

**Tento výukový materiál je autorským dílem, které je chráněno autorským právem
VŠCHT Praha.**

Některé části přednášky vycházejí z autorských děl třetích osob, která VŠCHT Praha užívá pro účely výuky svých studentů na základě zákonné licence.

Obsah této přednášky je určen výlučně pro výuku studentů VŠCHT Praha.

Obsah přednášky nesmí být rozmnožován, zaznamenáván, napodobován, publikován ani jinak rozšiřován bez písemného souhlasu majitele autorských práv.

Autorské právo neporušuje ten student VŠCHT Praha, který výlučně pro svou osobní potřebu zhotoví záznam či napodobeninu díla nebo užije dílo jiným způsobem, který dle zákona autorské právo neporušuje.

© VŠCHT Praha 2020

IZOLACE BIOMAKROMOLEKUL

Rozsah: 2/0 Zk

Vyučující: doc. Ing. Petra Lipovová, PhD.

Předmět navazuje na: Biochemie

Doporučená literatura: Dr. Ing. K. Bílková, Prof. Ing. B. Králová, CSc.: Izolace biomakromolekul, Vydavatelství VŠCHT, 1997

e-learning

Obsah předmětu:

- Úvod - zdroje biomakromolekul, dezintegrace, membránové procesy
- Srážení, extrakce a centrifugace
- Základní rozdělení a instrumentace, hydrofobní chromatografie a chromatografie na reversní
- Gelová permeační chromatografie, Ionexová chromatografie
- Afinity chromatografie + příprava rekombinantních proteinů
- Cvičení – navržení postupu přípravy rekombinantního proteinu
- Tenkovrstvá chromatografie, sledování průběhu chromatografie a stanovení koncentrace bílkovin
- Cvičení – práce s programem protNLab
- Úvod do elektroforetických metod
- Typy elektroforetických metod
- Imunochemické metody I
- Imunochemické metody II

Úvod

**zdroje biomakromolekul, dezintegrace,
membránové procesy**

Základní izolační kroky

výběr vhodného producenta



homogenizace a separace
buněk



dezintegrace buněk



odstranění buněčných zbytků
koncentrování



purifikace

Zdroje biomakromolekul

- Mikroorganismy, živočišné tkáně, rostlinná pletiva, tělní tekutiny

Selekce producentů

- maximální produkce požadované látky
- selekce producenta s požadovanými vlastnostmi
- snadnost získání producenta
- snadnost purifikačního postupu
- ...

Mikroorganismy

Bakterie, kvasinky, plísně, některé řasy

Výhody:

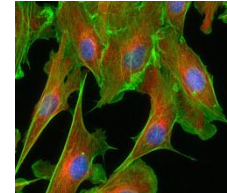
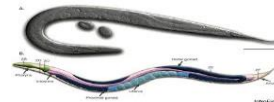
- lze je snadno získat v dostatečném množství (kultivace ve fermentoru ...)
- selekce mutantů s požadovanými vlastnostmi
- termofilní organismy (produkce enzymů s vyšší teplotní stabilitou), psychofilní organismy, halofilní
- genové inženýrství



Živočišné zdroje

- **Laboratorní zvířata** — myši, krysy, králíci
- **Jateční zvířata** — orgány, krev
- **Člověk** — tělní tekutiny (krev → plasmin, thrombin ; moč → urokinasa ...)
- **Bezobratlí** - hmyz, plži, mlži
- **Tkáňové kultury** - např. CHO

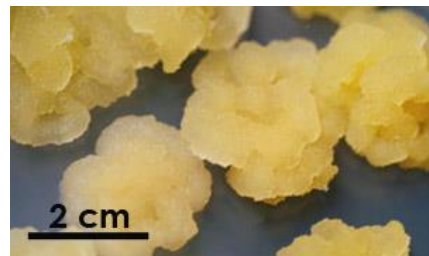
Caenorhabditis elegans



Rostlinné tkáně

Špenát, řepa, hrách, *Arabidopsis thaliana*, tabák....

Nevýhoda: problematický růst za definovaných podmínek
rostlinné suspenzní kultury



Kde získat informace o možných zdrojích?

- **ATCC** (American Type Culture Collection)

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>



IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS

- **CCM** (Czech Collection of Microorganisms)

www.sci.muni.cz/ccm/



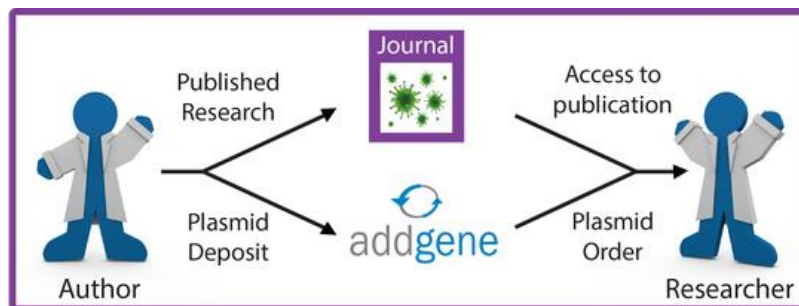
- **FDA** (Food and Drug Administration) (2001), Partial list of microorganisms and microbial-derived ingredients that are used in foods.

www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-micr.html

- **AMFEP** (The Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products)

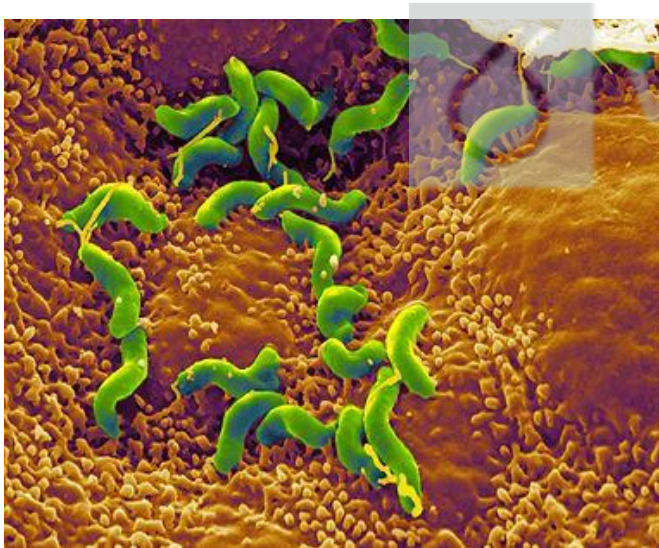
www.amfep.org

- **addgene.com**

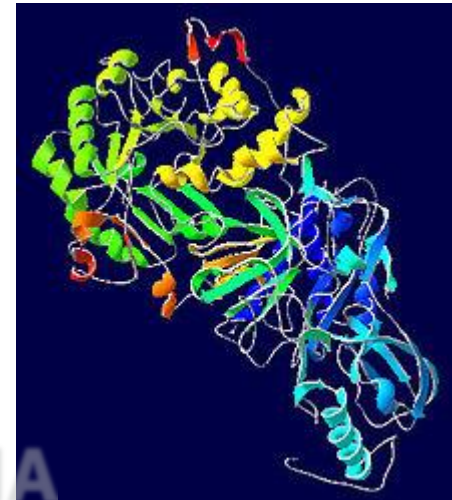


Vaším úkolem je izolovat ureasu z *Helicobacter pylori*

Ureasa (EC 3.5.1.5)



http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/wp-content/blogs.dir/110/files/1431/o_helicobacter.jpg



Helicobacter Pylori Urease drawn from PDB 1E9Z

ATCC (American Type Culture Collection)

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>

Bacteria

Showing 1 to 20 of 26 Results

Results per Page 20 ▼

<< ≤ 1 2 ≥ >>

ATCC® Number ^	Description	Designation
☐ 13315	<i>Proteus hauseri</i> O'Hara et al. deposited as <i>Proteus vulgaris</i> Hauser emend. Judicial Commission	NCTC 4175 strain Lehmann [CCUG 6327, CDC 1086-80, CDC 2130-74, CDC 9079-77, CIP 58.60, DSM 30118, NCIB 4175]
☐ 43504	<i>Helicobacter pylori</i> (Marshall et al.) Goodwin et al. deposited as <i>Campylobacter pyloridis</i> Marshall et al. Isolation: human gastric antrum, Australia	NCTC 11637 [JCM 7653, RPH 13487]
☐ 43526	<i>Helicobacter pylori</i> (Marshall et al.) Goodwin et al. deposited as <i>Campylobacter pylori</i> Marshall et al. Isolation: human gastric antrum	NCTC 11916 [JCM 7654]
☐ 43579	<i>Helicobacter pylori</i> (Marshall et al.) Goodwin et al. deposited as <i>Campylobacter pyloridis</i> Marshall et al. Isolation: human gastric mucosa	DT 61A [JCM 7655]
☐ 43629	<i>Helicobacter pylori</i> (Marshall et al.) Goodwin et al. deposited as <i>Campylobacter pylori</i> Marshall et al. Isolation: gastric biopsy	NCTC 11639 [Hoye, JCM 7656, RSB6]
☐ 43772	<i>Helicobacter mustelae</i> (Fox et al.) Goodwin et al. deposited as <i>Campylobacter pylori</i> subsp. <i>mustelae</i> Fox et al. Isolation: ferret gastric mucosa, <i>Mustela putorius furo</i>	R85-13 6P
☐ 43773	<i>Helicobacter mustelae</i> (Fox et al.) Goodwin et al. deposited as <i>Campylobacter pylori</i> subsp. <i>mustelae</i> Fox et al. Isolation: ferret gastric mucosa, <i>Mustela putorius furo</i>	R85-13-12F
☐ 43774	<i>Helicobacter mustelae</i> (Fox et al.) Goodwin et al. Isolation: ferret gastric mucosa, <i>Mustela putorius furo</i>	R85-13-11P

Helicobacter pylori (Marshall et al.) Goodwin et al. (ATCC® 43526™)

Strain Designations: **NCTC 11916 [JCM 7654]** / Type Strain: **no** / Biosafety Level: **2**

GENERAL INFORMATION

CHARACTERISTICS

CULTURE METHOD

HISTORY

DOCUMENTATION

EMAIL
PRINT
SHARE

Deposited As

Campylobacter pylori Marshall et al.

Strain Designations

NCTC 11916 [JCM 7654]

Application

Enteric Research

Isolation

Human gastric antrum

Biosafety Level

2

Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.

Product Format

frozen

Storage Conditions

Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Helicobacter pylori (Marshall et al.) Goodwin et al.
ATCC® 43526™

frozen

€425.00

Qty:

Add to Cart



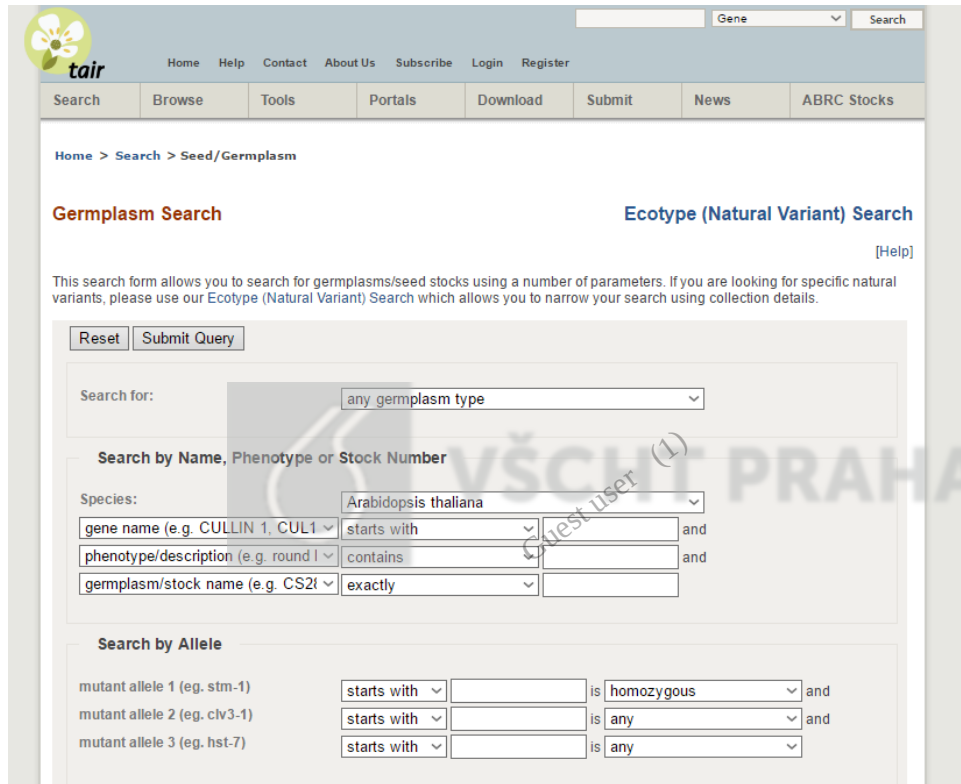
CUSTOMER SERVICE

Don't see what you are looking for? Our Technical Support team may be able to help.

