

4.4. fejezet

CSAPADÉKKÉPZÉS

Dr. Pécs Miklós
Dr. Fehér Csaba



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
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.



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

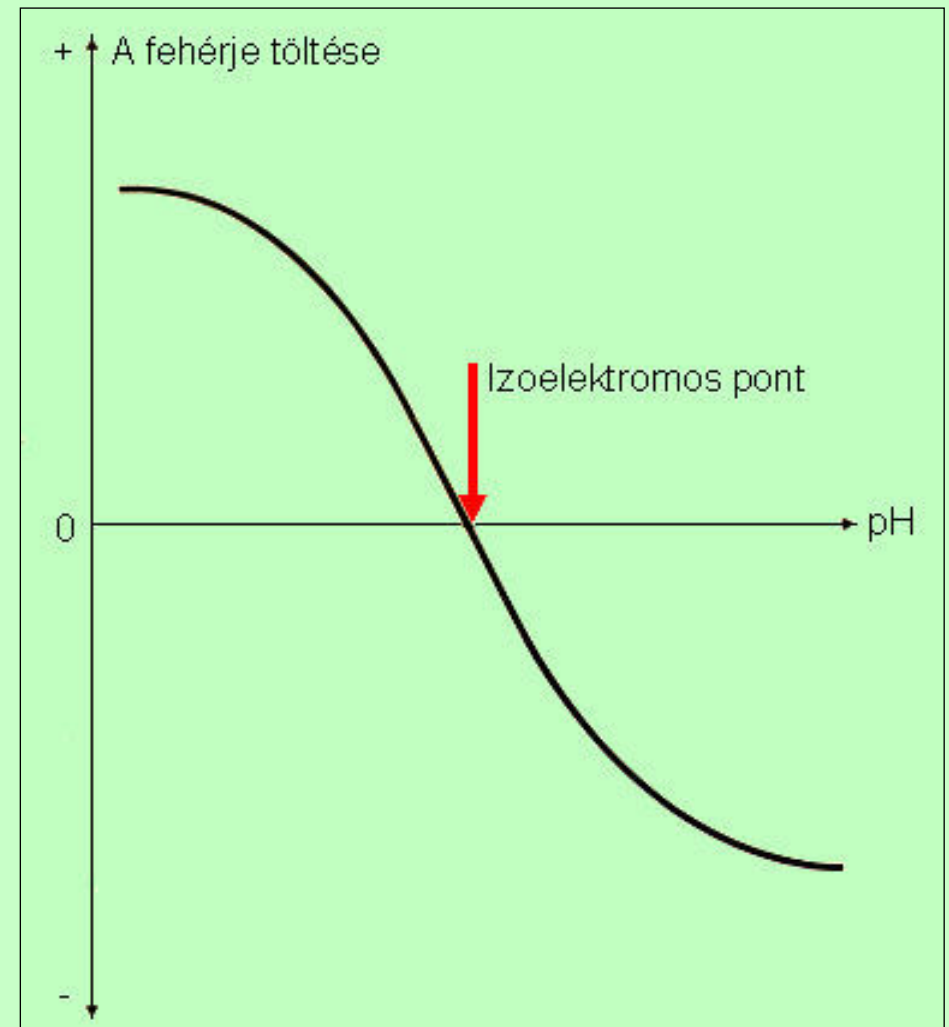
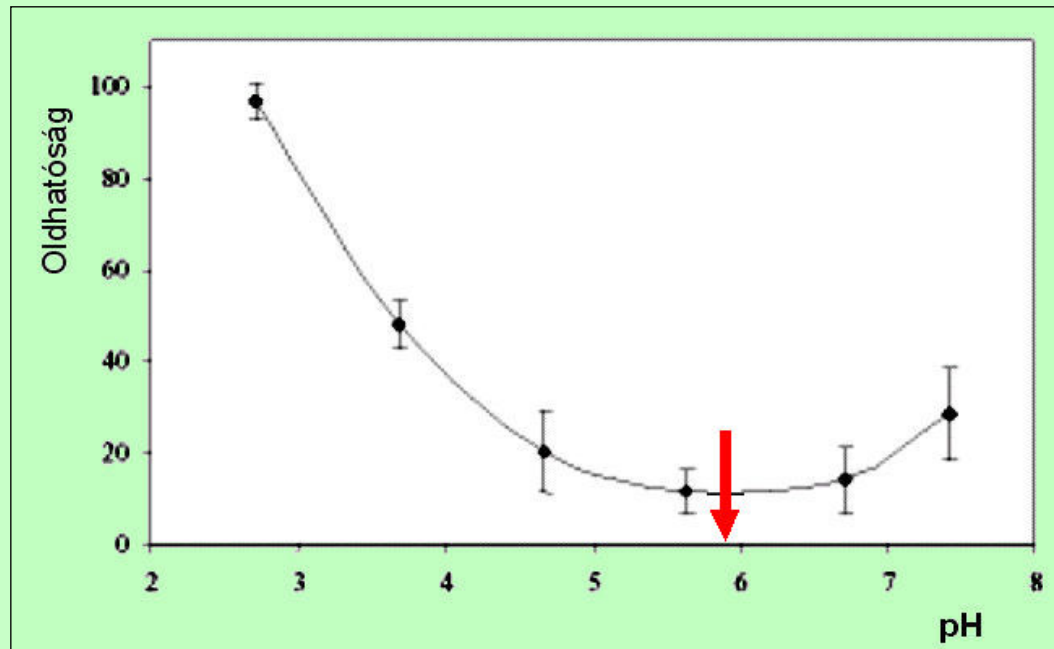


