



# ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

---

Ločevanje topnih produktov –  
koncentriranje

Obarjanje, adsorpcija

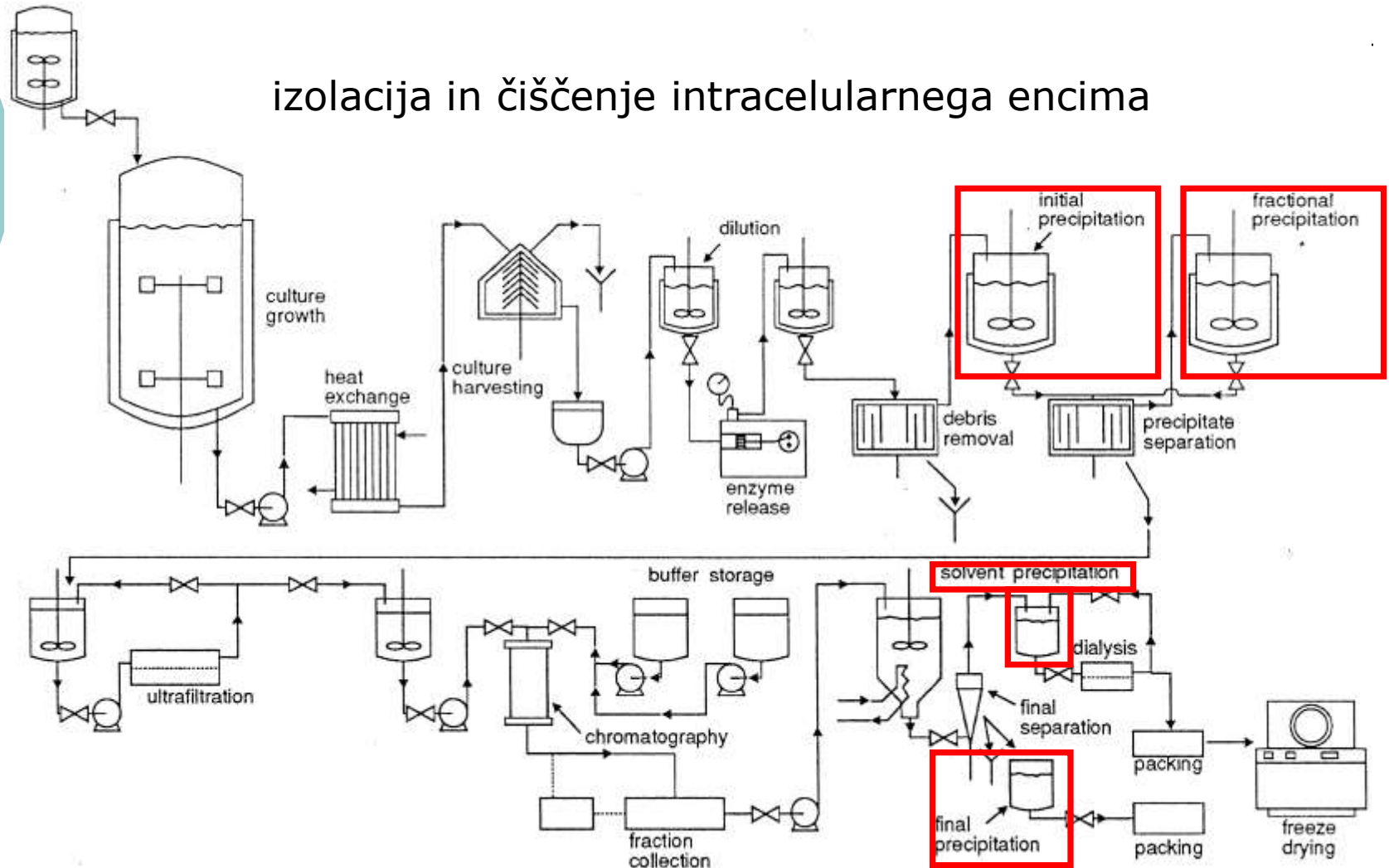
# Obarjanje

---

- uveljavljena metoda ločevanja **proteinov**
- topnost se zmanjša z dodajanjem soli (izsoljevanje) ali z dodatkom organskih topil
- lahko uporabimo za frakcioniranje proteinov (krvna plazma)
- tudi kot stopnja čiščenja, da odstranimo neželjene stranske produkte

# Obarjanje

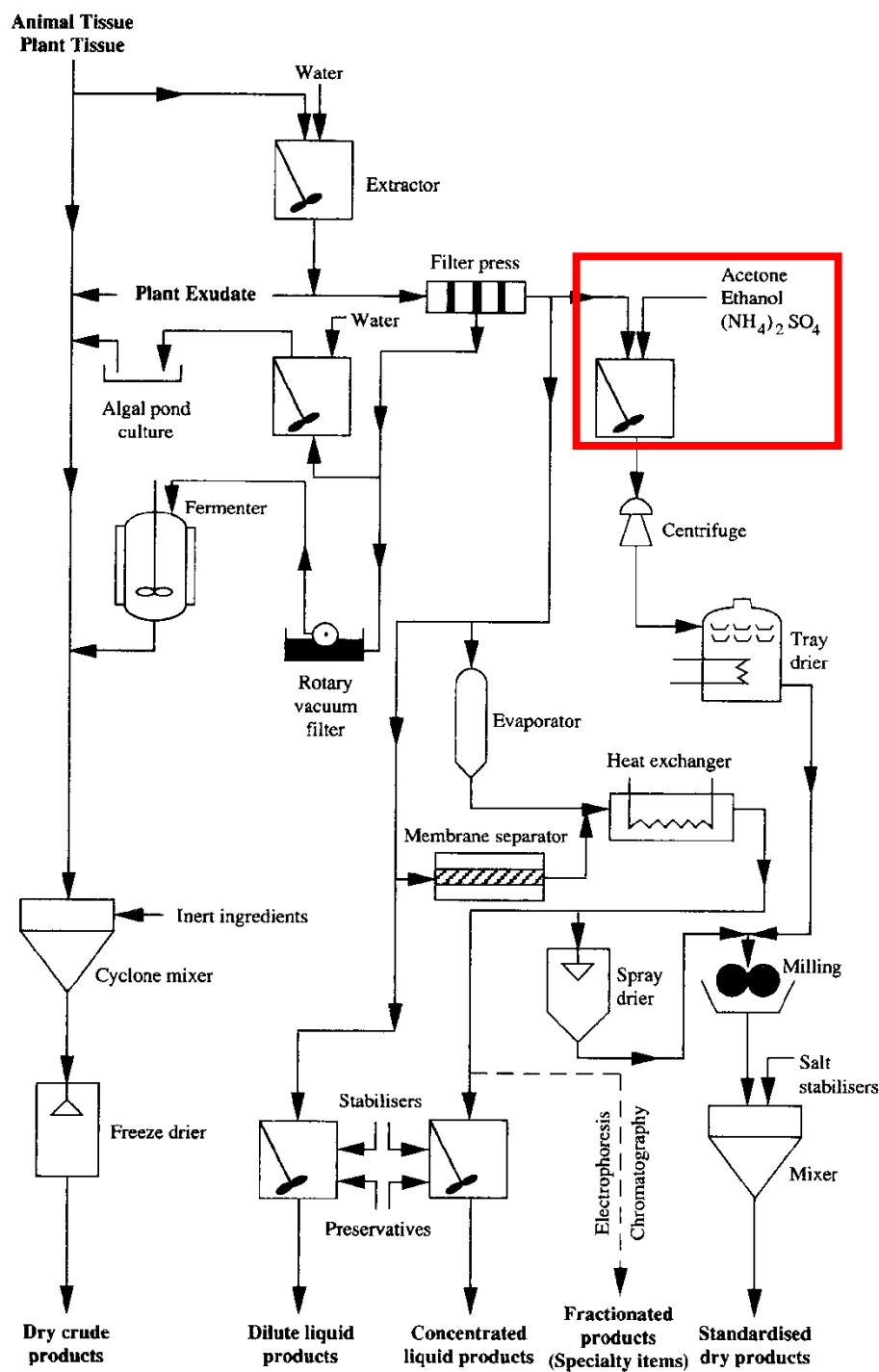
izolacija in čiščenje intracelularnega encima