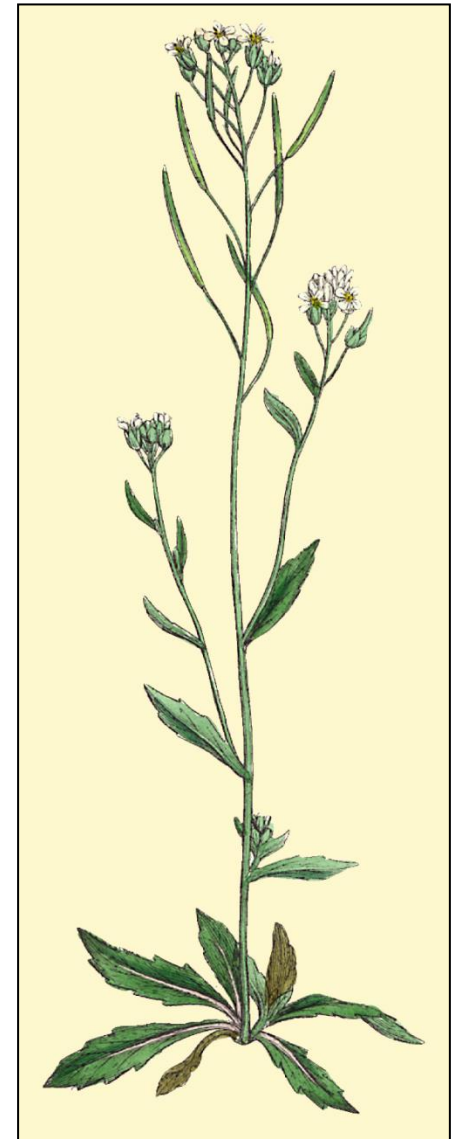
[Learn More](#)

Semínka *Arabidopsis thaliana*

www.arabidopsis.org



The screenshot shows the tair website's Germplasm Search page. The header includes the tair logo and navigation links: Home, Help, Contact, About Us, Subscribe, Login, Register. Below the header is a search bar with a dropdown menu set to 'Gene' and a 'Search' button. The main content area has a breadcrumb trail: Home > Search > Seed/Germplasm. There are two search options: 'Germplasm Search' (highlighted in orange) and 'Ecotype (Natural Variant) Search' (in blue). A '[Help]' link is next to the Ecotype search. A paragraph explains that the search form allows searching for germplasms/seed stocks using various parameters, and directs users to the Ecotype search for natural variants. Below this is a search form with a 'Reset' button and a 'Submit Query' button. The form includes a 'Search for:' dropdown menu set to 'any germplasm type'. Under the heading 'Search by Name, Phenotype or Stock Number', there is a 'Species:' dropdown menu set to 'Arabidopsis thaliana'. Below this are three rows of search criteria: 'gene name (e.g. CULLIN 1, CUL1)' with a 'starts with' dropdown, 'phenotype/description (e.g. round l)' with a 'contains' dropdown, and 'germplasm/stock name (e.g. CS2l)' with an 'exactly' dropdown. Each dropdown is followed by an empty text input field and an 'and' connector. At the bottom, under the heading 'Search by Allele', there are three rows for mutant alleles: 'mutant allele 1 (eg. stm-1)', 'mutant allele 2 (eg. clv3-1)', and 'mutant allele 3 (eg. hst-7)'. Each row has a 'starts with' dropdown, an empty text input field, an 'is' connector, a dropdown menu (set to 'homozygous', 'any', and 'any' respectively), and an 'and' connector.

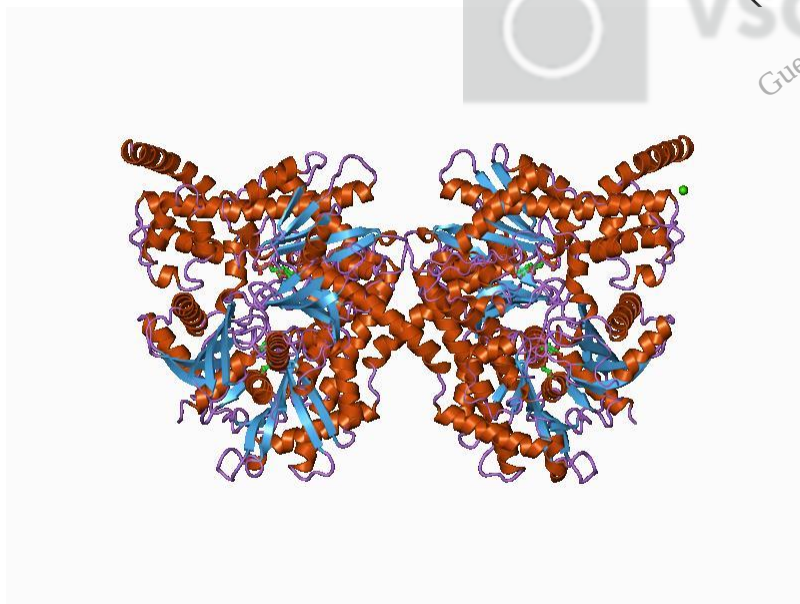


Lidská hexokinasa

Showing 1 to 3 of 3 Results

ATCC® Number ^	Description	Designation
☐ MGC-1724	BC008730 BE261230	3163058
☐ MGC-1742	BE264512 BC001890	3536582
☐ MGC-40018	BI906191 BC028129	5211860

Showing 1 to 3 of 3 Results



brain/CNS
neuroblastoma cell line

lung, small cell carcinoma

leukocyte

Mammalian Gene Collection - Human

ATCC® Number: MGC-1724 [Order this Item](#)

Price: £89.00; €97.00

Organism: human

I.M.A.G.E. Clone ID: 3163058

GenBank Definition Line: hexokinase 1

Gene Symbol: HK1

GenBank Number: BC008730
BE261230

LocusID: 3098

UniGene Cluster ID: Hs.118625

Tissue Description: brain/CNS
neuroblastoma cell line
neuroblastoma

Species: *Homo sapiens*

Vector: pOTB7

Media Description: ATCC medium 2272: LB Medium (Miller) with chloramphenicol 25 mcg/ml

Biosafety Level: 1

Shipped: frozen

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other [ATCC and/or regulatory permits](#) may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

Related Links ▶

[NCBI Entrez Search](#)

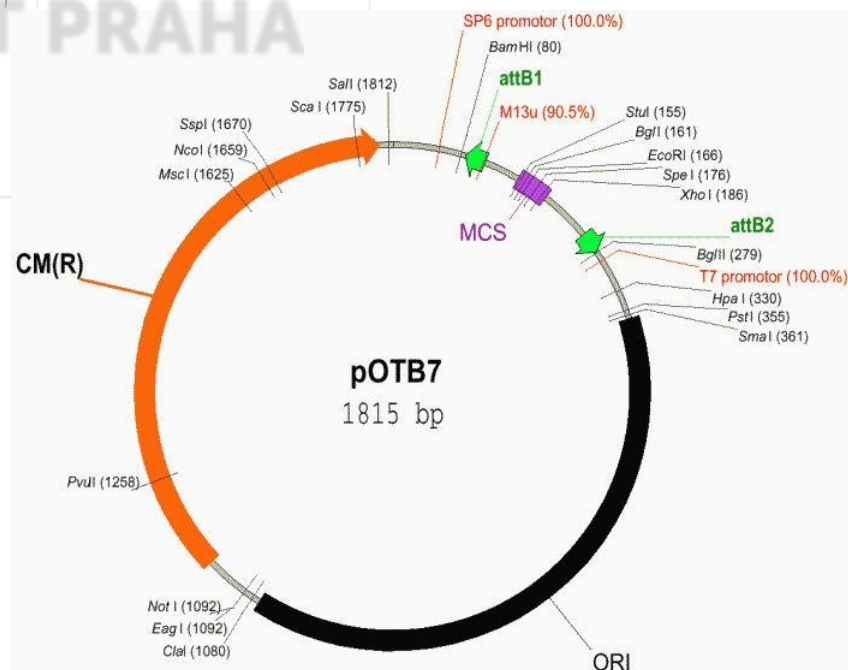
[Make a Deposit](#)

[Frequently Asked Questions](#)

[Material Transfer Agreement New!](#)

[Technical Support](#)

[Related Products](#)



Optimalizace kultivace

- Teplota
- Složení media
- Aktivátor
- Aerace



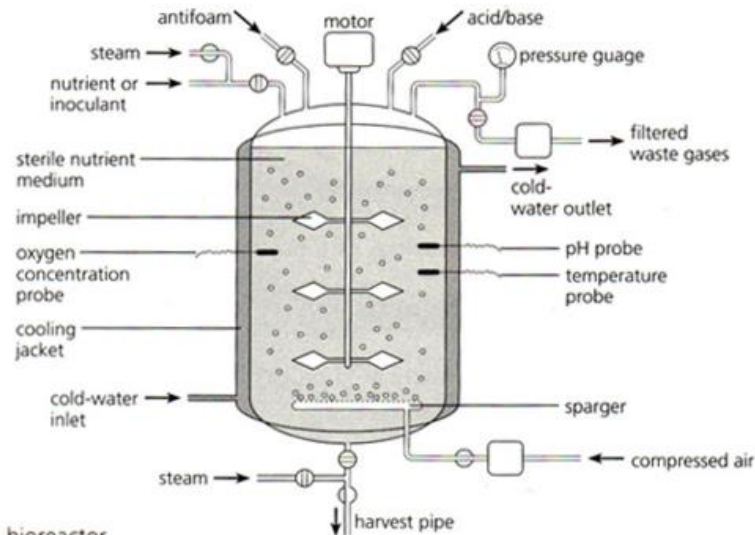
225 g 1,90 £



VŠCHT PRAHA

Guest user (1)