A pH hatása

A fehérjék töltése függ a pH-tól:

Ha a molekuláknak töltése van
→ taszítják egymást

Ha az eredő töltés megszűnik
→ könnyen összehapataszthatók



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

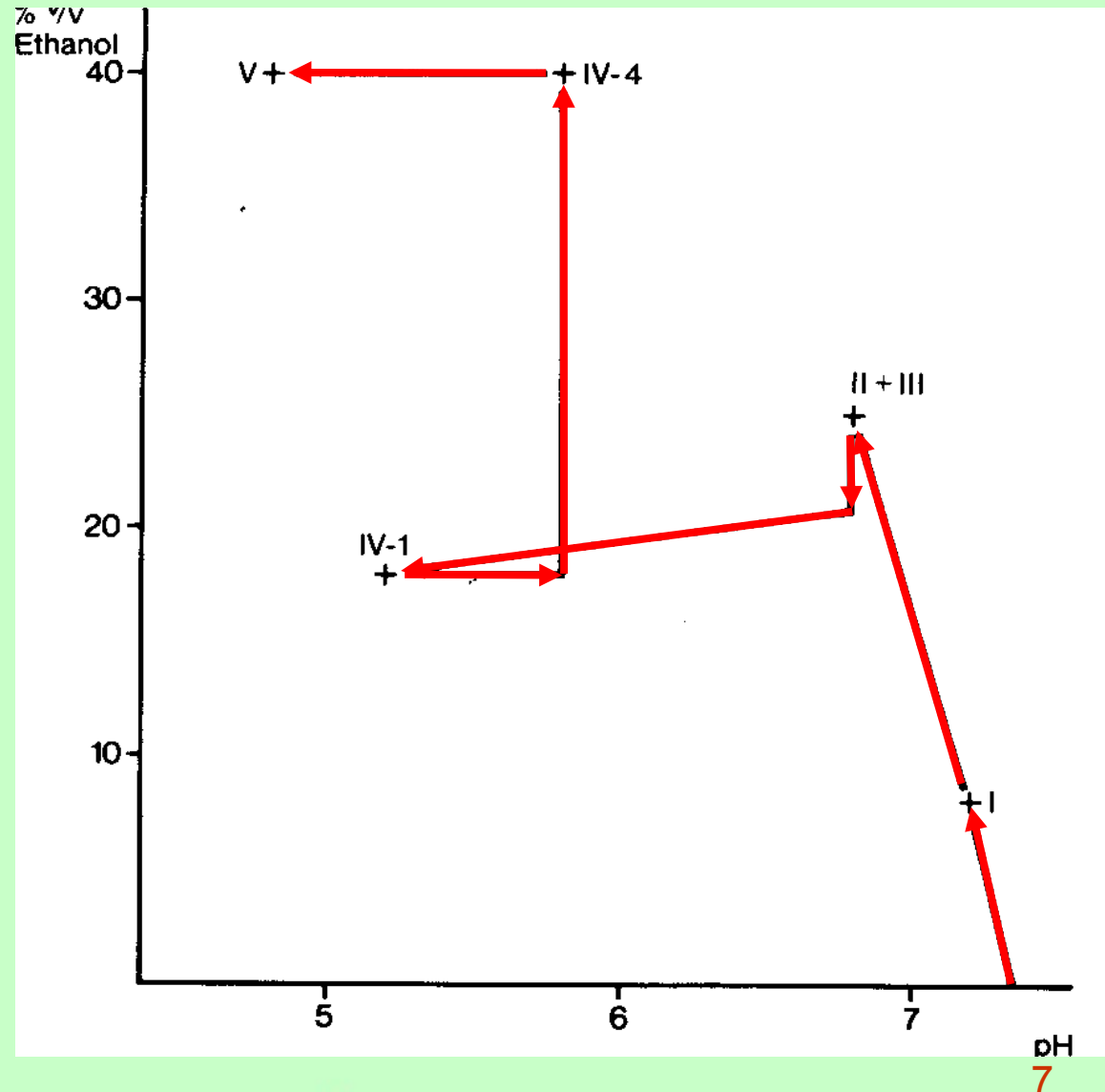
Irányelvek:

