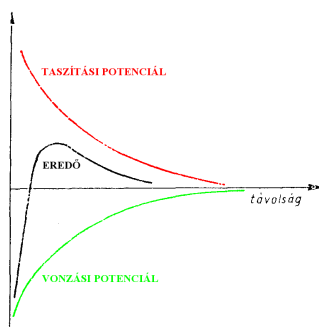
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

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

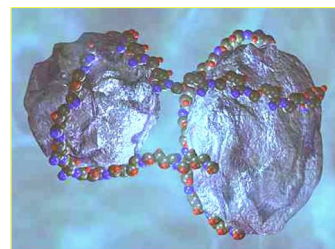


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

Hídképző molekulák

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Sweep floc coagulation

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

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

Az idegen anyag szennyezi a csapadékot → derítésre jó



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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 kavaráss |

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24