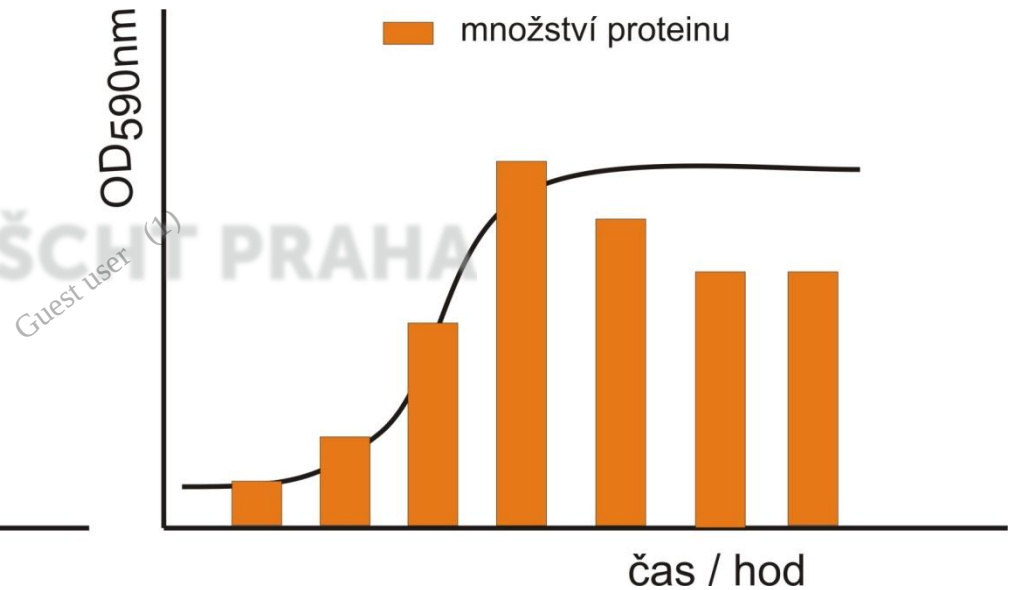
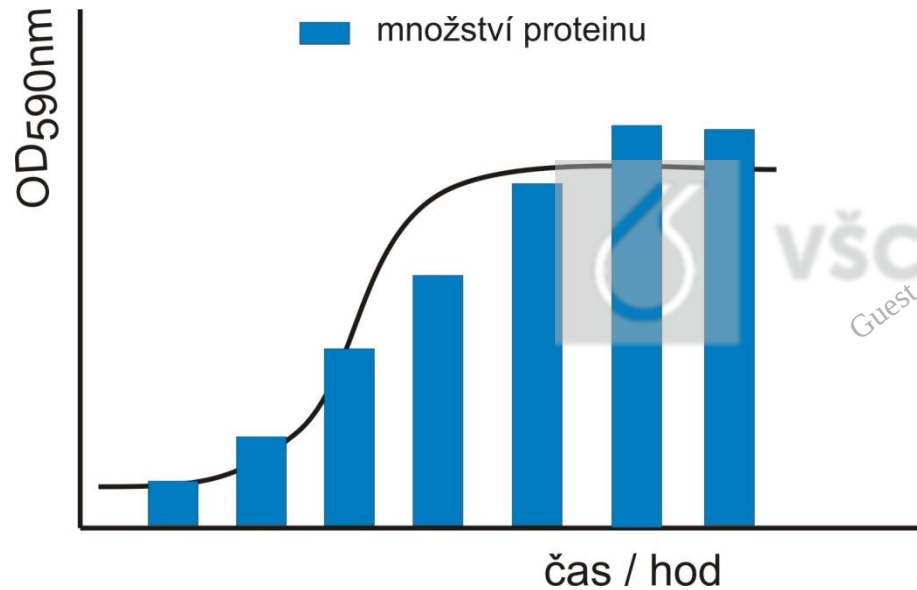
X 250 g 2162,- Kč



A bioreactor



Optimalizace kultivace



Homogenizace a solubilizace materiálu

Mechanicky: mletí (kulový mlýnek, masový strojek), mixování (výkonný mixer), krájení, třecí miska s pískem

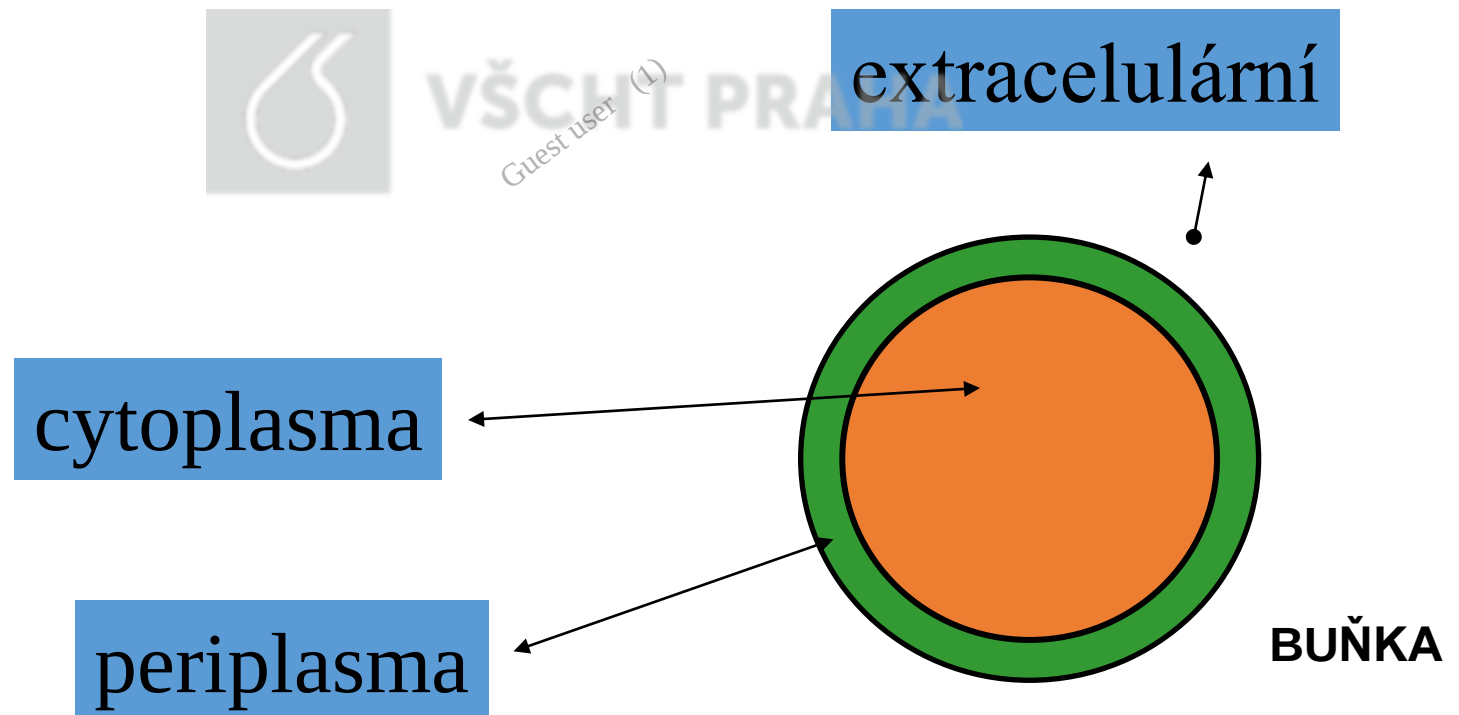


Separace buněk

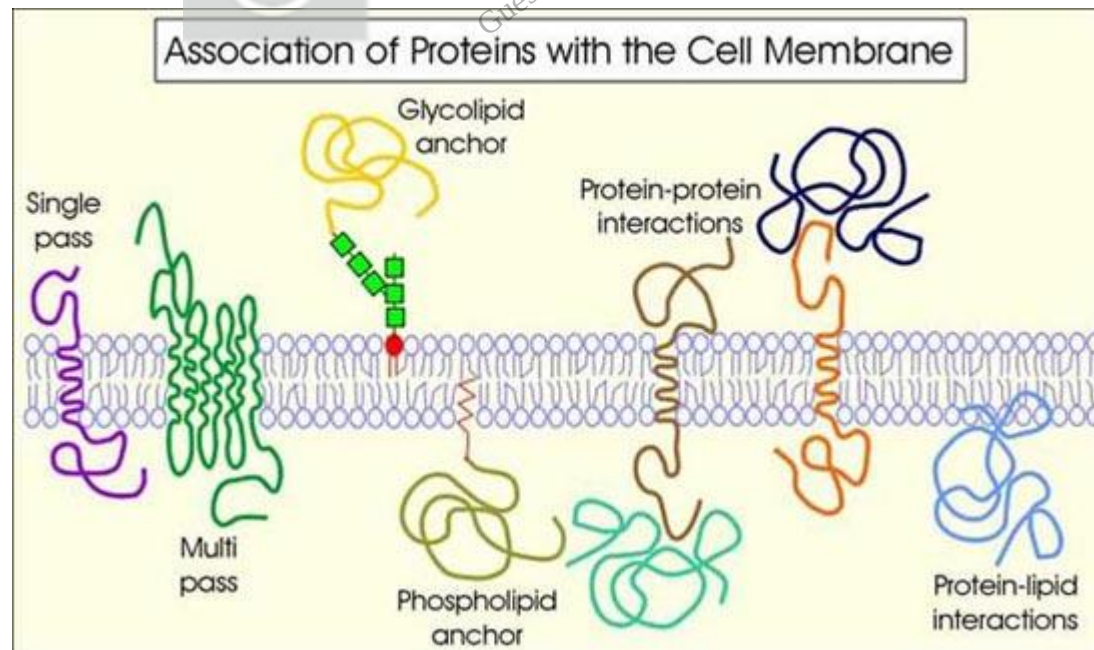
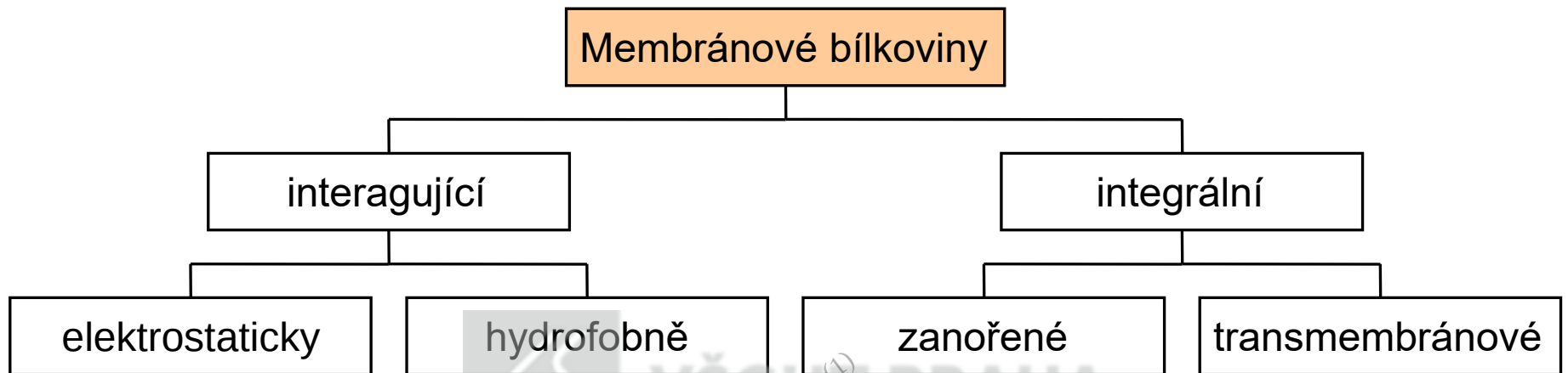
- odstředování (6000 g, 10 min, 4°C)
- filtrace

Distribuce biomakromolekul

- v intracelulárním prostoru
- v periplasmatickém prostoru
- v extracelulárním prostoru