# Shema procesa

## Proizvodnja encimov

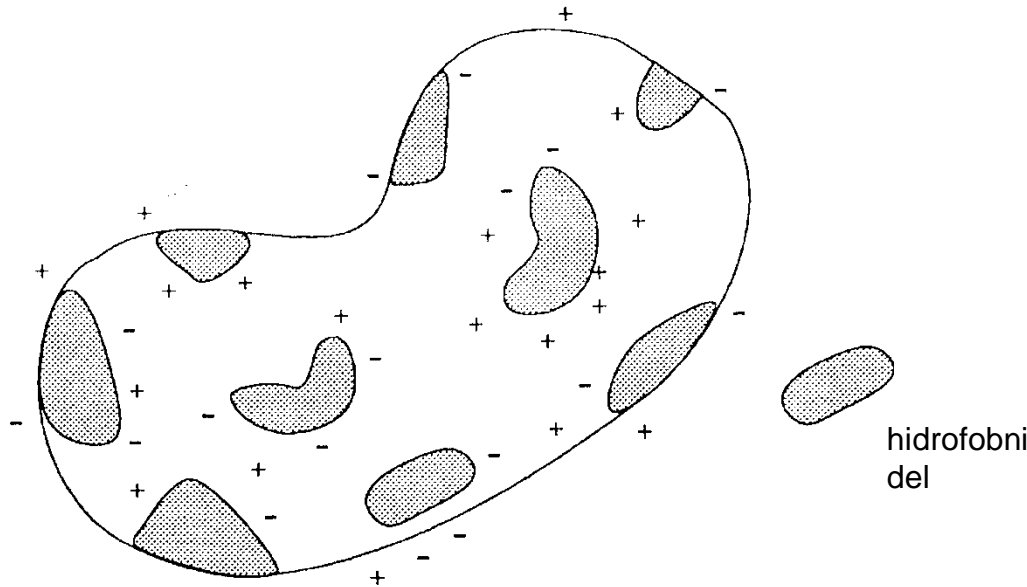
vir: Doran, 1995.  
Bioprocess Engineering  
Principles, str. 219



# Raztopine proteinov

---

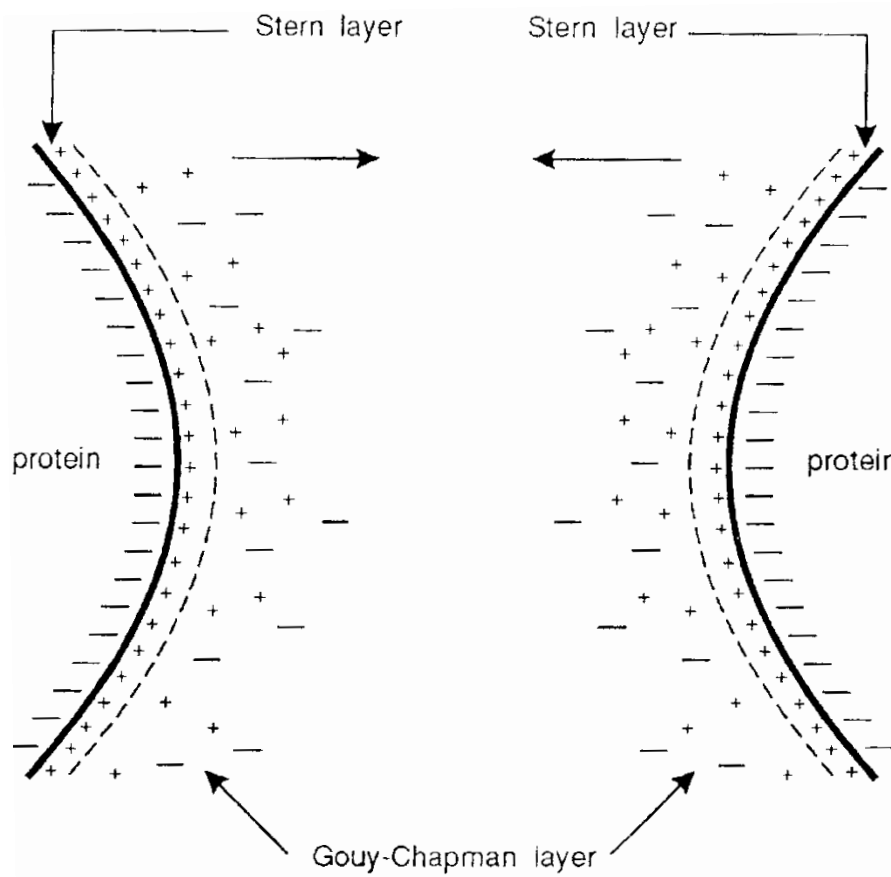
encimi: večinoma globularni proteini, veliko število neuniformno porazdeljenih nabitih delcev na površini



stilizirana porazdelitev nabojev in hidrofobnih delov na površini tipičnega proteina

stabilnost proteinov odvisna od privlačnih in odbojnih sil med koloidnimi delci

# Teorija električne dvojne plasti



v “naravnem” okolju  
proteini izražajo skupno  
negativno nabito  
površino

→ privlačijo pozitivne  
ione v raztopini  
elektrolitov (Sternova  
plast)