- 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



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, α1-antitrypsin, IgM
IV-4	40	5,8	α- és β-globulinok, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin
V	40	4,8	Albumin (α- és β-globulinok)



Vérplazma frakcionálása etanollal

Előny:

Egyszerű, olcsó anyagok, berendezések

Sokszorosán 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)



Kisózás

A kisózás mechanizmusára többféle modell is létezik:

1. Az oldószer polaritásának növelése (ellentétes az oldószeres kicsapással, az apoláris fehérjéket csapja ki).
2. A hidrátburok elvonása (ionerősség és anyagi minőség is)
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



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.

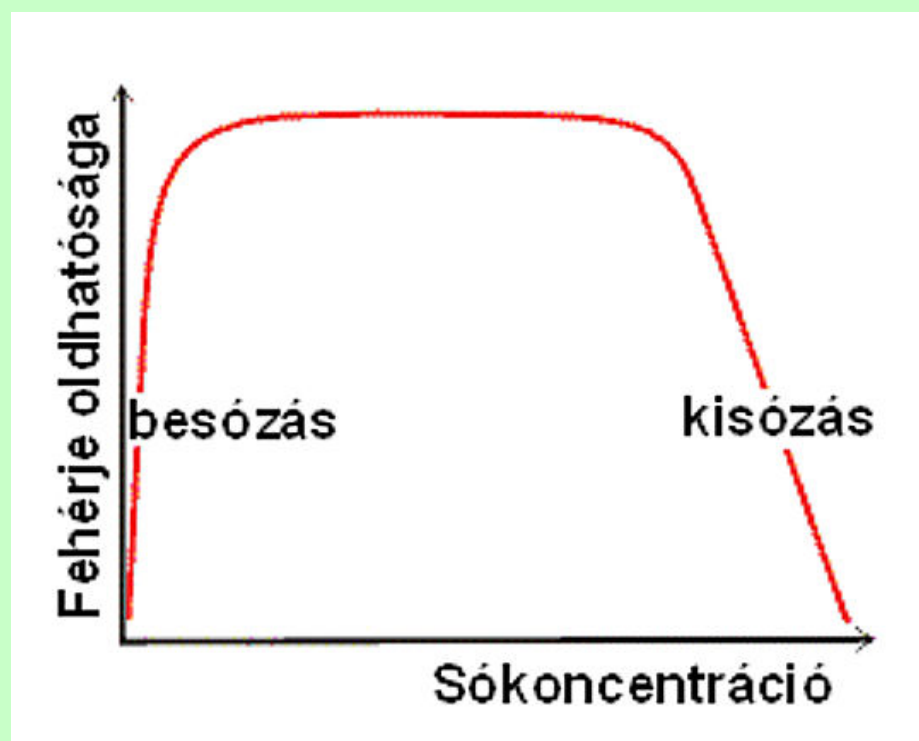


A sókoncentráció hatása



Általános modell:

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



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



Kicsapás hővel

= szelektív denaturálás → nem a terméket csapjuk ki, hanem a szennyezést inaktiváljuk.