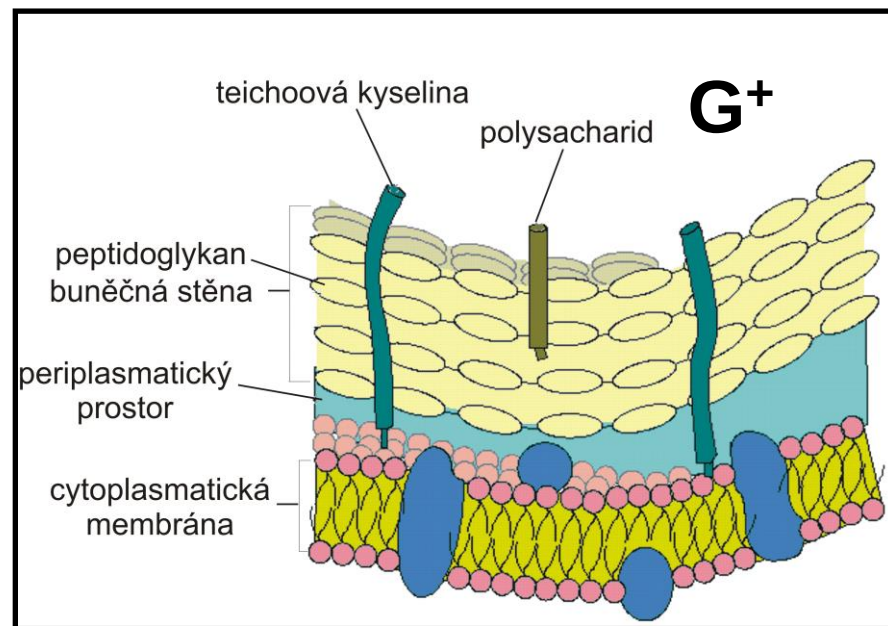
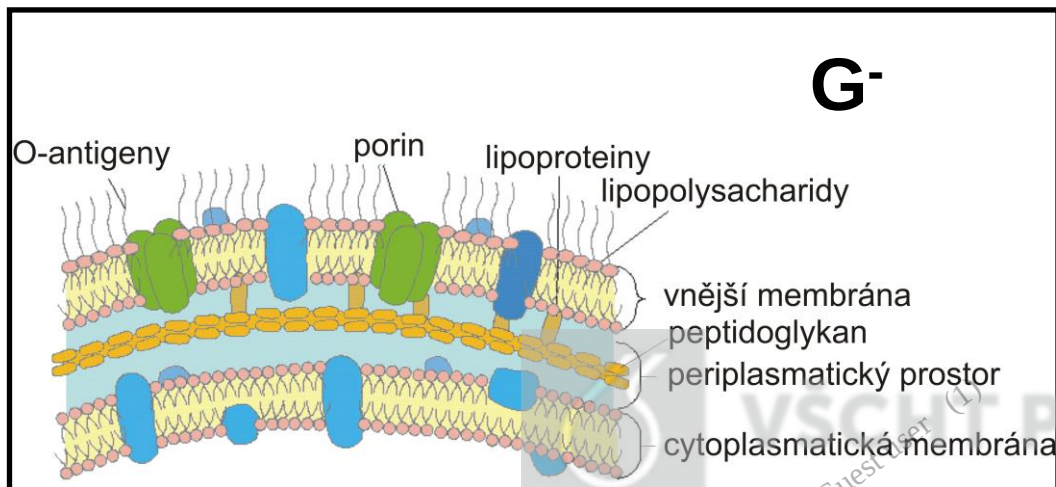


- Membránově vázané bílkoviny



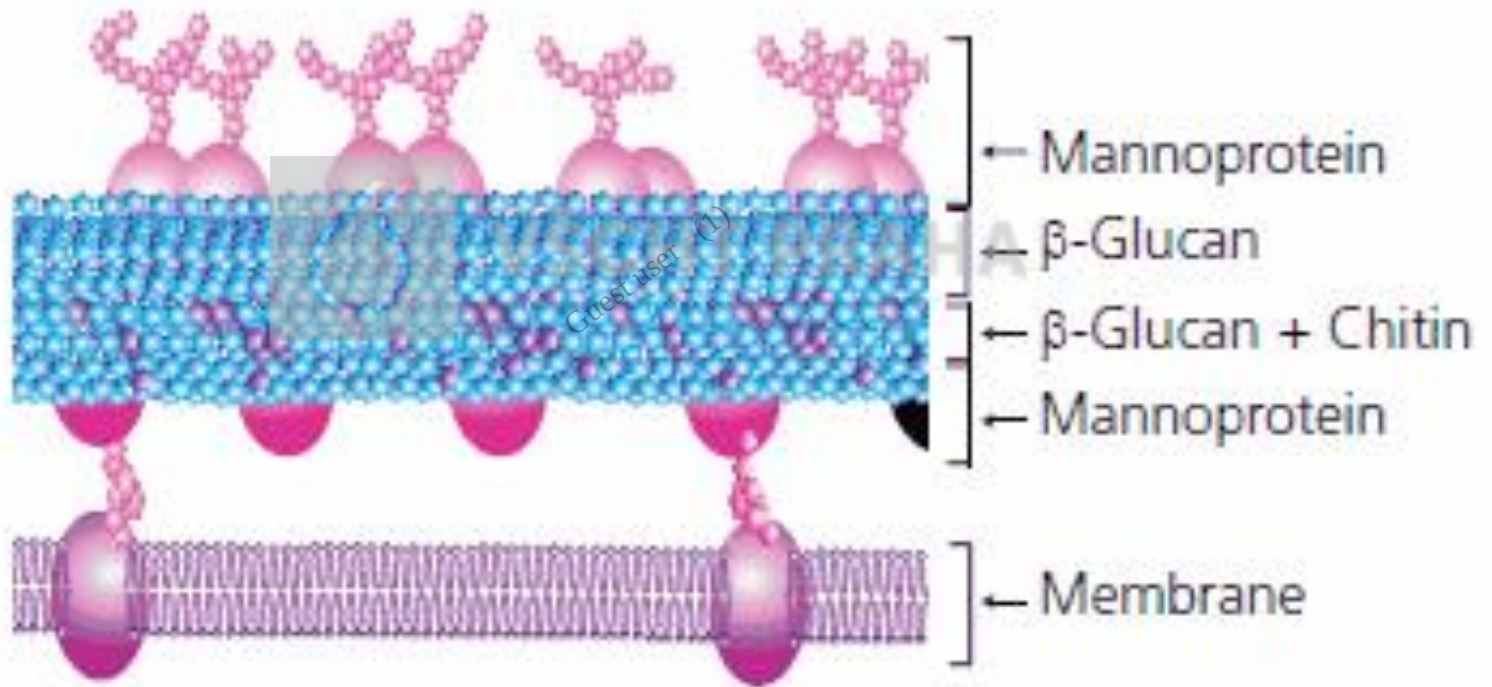
Mikroorganismy

Bakterie



Kvasinky

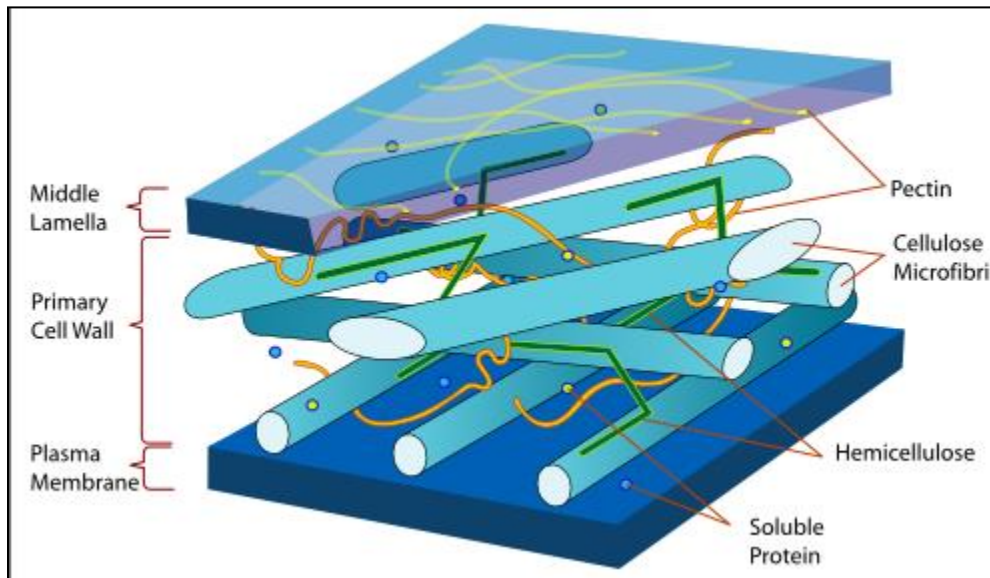
Yeast Cell Wall



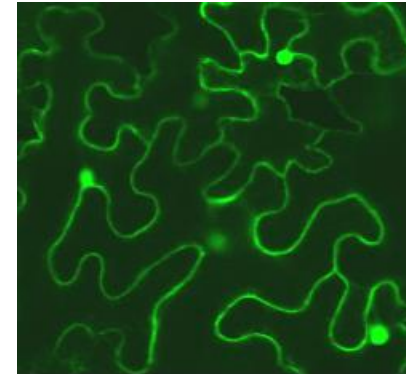
Rostlinné a živočišné buňky

Rostlinné buňky

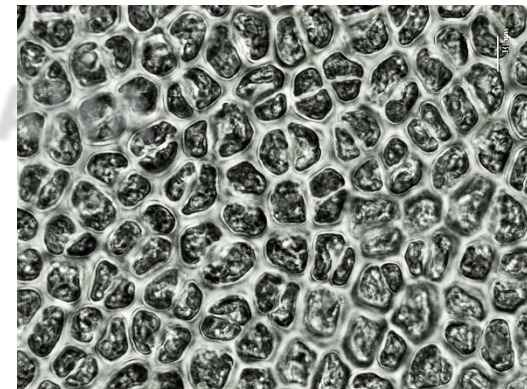
- rostlinné buňky mohou být větší
- rostlinné buňky mají silnější a robustnější buněčnou stěnu tvořenou hlavně celulosou
- rostlinné buňky se obtížně rozbíjejí
- kultivované rostlinné buňky jsou méně robustní než buňky izolované z živých rostlin



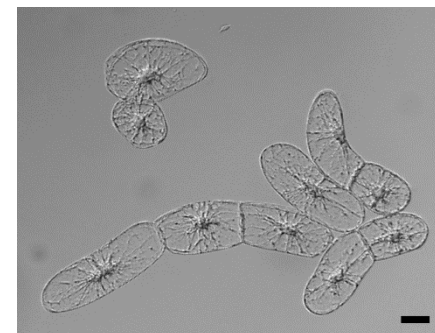
Nicotiana benthamiana



Ulva lactuca



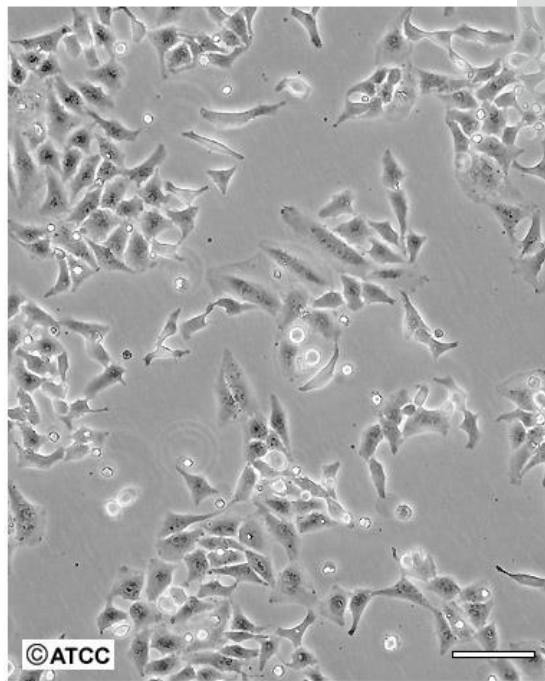
Tobacco cell line BY-2



Živočišné buňky

- nemají buněčnou stěnu
- jsou velmi křehké
- kultivované živočišné buňky jsou velké několik mikronů