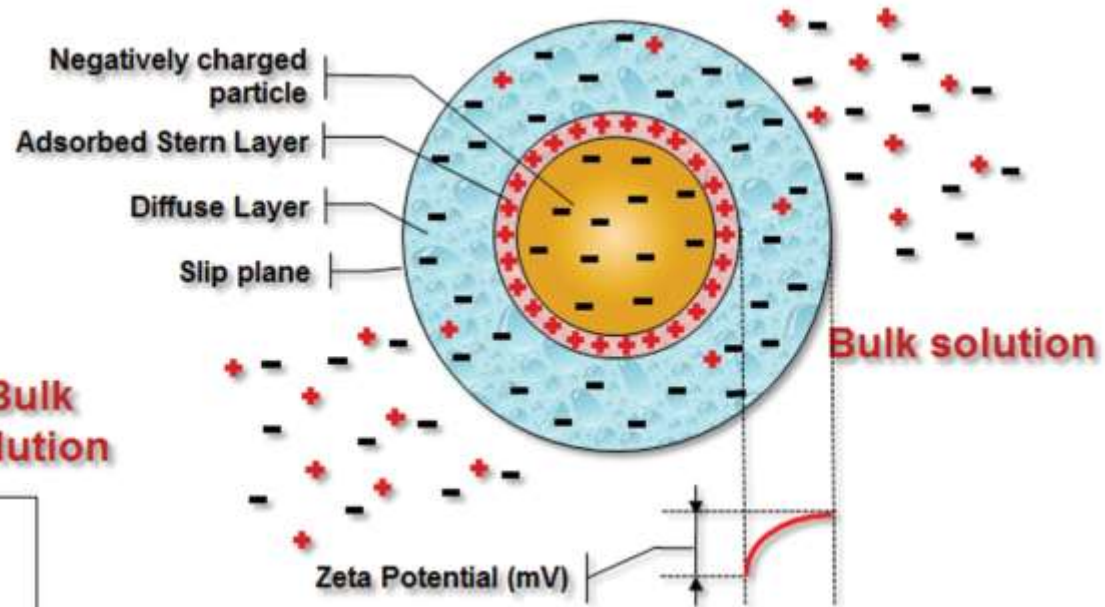
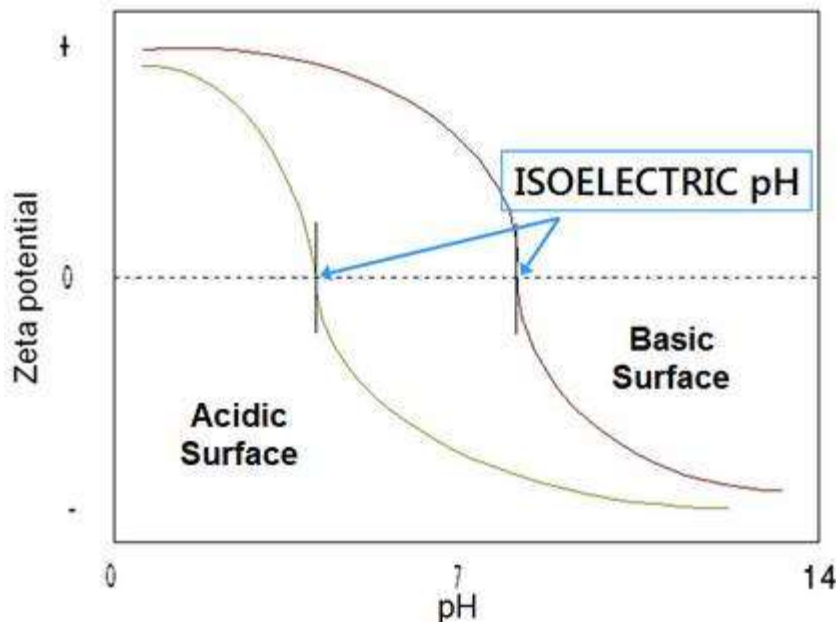
→ poleg nje se vzpostavi  
bolj difuzna plast  
mobilnih pozitivnih ionov

dvojna plast inducira odboj dveh molekul proteina

# Karakterizacija površine proteina

Merjenje zeta potenciala

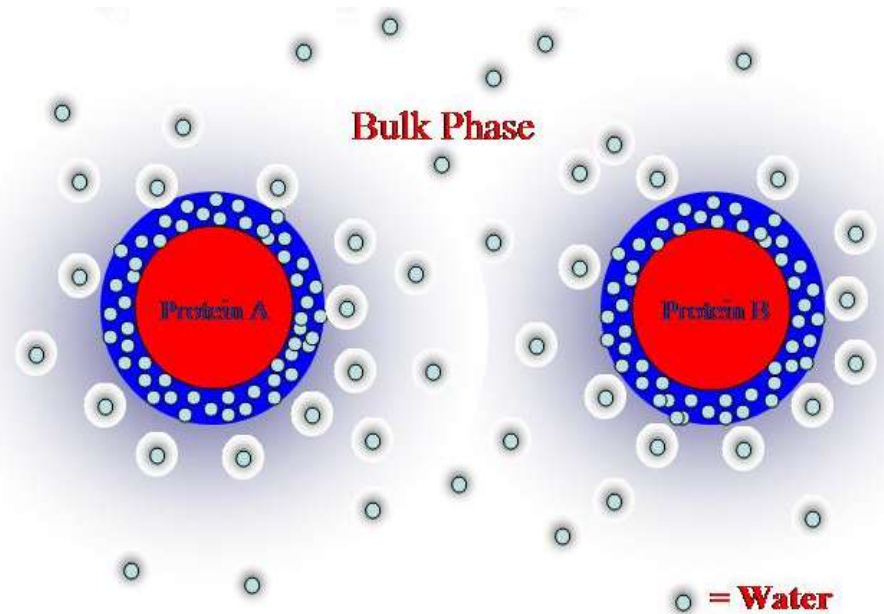
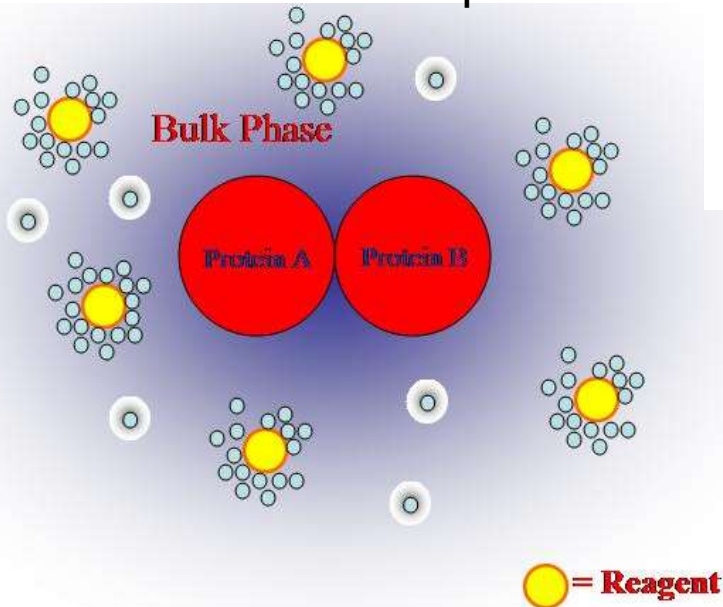
Bulk solution