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:

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

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

ν - viszkozitás

P – teljesítmény

V - térfogat



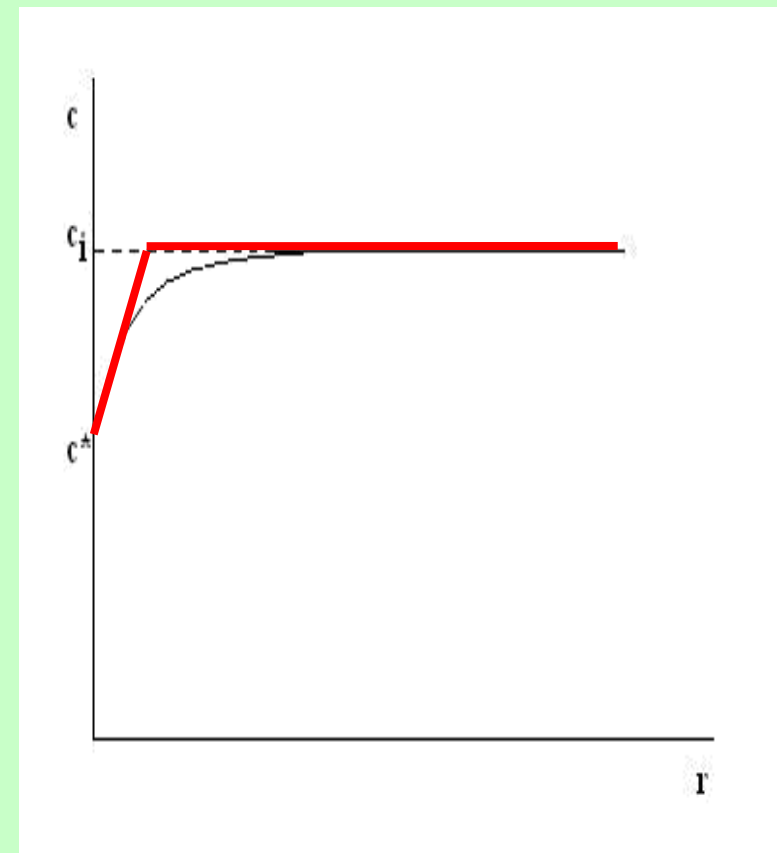
Gócképződés - gócnövekedés

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

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

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



Gócnövekedés

Áramlási gócnövekedés:

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

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

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

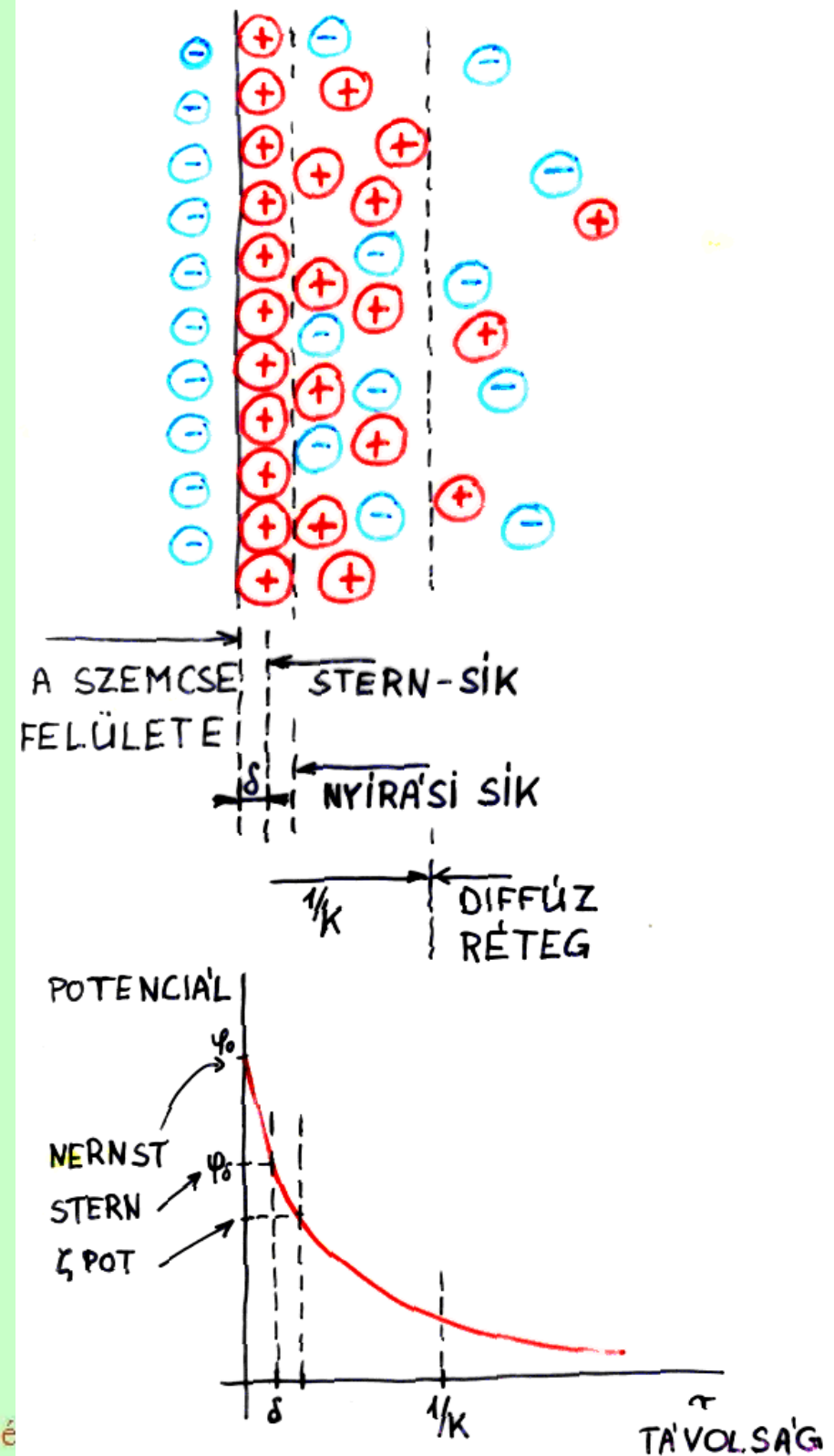
A kolloid részecskék felületén töltések vannak → erre az ellentétes töltésű ionokból kettősréteg rakódik le.

