

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.

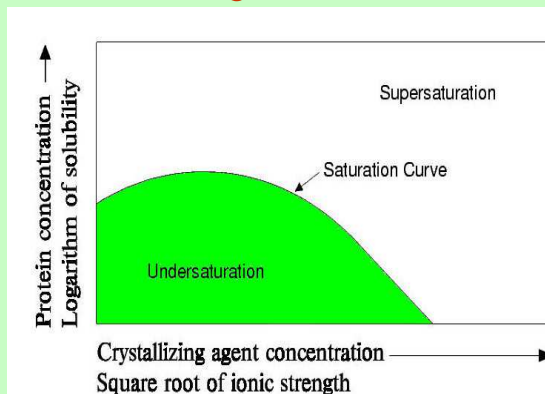
Ha rendezett a szerkezet = kristályosítás, lásd később.

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 tútelítés 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

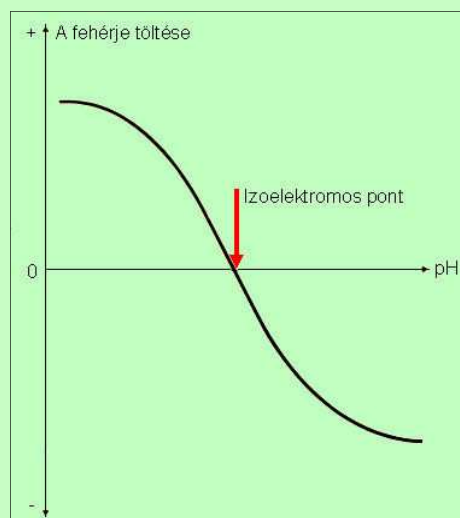
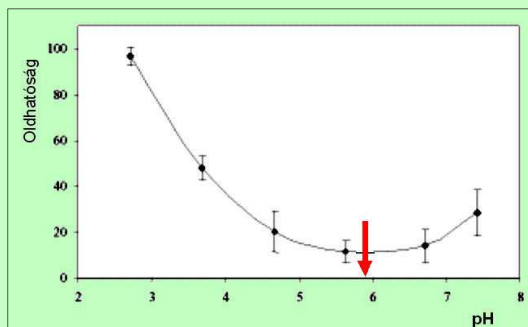
3

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, 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.



Oldószeres kicsapás

Irányelvek:

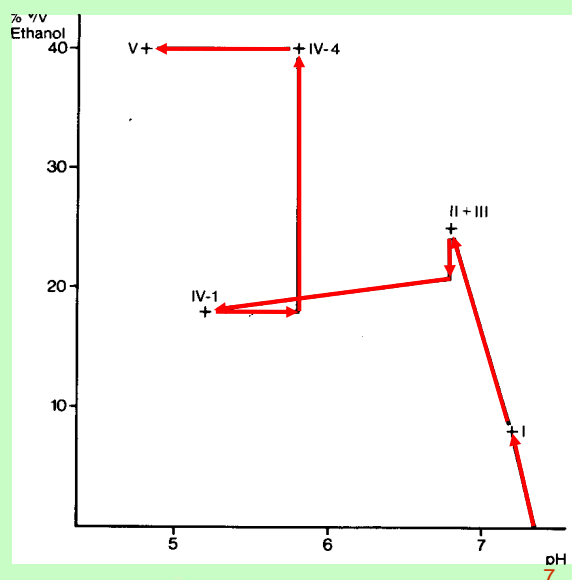
- Célszerű alacsony hőmérsékleten végezni, mert:
 - Csökken az oldhatóság, jobb a kihozatal
 - Csökken a denaturálódás
 - Lehet 0 °C alatt is végezni, mert az oldószer-víz elegyek fagyáspontja alacsony.
- Célszerű az ionerősséget alacsonyan (0,05-0,20) tartani (pufferolás kell, de a só növeli a polaritást)
- Hasonló fehérjék közül a nagyobb móltömegű csapódik ki először: pl. vérplazma fehérjékre:

$$\text{aceton tf\%} = 1,8 - 0,12 * \ln(\text{móltömeg})$$
- Nem ideális oldatok, a fehérjék csökkentik egymás oldhatóságát



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

Kisózás

A kisózás mechanizmusára többféle modell is létezik:

1. Az oldószer polaritásának növelése (ellentétes az oldószeres kicsapással, az apoláris fehérjéket csapja ki).
2. A hidrátburrok elvonása
3. 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



Kisózás

Irányelvek

Az ionok hatékonysága: Hofmeister sorozat:

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

Legtöbbször az ammónium-szulfát a legjobb.

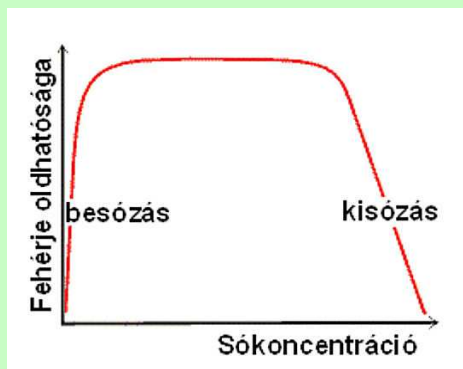


A sókoncentráció hatása



Általános modell:

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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

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:

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

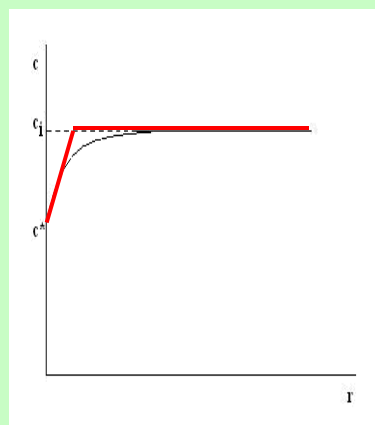
Gócképződés - gócnövekedés

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

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Gócnövekedés

A GÓCNÖVEKEDÉS
RECHAMZIBUSA

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:

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

α – tapadási faktor

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Aggregáció

A növekvő gócok 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Felületi töltések

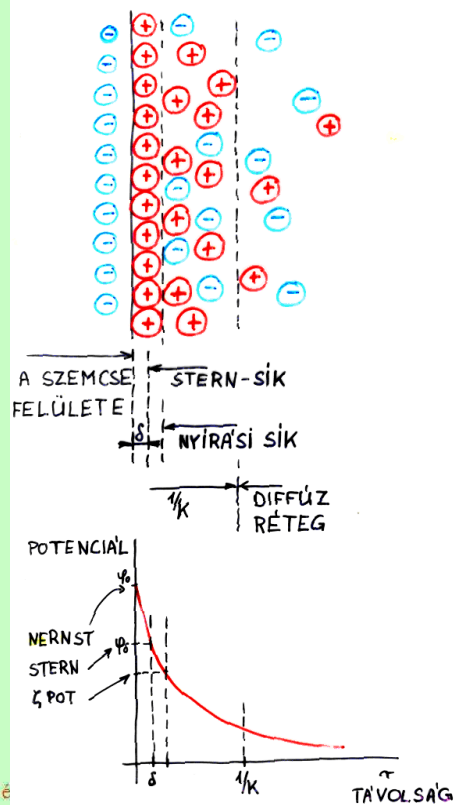
A kolloid részecskék felületén töltések vannak \rightarrow erre az ellentétes töltésű ionokból kettősréteg rakódik le.

A felület \rightarrow Nernst potenciál

Stern sík \rightarrow Stern potenciál

Nyírási sík \rightarrow ζ potenciál

Diffúzió réteg határa

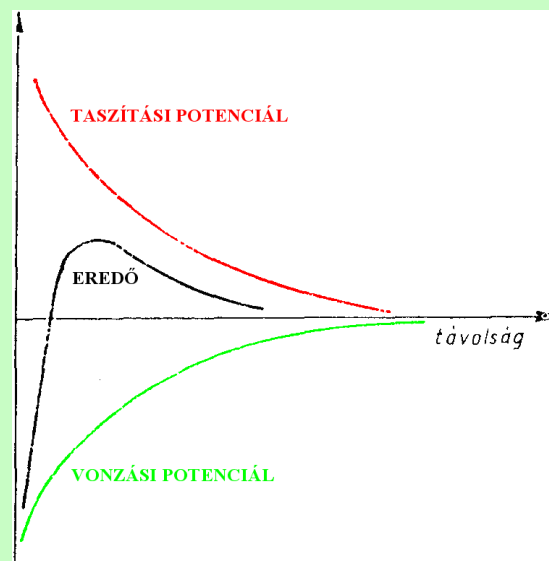


BME Alkalmazott Biotechnológia és

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 \rightarrow meredekebb a taszítási görbe \rightarrow kisebb lesz a potenciálgát



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

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

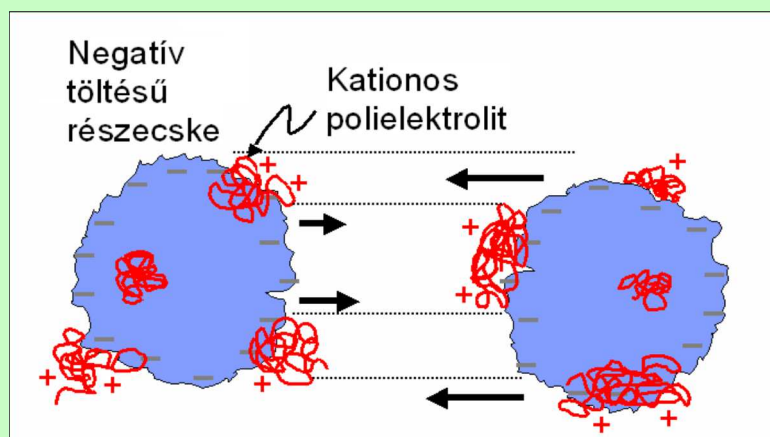


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

Aggregáció ionpárképzéssel

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

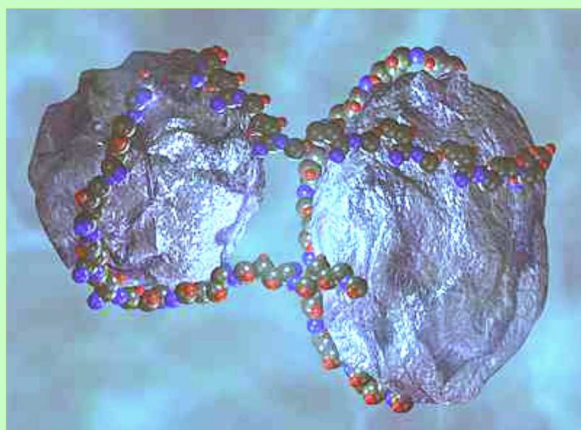


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Hídképző molekulák

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



flash.swf



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

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 kaválás |

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24