Določitev izoelektrične točke pI

# Vpliv hidratacijske plasti na topnost

zmanjšanje hidratacijske plasti  
→ privlačne sile med dipoli



hidratacijska plast okrog proteinov  
→ odbojne elektrostatske sile

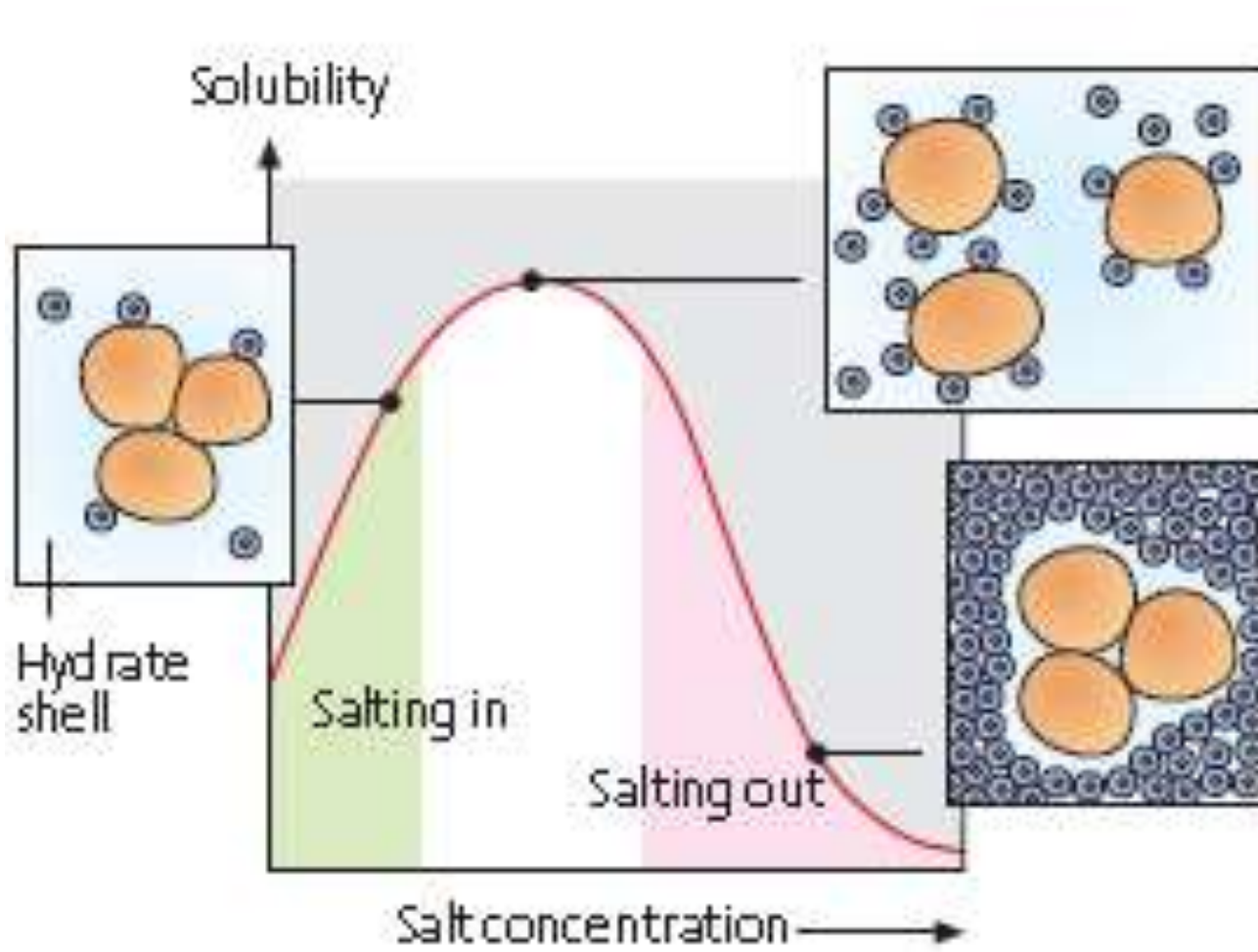


# Vplivi na obarjanje (agregacijo):

---

- privlak med koloidnimi delci (ionske interakcije)
- odboj zaradi vzpostavitve dvojne plasti
  - dvojna plast se lahko komprimira (stisne) v prisotnosti elektrolitov in organskih topil
  - stopnja destabilizacije koloidov odvisna od ionske moči in dielektrične konstante raztopine
- → industrijske tehnike obarjanja osnovane na komprimiranju dvojne plasti z dodatkom **sol** ali **organskih topil**