A felület → Nernst potenciál

Stern sík → Stern potenciál

Nyírás sík → ζ potenciál

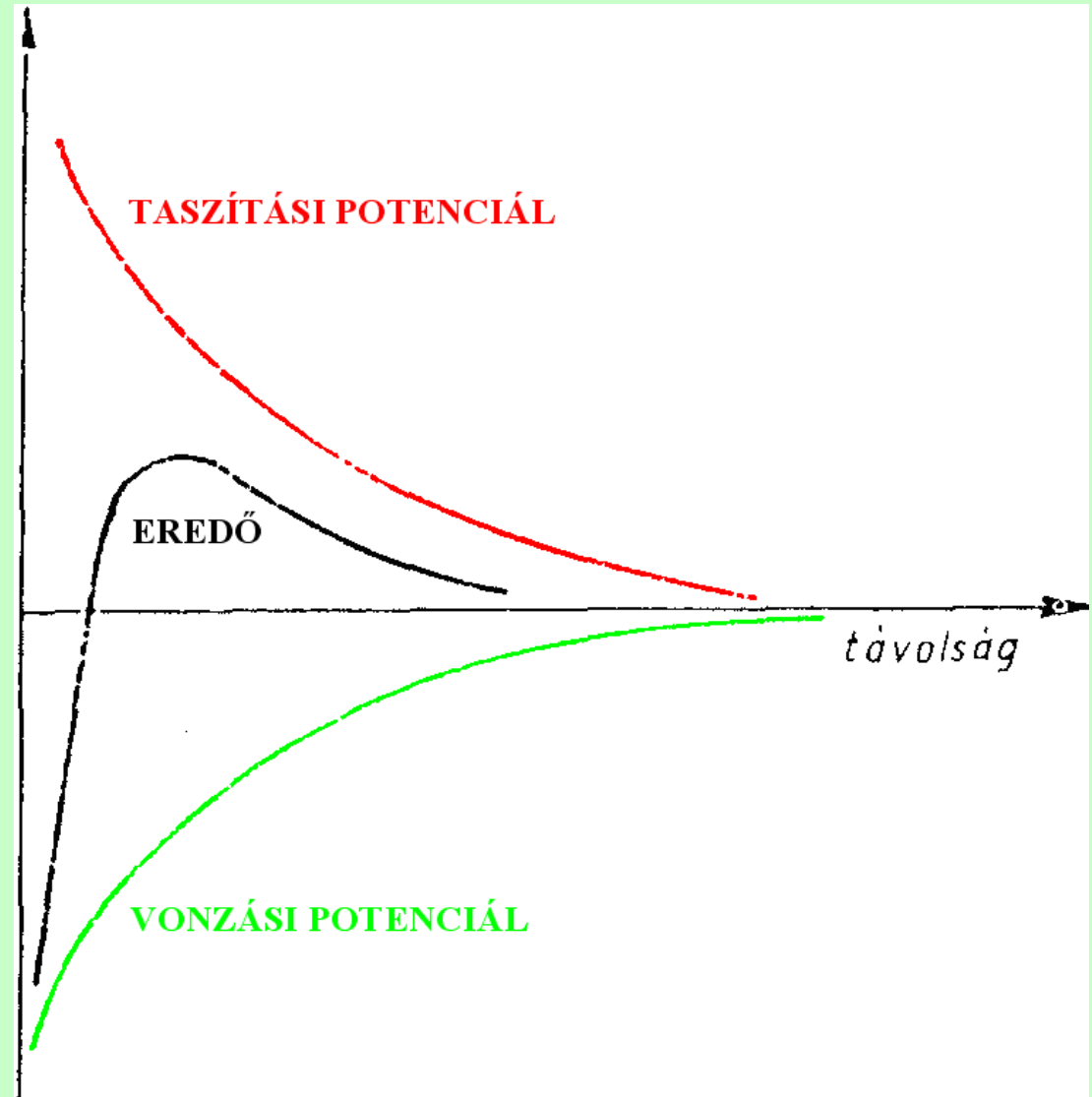
Diffúz réteg határa



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, amelynek