

## 4.4. fejezet CSAPADÉKKÉPZÉS

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Csapadékképzés

Túltelített 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:

- 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

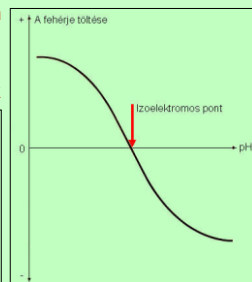
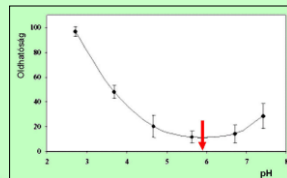
3

### 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 elegyedő szerves oldószert (alkohol, acetone) 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:
  - acetone tf% =  $1,8 - 0,12 \cdot \ln(\text{móltömeg})$
- Nem ideális oldatok, a fehérjék csökkentik egymás oldhatóságát

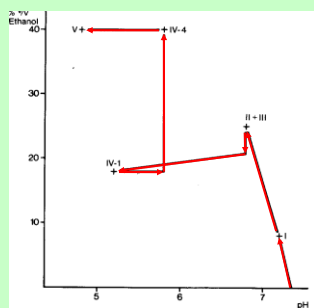


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

## 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	$\alpha$ - és $\beta$ -globulinok, AT-III, $\alpha$ 1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	$\alpha$ - és $\beta$ -globulinok, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin ( $\alpha$ - és $\beta$ -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)



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 hidrárburok 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  $\rightarrow$  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 <sup>3-</sup> >sulfate <sup>2-</sup> >phosphate <sup>2-</sup> >F <sup>-</sup> >Cl <sup>-</sup> >Br <sup>-</sup> >I <sup>-</sup> >NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> >ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	
N(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> <sup>+</sup> >NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> >Cs <sup>+</sup> >Rb <sup>+</sup> >K <sup>+</sup> >Na <sup>+</sup> >H <sup>+</sup> >Ca <sup>2+</sup> >Mg <sup>2+</sup> >Al <sup>3+</sup>	
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

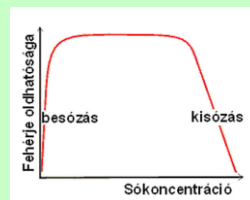
11

## 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 csapjuk ki, hanem a szennyezést 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. Elválasztás

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:

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

$\rho$  – sűrűség       $v$  - viszkozitás  
 $P$  – teljesítmény       $V$  - térfogat



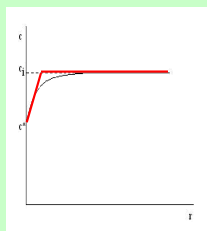
## Gócképződés - gócnövekedés

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

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

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

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



## 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:

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

$\alpha$  – tapadási faktor

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



## Aggregáció

A növekvő göcök 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

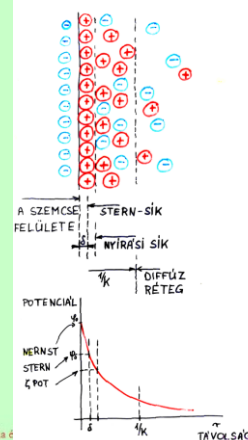
A kolloid részecskék felületén töltések vannak → erre az ellenértékes töltésű ionokból kettősréteg rakódik le.

A felület → Nernst potenciál

Stern sík → Stern potenciál

Nyírás sík → ζ potenciál

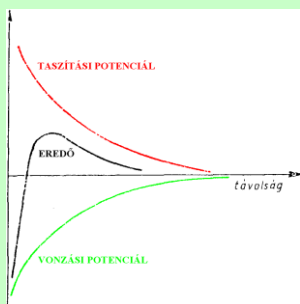
Diffúzió réteg határa



## 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.

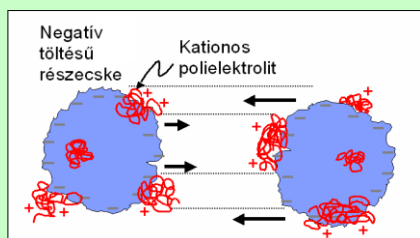
Leggyakrabban  $Al(OH)_3$ ,  $Mg(OH)_2$ ,  $Fe(OH)_3$  csapadék, fémsó adagolása + pH állítás.

Az idegen anyag szennyezi a csapadékot → derítésre jó



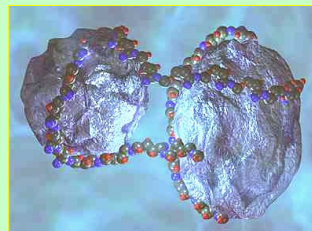
## Aggregáció ionpárképzéssel

A felületi töltéseket leárnyékolhatjuk 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 kavarási     |

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