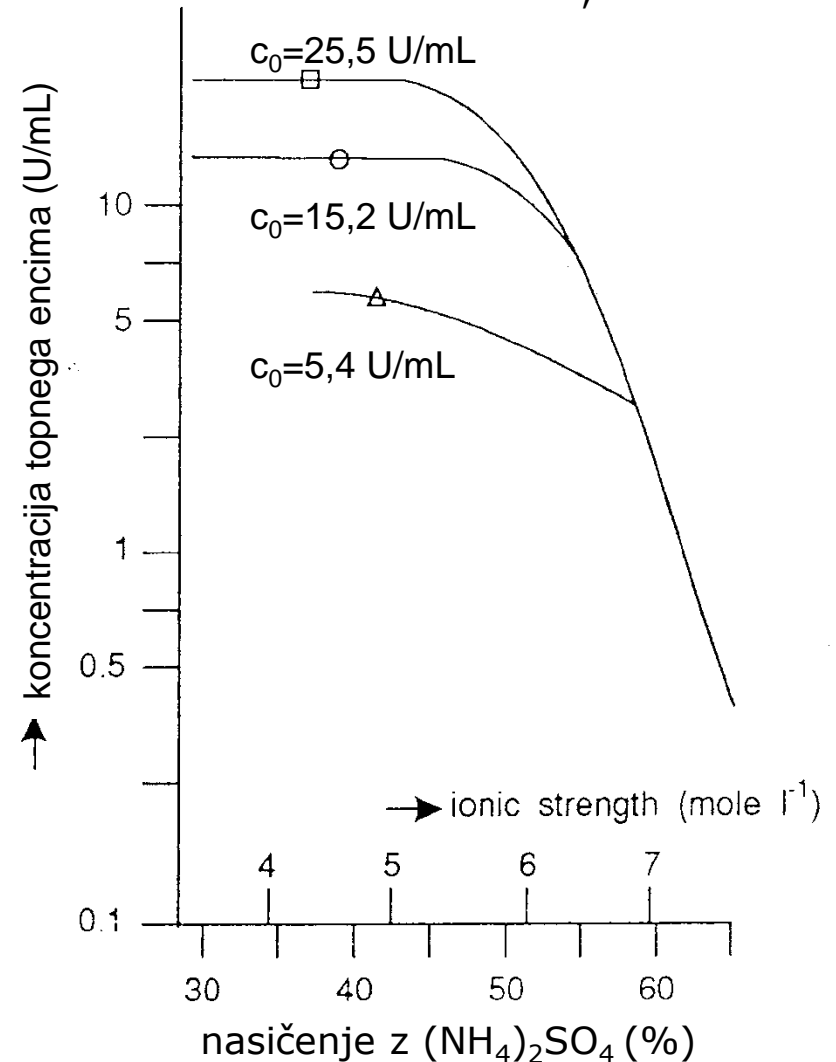
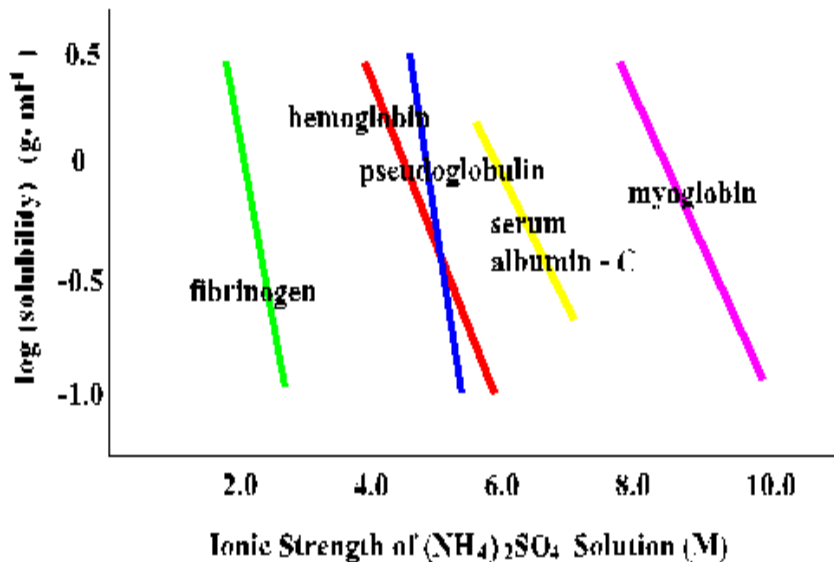
# Izsoljevanje



# Izoljevanje

fumaraza,  $T = 6\text{ }^{\circ}\text{C}$

Različni proteini različna topnost v odvisnosti od koncentracije soli



# Izsoljevanje

topnost ( $S$ ) je funkcija ionske moči ( $I$ ) soli:

$$\log_{10} S = \beta - K_1 \cdot I$$

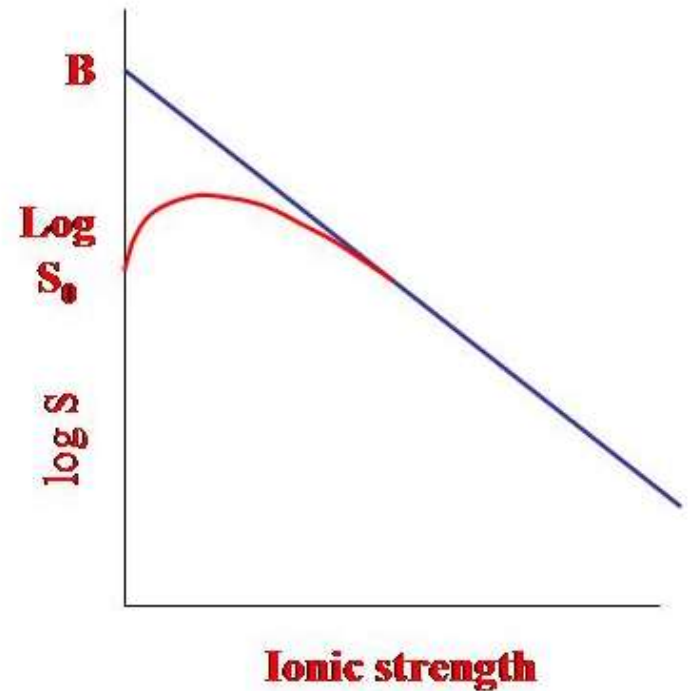
$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i z_i^2$$

$\beta$ ... konstanta, odvisna od pH in T

$K_1$  ...konstanta, odvisna od soli  
( $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  jo zmanjšajo)

$C_i$  ... koncentracija soli

$z_i$  ... ionski naboj soli

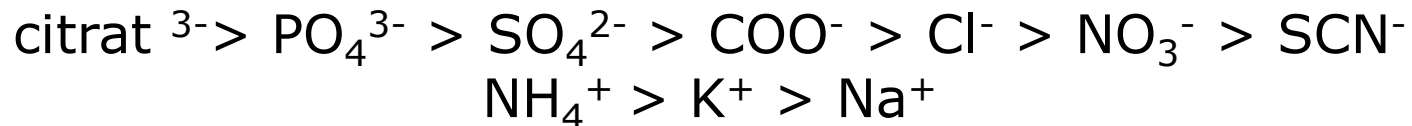


# Izoljevanje

---

ena najstarejših metod izolacije proteinov

relativna učinkovitost nevtralnih soli za izoljevanje  
(Hofmeisterova serija):



sulfat stabilizira strukturo proteinov, tiocianat destabilizira

najpogosteje uporabljane soli:  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$