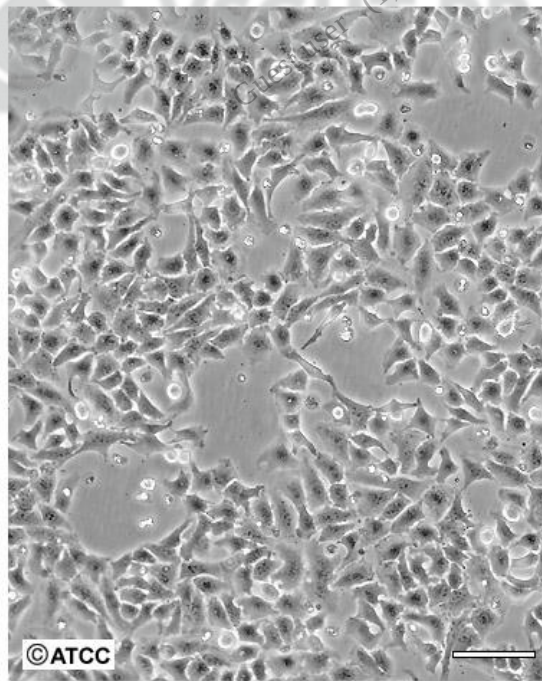
ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



©ATCC

Low Density

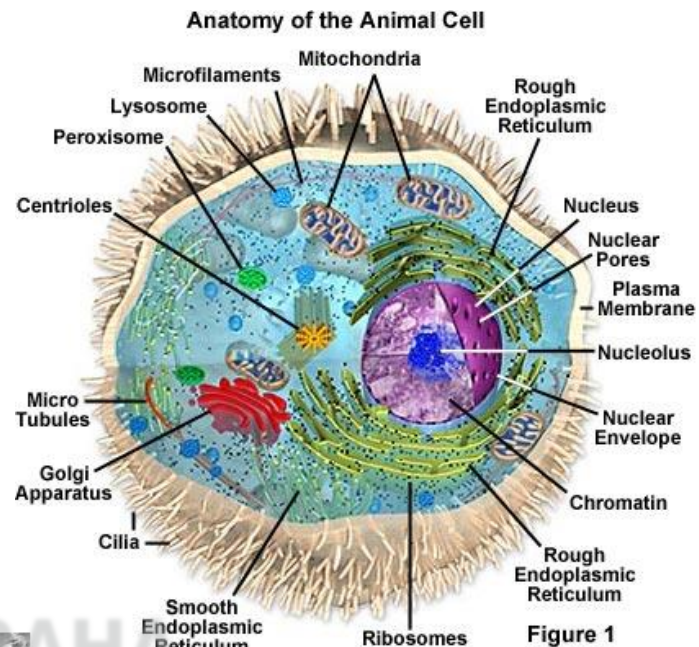
Scale Bar = 100µm



©ATCC

High Density

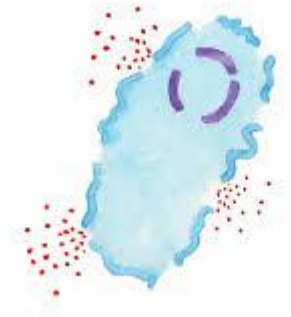
Scale Bar = 100µm



Dezintegrace buněk

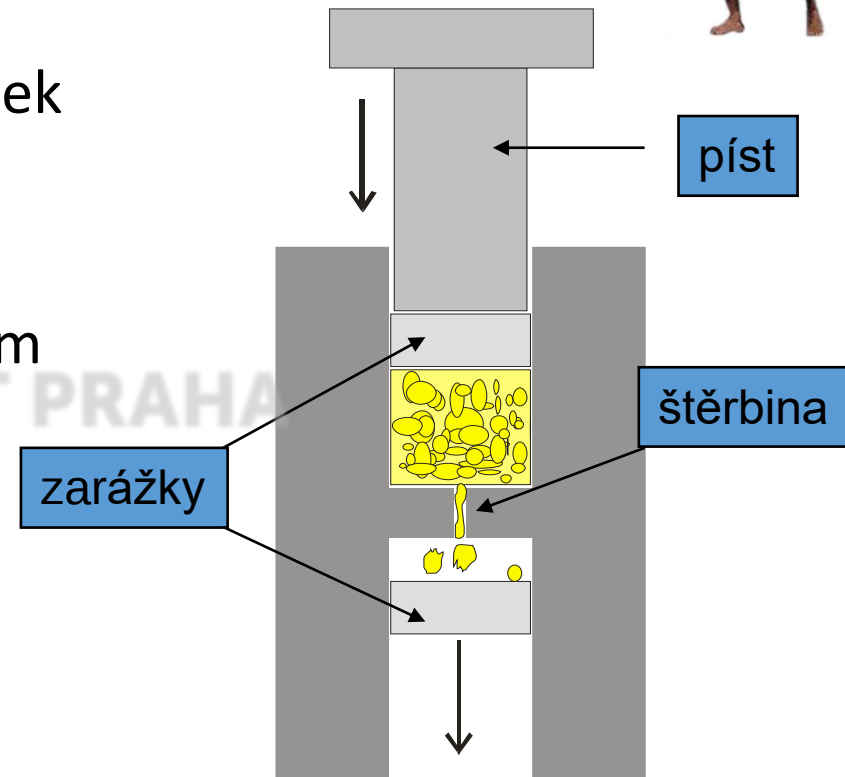
Způsoby

- fyzikální
- chemické
- enzymové



Fyzikální způsoby dezintegrace

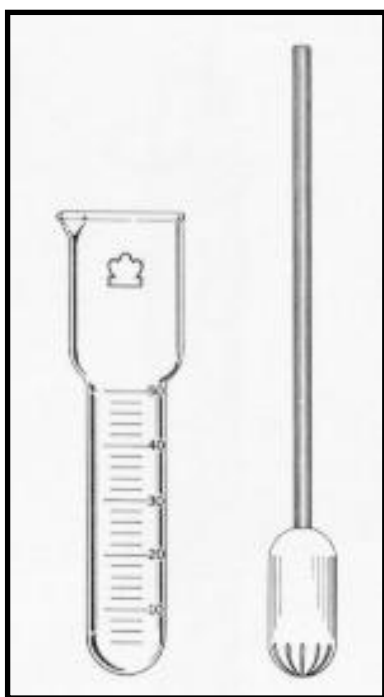
- Třecí miska + balotina, křemenný písek
- Střídavé zmrazování a rozmrazování
- X-press (protlačování zmražené suspenze malým otvorem pod velkým tlakem)



X-press



- Douncerův homogenizátor



- Mini-BeatBeater, FastPrep
— pomocí balotín – různé rozměry



- French press - protlačování tekuté suspenze malým otvorem pod velkým tlakem (136 MPa)

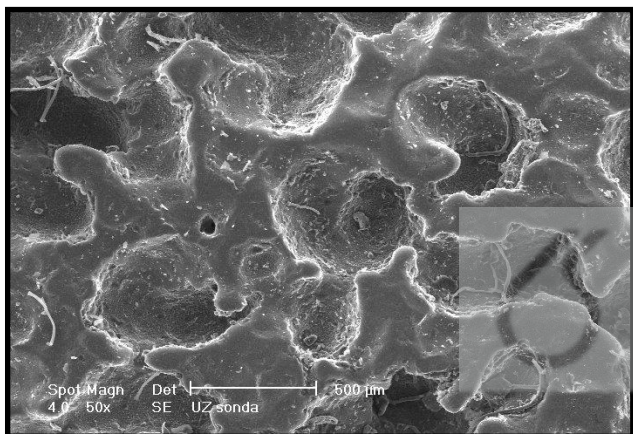


- One Shot Disruptor

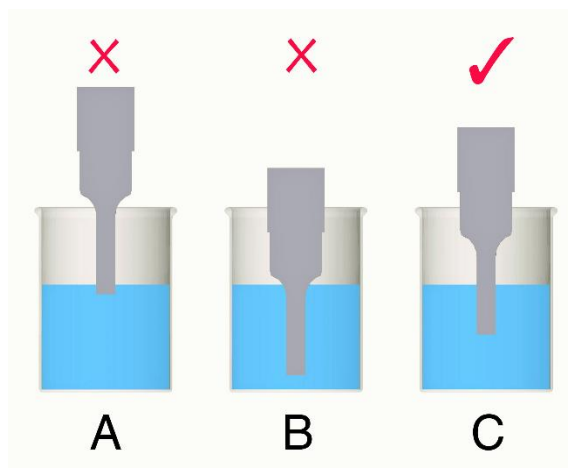
Power Rating	Volume per Shot vs Maximum Pressure			
	40 KPSI (2700 bar) Max Head	30 KPSI (2000 bar) Max Head	20 KPSI (1350 bar) Max Head	15 KPSI (1000 bar) Max Head
0.75 KW	1-8ml	1.5-10.5ml	2-16ml	3-20ml



• **Ultrazvuk** - intezita - nad 50 W/cm^2 – **kavitace**

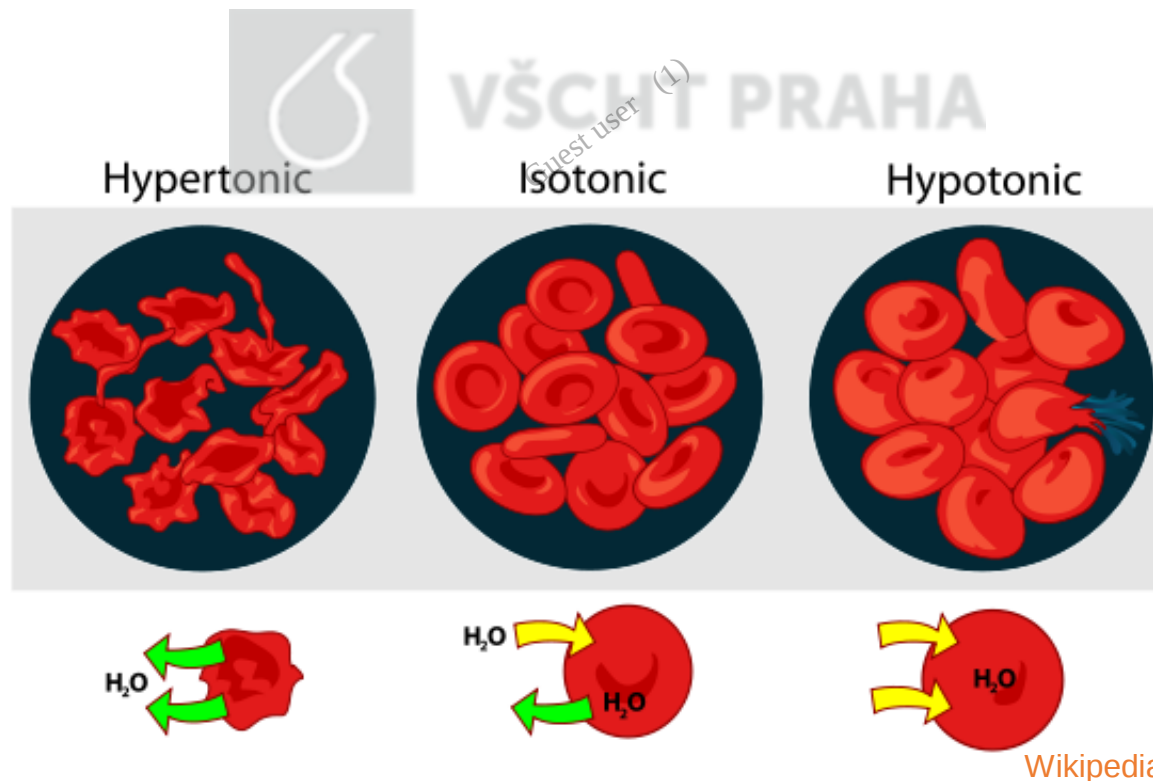


VŠCHT PRAHA
Guest user (1)