pelyhei eltávolítják a kolloid szemcséket.

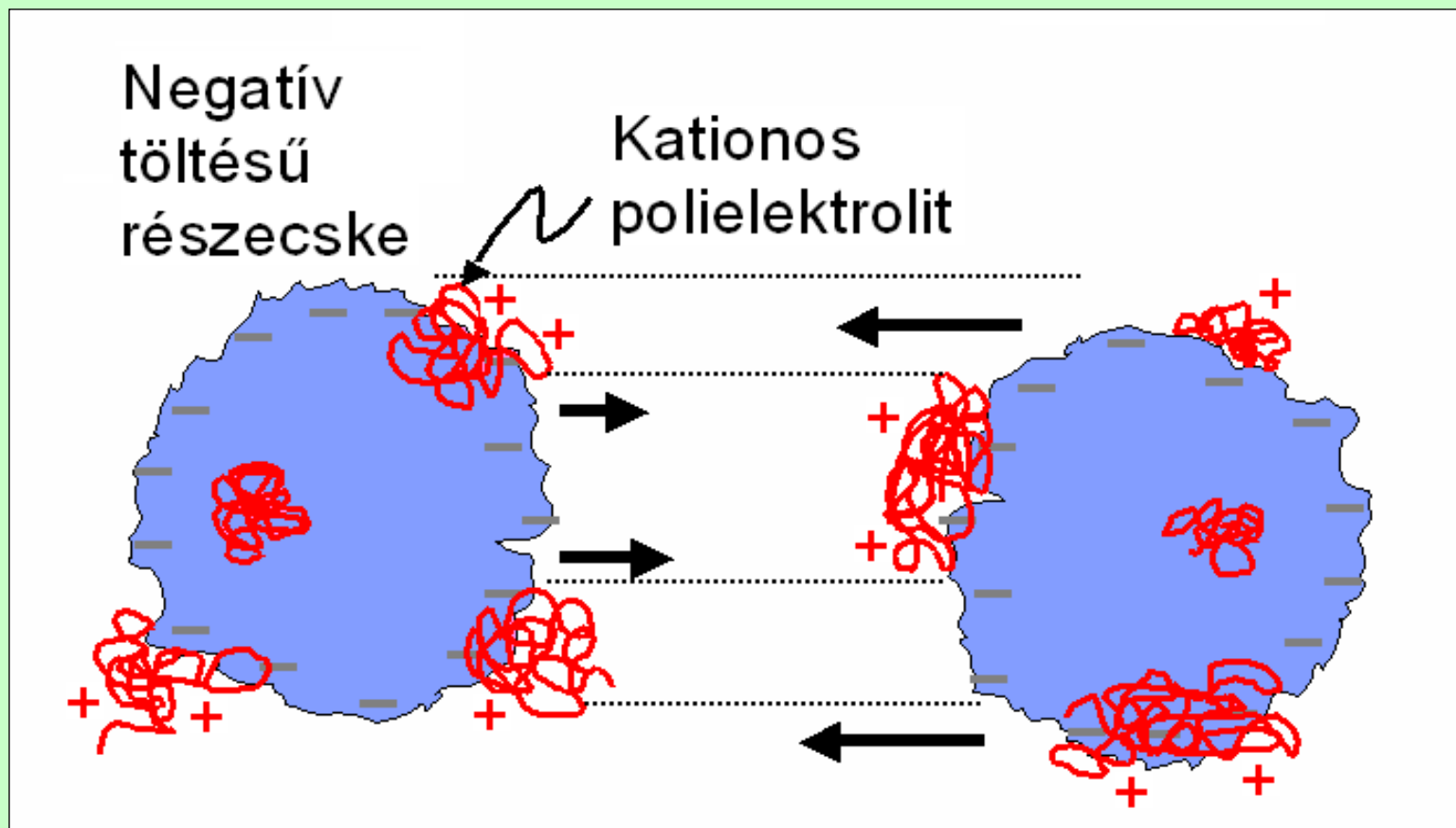
Leggyakrabban $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ csapadék, fémsó adagolása + pH állítás.