# Obarjanje z organskimi topili

---

- uporabna organska topila za obarjanje:
  - vodotopna
  - šibko polarna
- najširše uporabljana topila:
  - etanol
  - metanol
  - izopropil alkohol
  - aceton

# Obarjanje z organskimi topili

---

- zaradi deaktivacije biološko aktivnih proteinov z organskimi topili moramo te metode izvajati pri zelo nizkih temperaturah:
  - običajni proteini: 0 – 5 °C
  - krvna plazma: -10 °C
- sprememba topnosti proteina ( $S$ ) v njegovi izoelektrični točki zaradi spremembe efektivne dielektrične konstante topila:

$$\log_{10} S = \frac{K_2}{D_\varepsilon^2} + \log_{10} S_0$$

$S_0$  ... topnost v osnovnem topilu (vodi)

$K_2$  ... konstanta,  $f(T, \text{protein})$

$D_\varepsilon$  ... dielektrična konstanta

# Stopnje obarjanja v industrijskem merilu

---

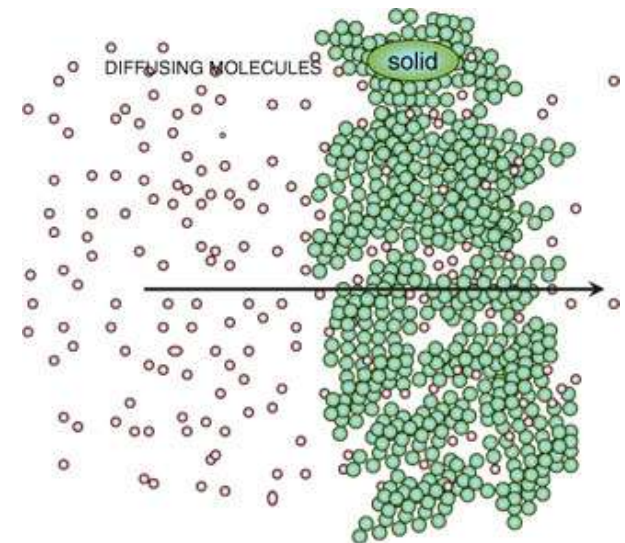
1. začetno pomešanje: raztopina s topljencem se pomeša s topilom ali soljo
2. nukleacija: pojavijo se majhna jedra in obarjanje se prične
3. rast delcev, omejena z difuzijo: oborina raste na osnovi difuzije
4. rast delcev, pospešena s tokom: nadaljnja rast je omogočena s ponovnim mešanjem
5. flokulacija: koloidni delci agregirajo v večje flokule
6. centrifugiranje: flokule ločimo s centrifugiranjem



# Adsorpcija

---

- adsorpcija topljenca (adsorbat) iz tekočine (kapljevina ali plin) **na površino** trdne snovi (adsorbent)
- adsorbenti:
  - anorganski (aktivno oglje, kremen), organski polimeri (dekstran, polistiren,...), kompoziti (anorganski nosilec prevlečen s plastjo organskega materiala)
  - porozni delci (visok  $A/V!$ ) ali monoliti
- vključeni različni mehanizmi
- na učinkovitost vplivata
  - ravnotežje (termodinamika)
  - kinetika prenosa snovi



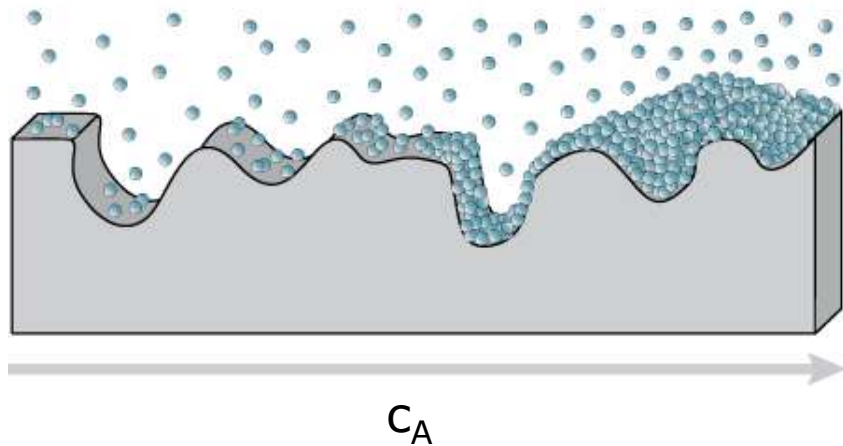
# Primerjava adsorpcija: ekstrakcija

---

- ista funkcija
- v splošnem višja selektivnost, a manjša kapaciteta adsorpcije
- scale-up adsorpcije slabše opredeljen
- težje rokovanje s trdnimi snovmi kot kapljevini
- za izolacijo proteinov adsorpcija vse bolj v veljavi
- čistilne naprave za vodo: adsorpcija na porozne polimerne materiale, aktivno oglje

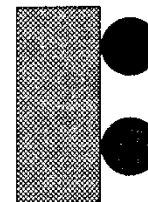
# Adsorpcija

mehanizmi  
adsorpcije

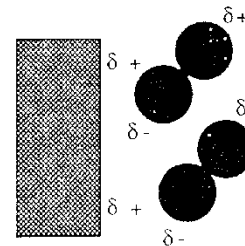
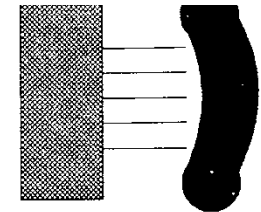


male molekule

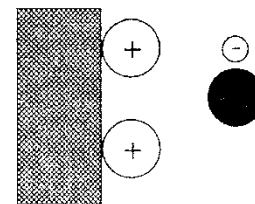
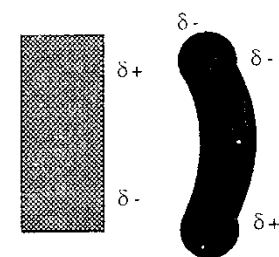
velike molekule



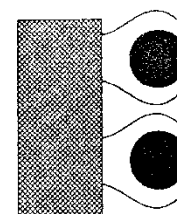
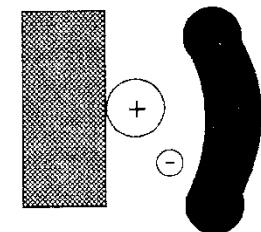
Van der Waals  
forces