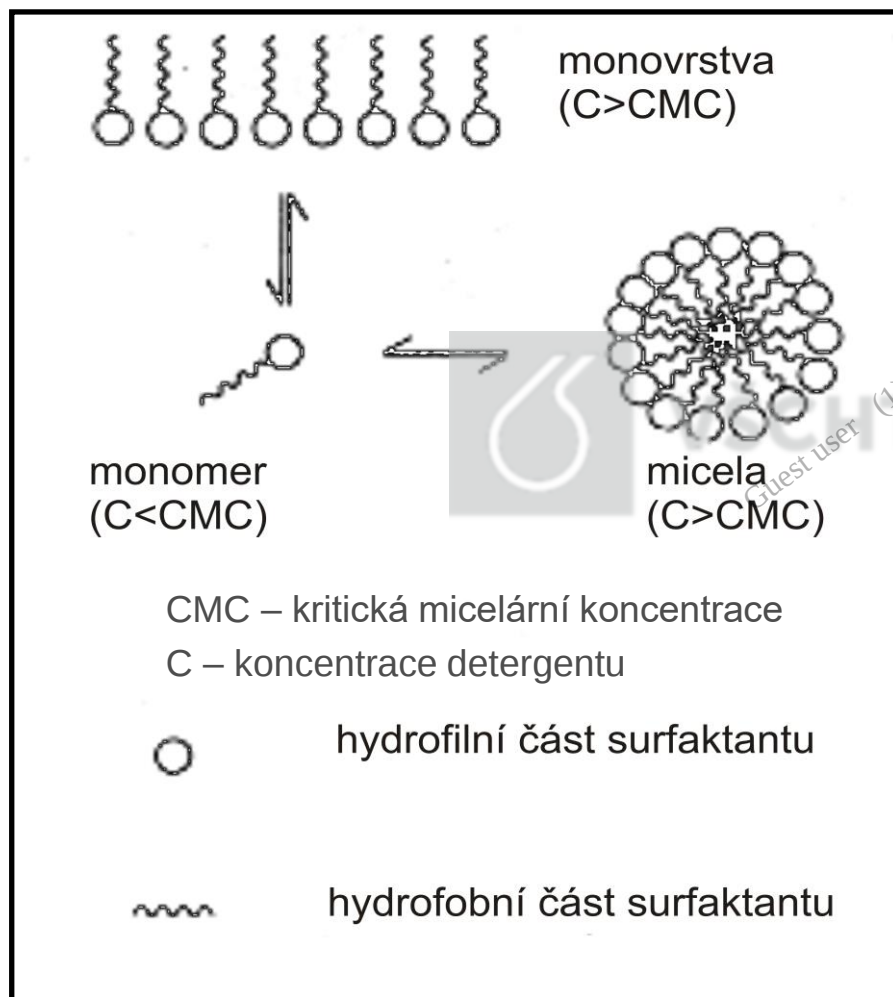


Chemické způsoby dezintegrace

- **acetonová sušina** -homogenizace buněk ve vychlazeném acetonu
- **osmotická lyse (erythrocyty)**-suspenze v hypotonickém prostředí
- **změna tlaku plynu**
- **přídavek org. rozpouštědla** - toluen, diethyleter, chloroform - (toluen extrahuje při 35 – 40 °C fosfolipidy buněčné stěny → osmotický šok + enzymová autolýza způsobí uvolnění buněčného obsahu)



•přídavkem detergentů

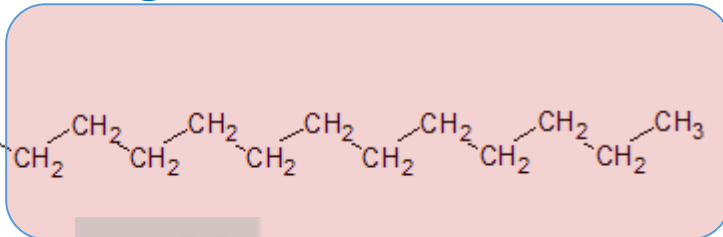
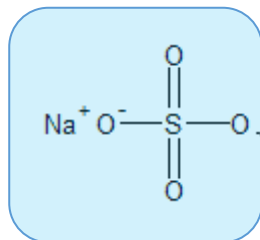


detergency

•neionogení

- ionogéní

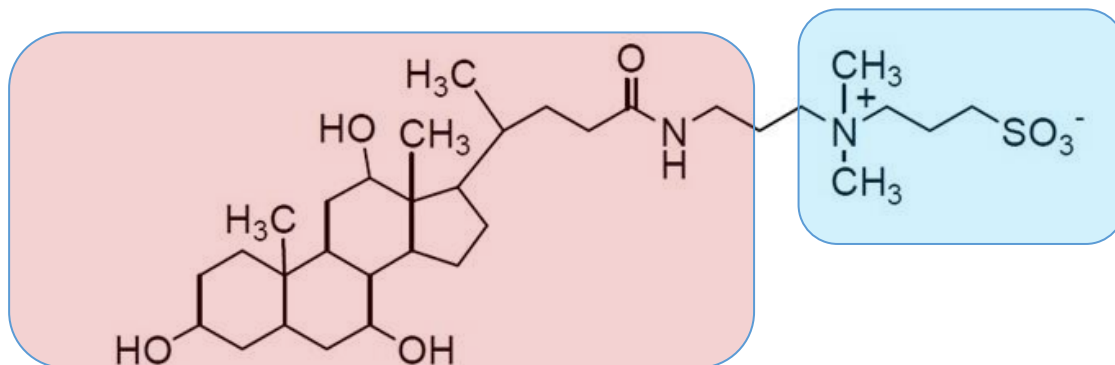
•aniogenní



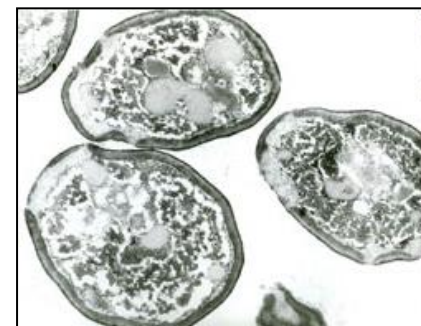
•katiogenní



- amfoterní



•These images show a *Streptococcus pyogenes* cell experiencing lysis after exposure to the enzyme PlyC. (Credit: Daniel Nelson/UMD)



•Y-PER Reagent significantly disrupts yeast cell wall and plasma membrane. Cells of *Saccharomyces cerevisiae* stain DY150 after lysis with Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent. Arrows indicate disruption of cell wall, resulting in cell lysis.

Detergent	CMC [mM]	MW [Da]	Odstranění dialýzou	aplikace
ANIOGENNÍ				
SDS(dodecylsulfát sodný)	8,3	288,4	👍	denaturace proteinů, použití pro DNA, PAGE
DOC(deoxycholát sodný)	1-4	416,6	👉	solubilizace membránových proteinů
N-lauroylsarkosin	7	488	👎	solubilizace membr. prot., příprava antigenů
KATIOGENNÍ				
CTAB (hexadecyltrimethyl amonium bromide)	4-5	337	👍	rozpuštění membrány, tvoří komplex s DNA, odstranění polysacharidů
NEIONOGENNÍ				
Triton X-100 [octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n]	0,2	647 n=10	👎	solubilizace proteinů
Tween 20 [poly(oxyethylene) _n sorbitan-monolaurate]	0,06		👎	imunoblotty, ELISA
NP-40	0,29	617	👎	rozbíjení membrán
AMFOTERNÍ				
CHAPS	4	614,9	👍	solubilizace membránových proteinů

Interference with protein assays

according to Stoscheck 1990 (modified)

Substance	Lowry*	BCA*	Bradford*	colloidal gold*	UV* 280 nm	UV* 205 nm
Brij [®] 35		1 %	X		1 %	1 %
CHAPS	1 mM	1 %	1 %		10 %	<0.1 %
Deoxycholate	0.0625 %		0.25 %		0.3 %	0.1 %
Digitonin					10 %	
Nonidet [®] P-40		1 %	X		X	
Octylglucoside		1 %	2 %		10 %	
SDS	1.25 %	1 %	0.1 %	0.1 %	0.1 %	0.1 %
Triton [®] X-100	0.25 %	1 %	0.1 %	1 %	0.02 %	<0.01 %
Tween [®] 20	0.1 %	1 %	X	1 %	0.3 %	0.1 %

X = interferes; * tolerable limit

Extrakce membránových proteinů

- neionogenní detergenty (Triton X-114)
- sonikace
- chelátová činidla
- alkalické podmínky (pH 8 – 11) plus nízká iontová síla
- částečně vodoumísitelná organická rozpouštědla (n-butanol)
- vysoká iontová síla (1M NaCl)
- fosfolipasy

Odstranění detergentů

vliv:

- fyzikální vlastnosti detergentu
- charakter proteinu (hydrofobní/hydrofilní)
- složení pufru

ionogenní

ionex

gelová chromatografie

naředění vzorku → dialýza

neionogenní

gelová chromatografie

afinitní chromatografie

Enzymové způsoby dezintegrace

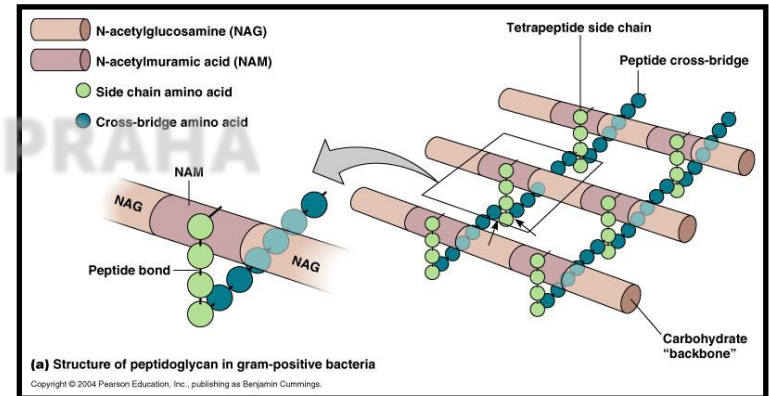
Bakterie

- Lysozym – nejčastěji z vaječných bílků, T4 fága

hydrolysa 1,4- β -glykosidické vazby mezi NAG a NAM

u G⁻ v kombinaci s chelatačním činidlem např. EDTA nebo polykationty, Tris

pH 6,7-8,6 (4-10)



Kvasinky

- zymolyasa, lytikasa – β -1,3-glukanasová aktivita

Rostlinné buňky

- celulasa, pektinasa
- macerozym – multienzymový komplex

(pektinasa, celulasa, hemicelulasa)