Az idegen anyag szennyezi a csapadékot → derítésre jó



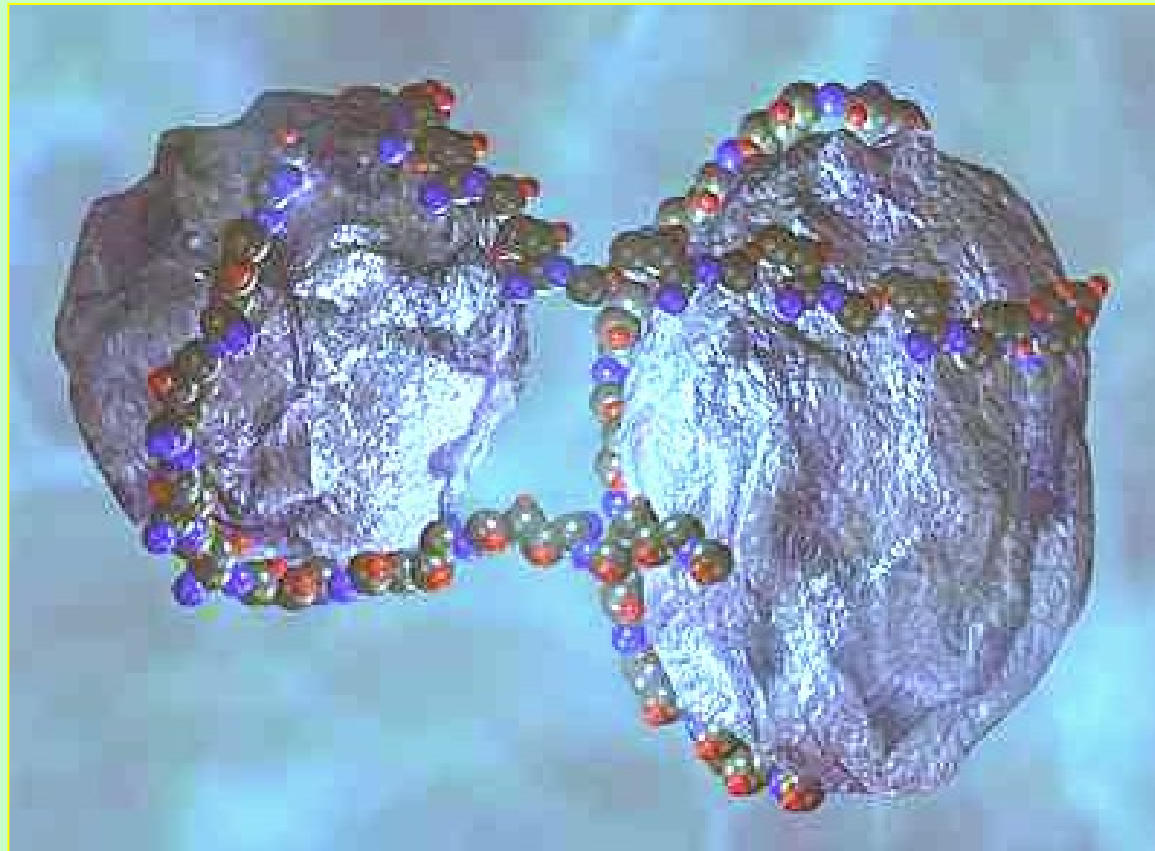
Aggregáció ionpárképzéssel

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 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.