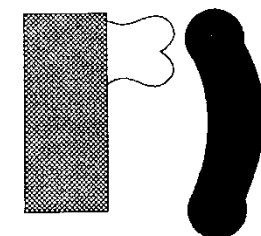
polar forces



ionic forces



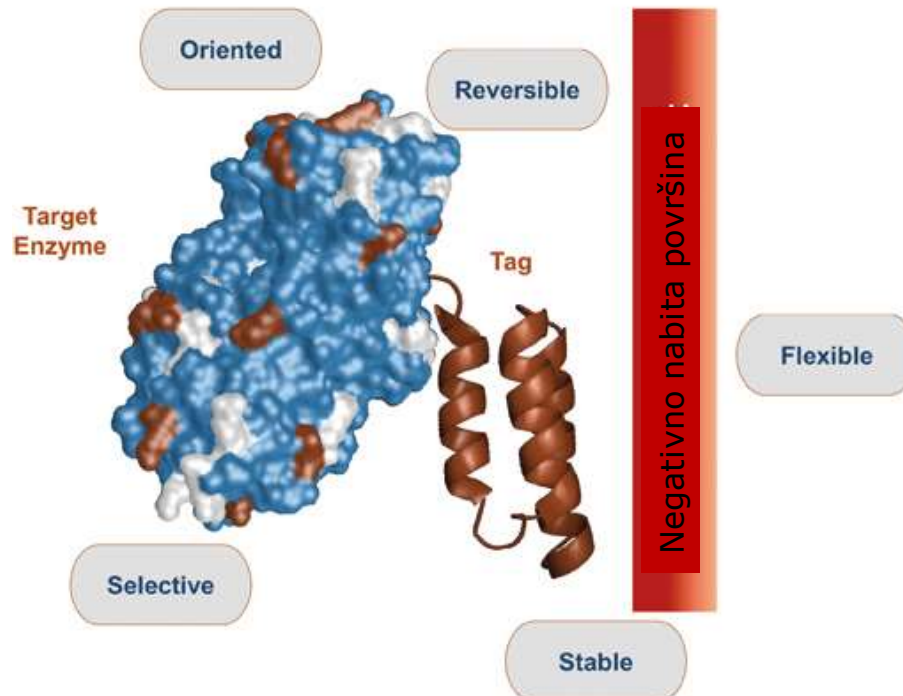
affinity



# Selektivna adsorpcija označenih proteinov

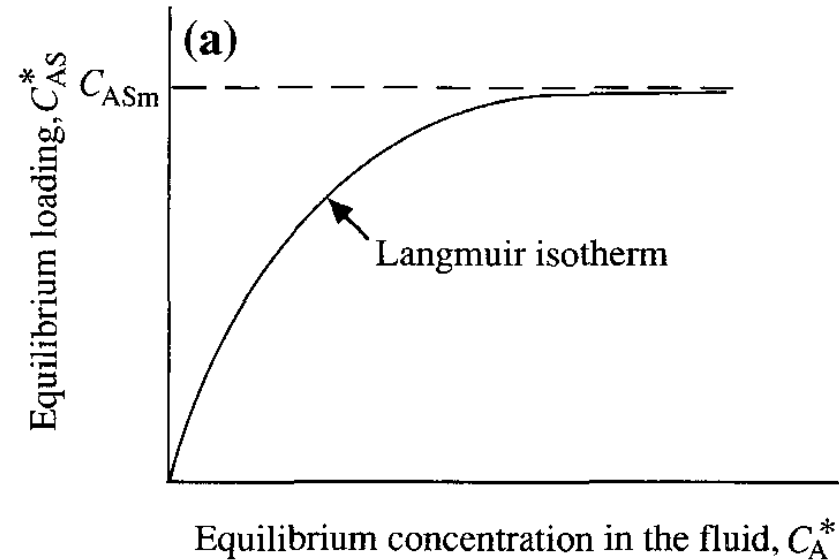
- Z označevanjem proteinov na osnovi tehnologije rekombinantne DNA (inženiring proteinov) dosežemo selektivno pripetje na površino

Primer: Z<sub>basic2</sub> označevalec (angl. tag), ki je pozitivno nabit peptid iz 20 AK



# Ravnotežje

številne adsorpcijske izoterme:  
podatki o ravnotežnih koncentracijah  
adsorbata v adsorbirani fazi ( $c_{AS}^*$ ) in  
v tekoči fazi ( $c_A^*$ ) pri določeni T



**Langmuirjeva enačba:** (1 plast, ni interakcij, vsa mesta adsorpcije enakovredna)

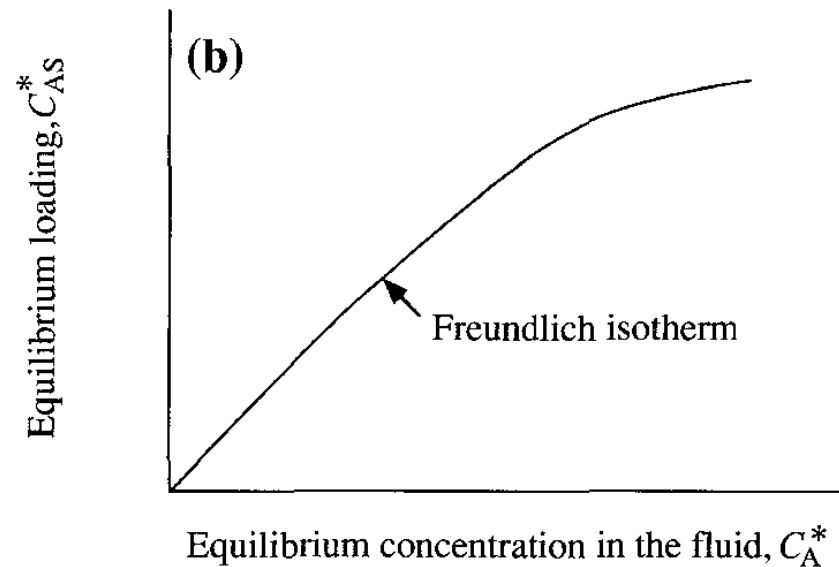
$$C_{AS}^* = \frac{C_{ASm} \cdot K_A \cdot c_A^*}{1 + K_A \cdot c_A^*}$$

$C_{ASm}$ ... maksimalna naložitev adsorbata v eni plasti  
 $K_A$ ... Langmuirjeva konstanta