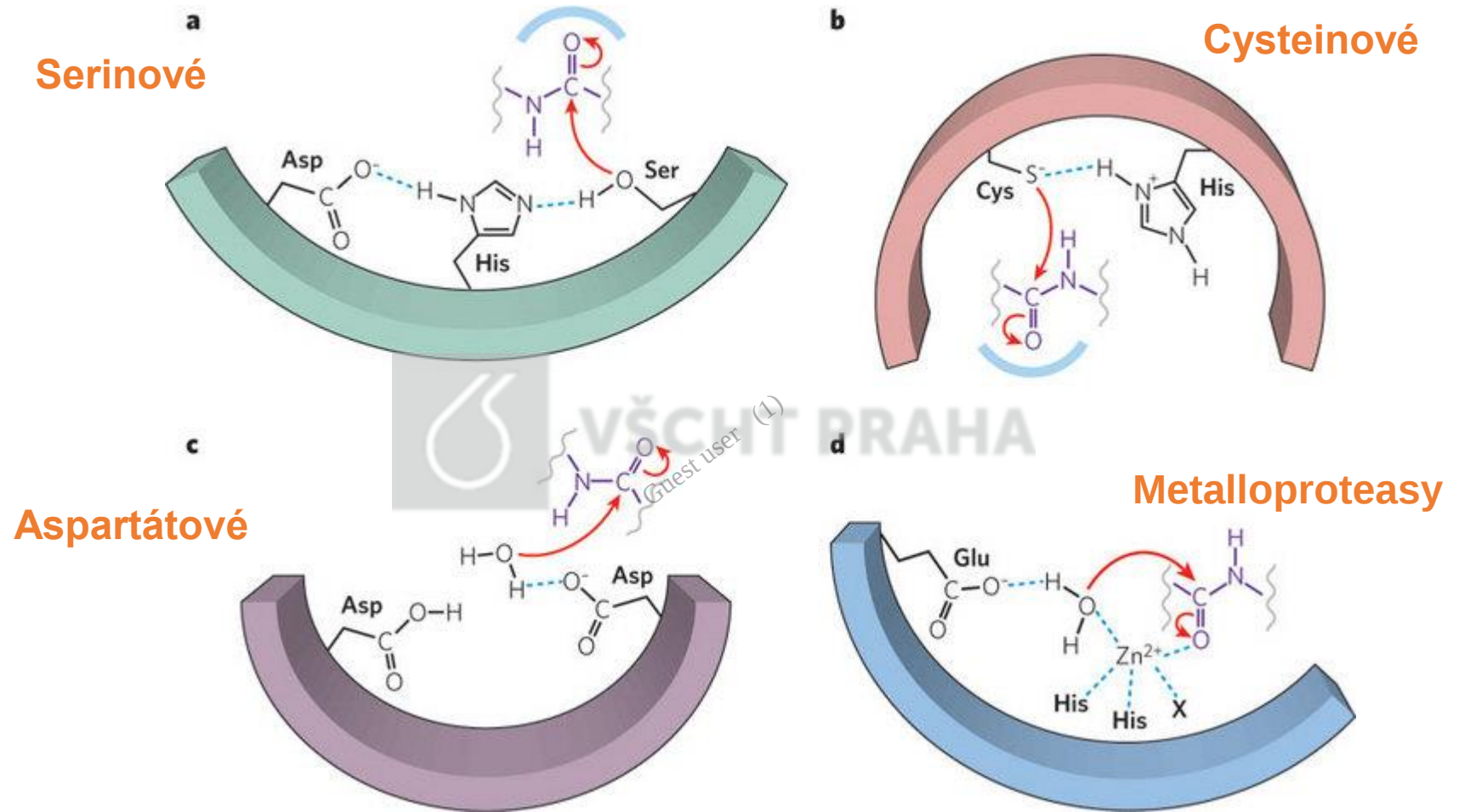
Jak vybrat správný postup dezintegrace?

- typ organismu
- předpokládaná stabilita proteinu
- lokalizace proteinu
- dostupné vybavení
- cena
- čas
- objem vzorku

sledování úspěšnosti dezintegrace



Problém - PROTEASY





Inhibitory proteas

Protease Inhibitor	General inhibitors for			
	Serine proteases ^a	Cysteine proteases ^b	Metallo-proteases ^c	Aspartic proteases ^d
Aprotinin		E-64	Phosphoramidon	Pepstatin
Pefabloc SC and Pefabloc SC PLUS			Bestatin (aminopeptidases)	
Leupeptin (<i>inhibits serine and cysteine proteases with trypsin-like specificity</i>)				
PMSF				
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*				
α ₂ -Macroglobulin				

Inhibitors included in the set	Specificity of inhibition	Quantity Supplied
Antipain-dihydrochloride	Papain, Trypsin, Cathepsin A and B	3 mg
Aprotinin	Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Kallikrein	0.5 mg
Bestatin	Aminopeptidases	0.5 mg
Chymostatin	α-, β-, γ-, δ-Chymotrypsin	1 mg
E-64	Cysteine Proteases	3 mg
EDTA-Na ₂	Metalloproteases	10 mg
Leupeptin	Serine and Cysteine Proteases such as Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0.5 mg
Pefabloc SC	Serine Proteases	20 mg
Pepstatin	Aspartic Proteases	0.5 mg
Phosphoramidon	Metalloproteinases, specifically Thermolysin	3 mg

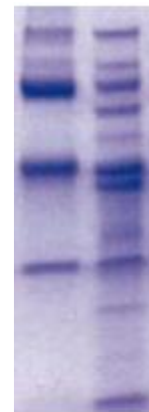
Protease inhibitor mixes

Product
Protease Inhibitor-Mix G universally applicable, without organic solvents
Protease Inhibitor Mix M - for mammalian cell extracts
Protease Inhibitor Mix P - for plant extracts
Protease Inhibitor Mix FY - for fungi and yeast extracts
Protease Inhibitor Mix HP PLUS - to purify polyHis fusion proteins

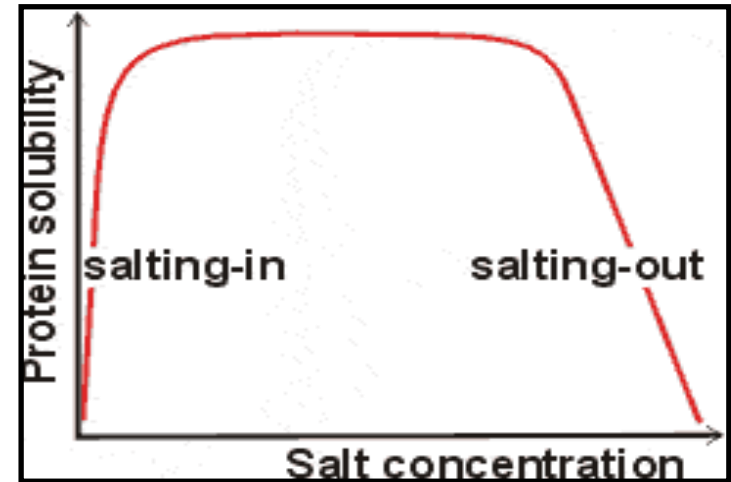
- ➔ AEBSF, Aprotinin, E-64, Leupeptin and EDTA
- ➔ free of EDTA and contains AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin and Pepstatin A.
- ➔ AEBSF, Bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin A, and 1,10-Phenanthroline
- ➔ AEBSF, E-64, Pepstatin A, and 1,10-Phenanthroline.
- ➔ AEBSF, Bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin A, and Phosphoramidon

inhibitor proteas

+ -



Problém - STABILITA PROTEINŮ



- **soli** – stabilizují proteiny v roztoku

Hofmeisterova řada



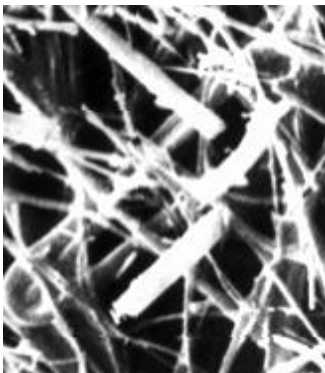
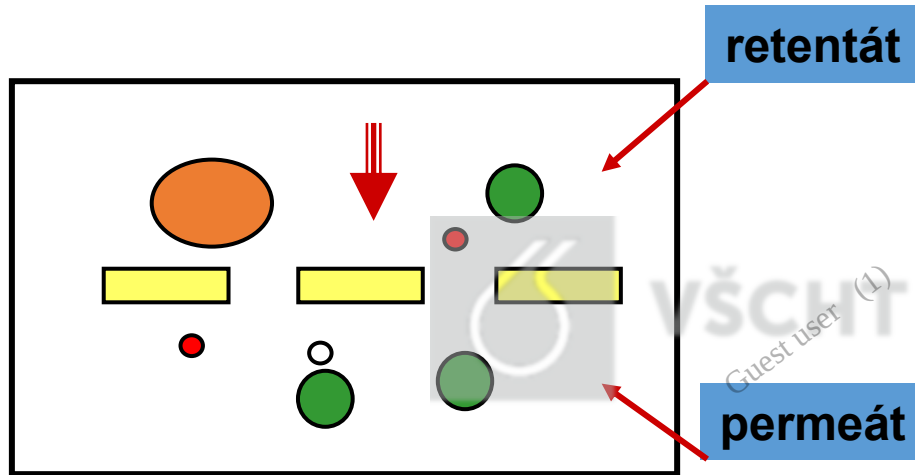
- **proteiny** – např. BSA

- **redukční činidla** – β -merkaptoethanol (5-20 mM), DTT (0,5-1 mM)

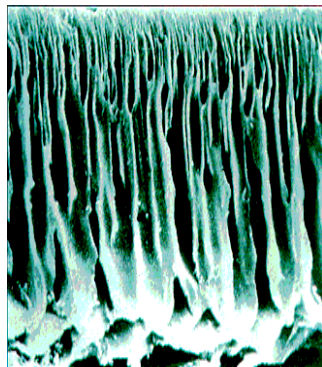
- **osmolyty** – polyalkoholy, glycerol, mono- a polysacharidy,
neutrální polymery 10 – 40 %
aminokyseliny – nenabité (Gly, Ala) 20-500 mM
polymery (PEG) 1-15 % zvyšuje viskozitu a tak zabraňuje
agregaci

Membránové procesy - filtrace

- rozdělení molekul z roztoku na základě jejich velikosti, definovaná velikost pórů = „cut off“ (μm , Da), gravitace, inertní plyn



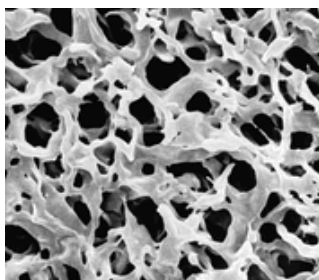
mikroporesní



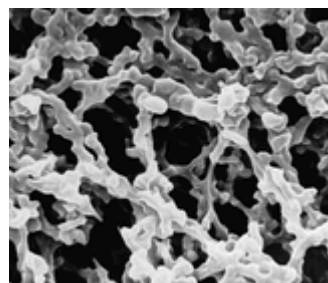
anizotropní



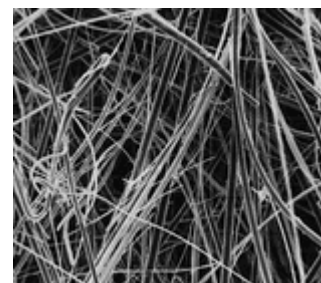
	PVDF	PES	TEFLON	NYLON	NITRO- CELULOZA	ACETÁT CELULOSY	SKLENĚNÁ VLÁKNA
Hydrophilic	✓	✓		✓		✓	✓
Hydrophobic			✓		✓	✓	✓
Autoclave	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Flow rate	High	High	High to very high	Low to medium	High	High	Very high
Throughput	Low	High	High	Low	Medium	Medium	Very high
Extractables	Low	Low	Very low	Very low	Medium	Medium	Low
Protein binding	Low	Low	Very low	High	High	Low	Medium