**Freundlichova enačba:**

$$C_{AS}^* = K_F \cdot c_A^{*(1/n)}$$

$K_F$ ... Freundlichova konstanta

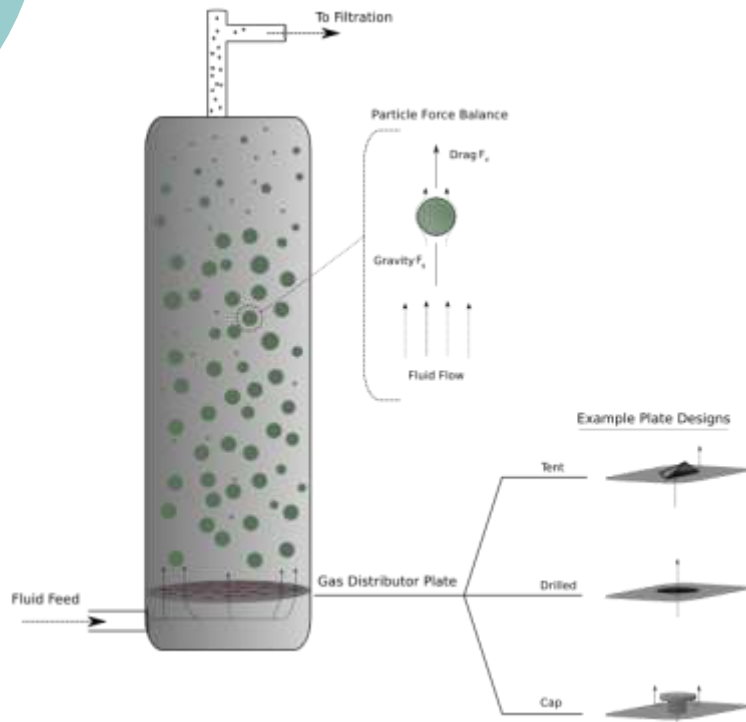


# Adsorpcijski procesi

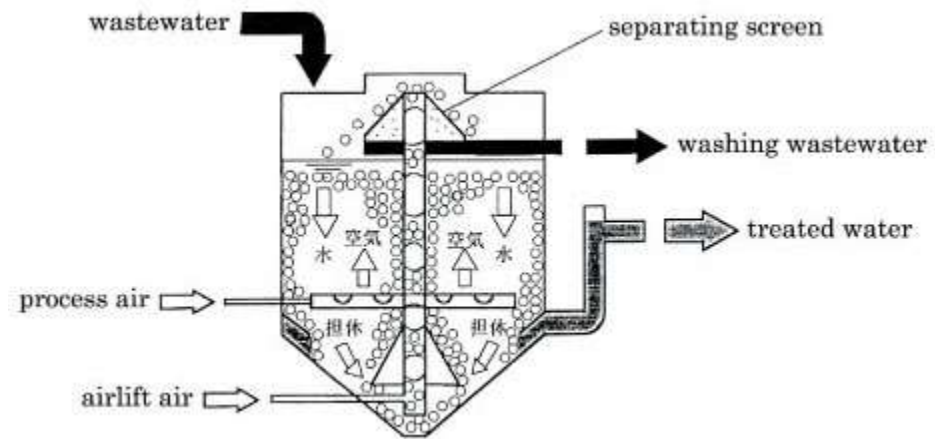
---

- stopnje pri procesu adsorpcije:
  - adsorpcija topljenca na adsorbent
  - spiranje: odstranitev neadsorbiranega materiala
  - desorpcija oz. elucija z ustreznim topilom (drugačen pH ali ionska moč, organska topila)
  - spiranje preostalega topila
  - regeneracija adsorbenta (odstranitev nečistoč, povrnitev osnovne adsorpcijske kapacitete)
  - izolacija adsorbata (topljenca) iz topila s sušenjem, obarjanjem ali kristalizacijo

# Adsorberji



adsorberji s fluidiziranim slojem

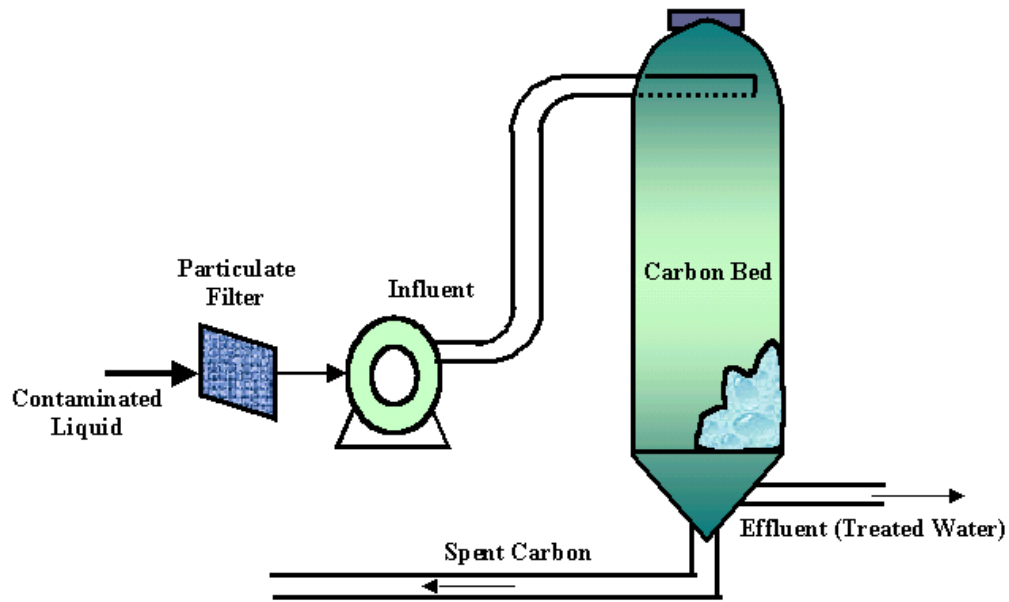


adsorberji s premikajočim se slojem

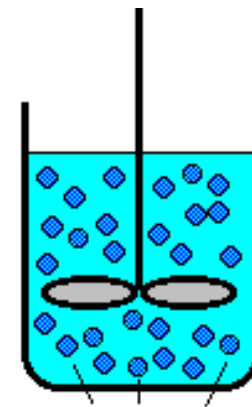


# Adsorberji

---



adsorberji s fiksnim slojem



mešalniki



# Potek adsorpcije v adsorberju s fiksnim slojem