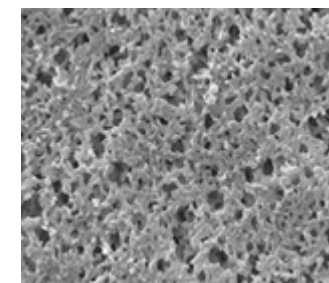
PVDF



estery cellulosity



**skleněná a křemenná
vlákna**



nylon

charakteristika membrán

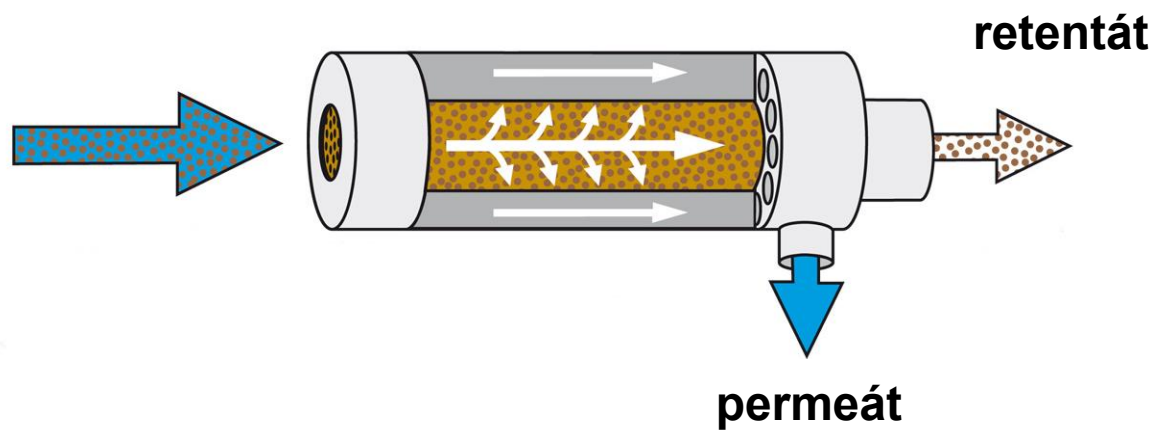
- dělicí rozsah – NMWL ~ MWCO, NCO
- průtočnost membrány
- rozsah povolených pracovních teplot, tlaků a pH
- odolnost membrán
- životnost

Membrane: Durapore Membrane Filters - PVDF (Polyvinylidene fluoride)	
Features: Low Protein Binding	
Specifications:	
Pore sizes:	0.1, 0.22, 0.45, 0.65, 5 µm
Color:	White
Surface:	Plain
Wettability:	Hydrophilic, hydrophobic
Thickness:	125 µm
Sterilization:	by autoclave (121°C at 1 bar), EO or gamma
Operating temperature:	85°C max.
Gravimetric extractables:	<0.5%
Protein binding capacity:	4 µg/cm ²

Mikrofiltrace

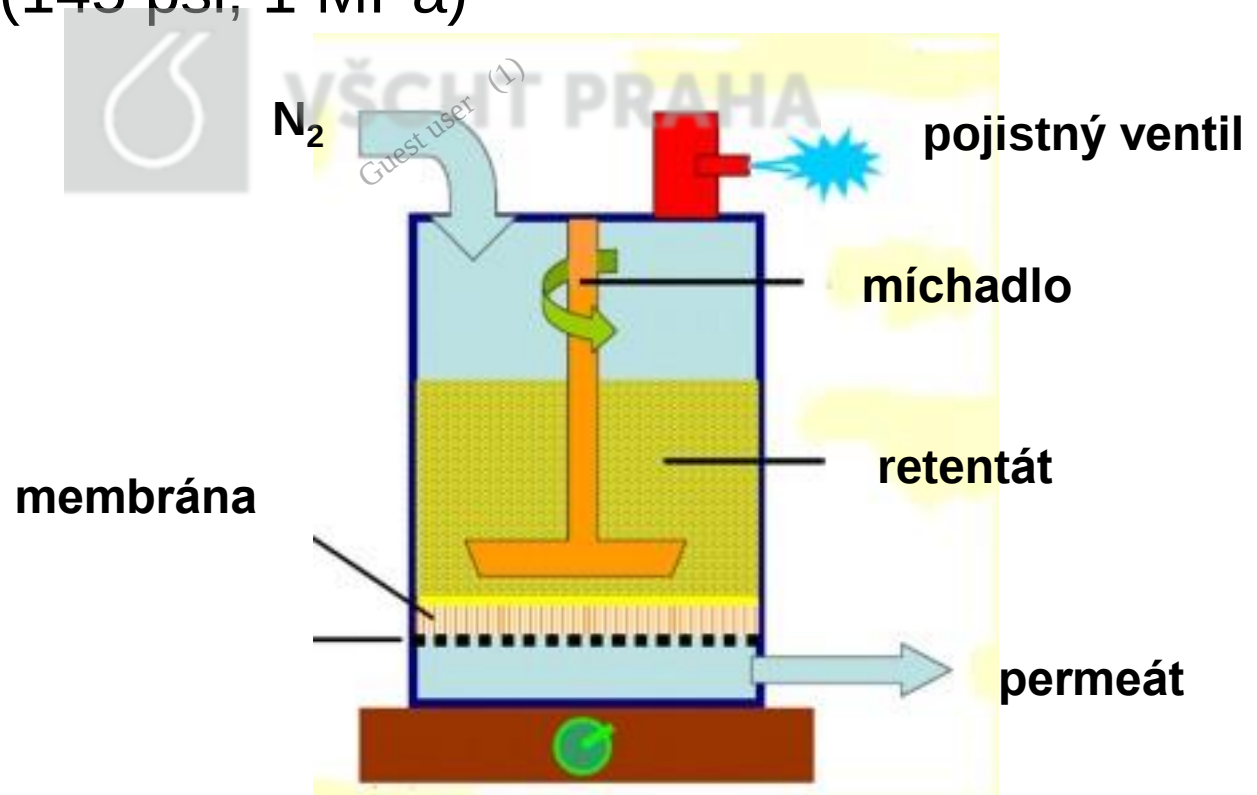
- separace koloidních a nerozpustných částic (bakterie, barevné pigmenty, kvasinky)
- 0,1-10 μm
- hnací silou - rozdíl tlaku
- potřebný tlak - nízký





Ultrafiltrace

- separace např. bílkovin, virů
- frakcionace bílkovin
- velikost pórů přibližně 10 nm do 0,1 μm
- hnací silou – rozdíl tlaků
- tlak > 10 bar (145 psi, 1 MPa)

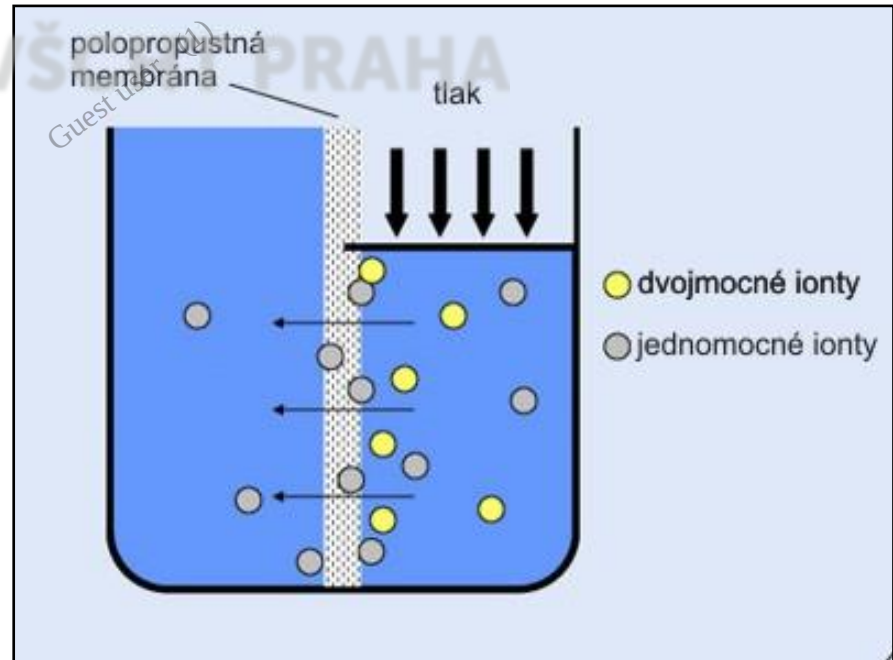


Nanofiltrace

- separace nízkomolekulárních látek
- velikost pórů přibližně 1 nm do 10 nm ~ 200 – 15000 g/mol
- hnací silou – rozdíl tlaků 50-100 psi

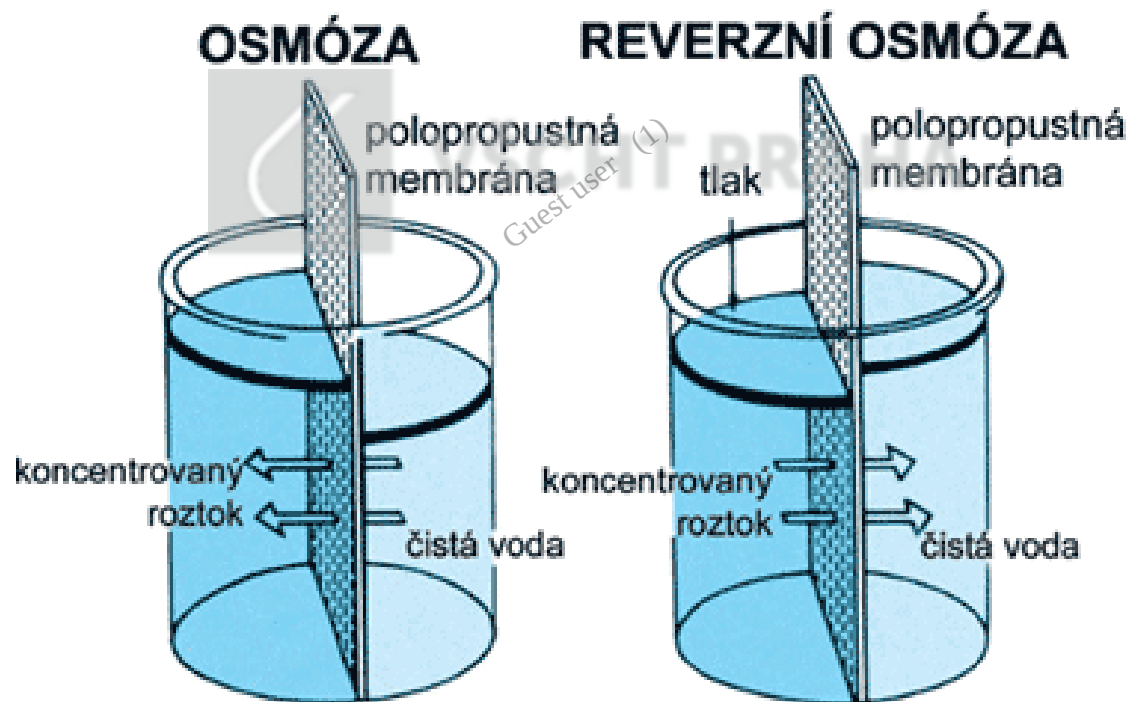
Použití

- odsolování potravin
- odsolování syrovátky
- zakoncentrovávání

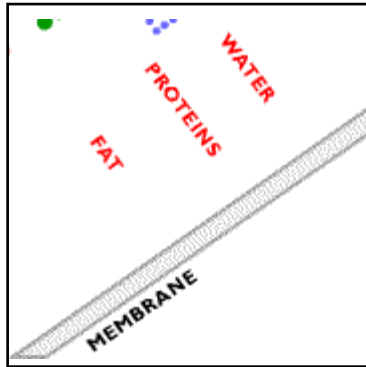


Reverzní osmóza

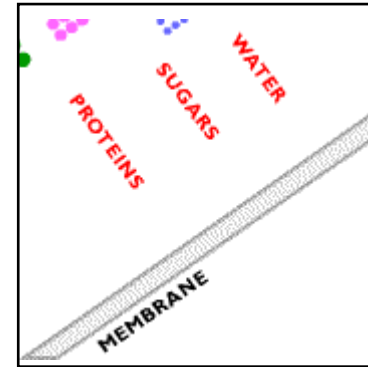
- separace nízkomolekulárních látek menší než 200 g/mol
- hnací silou – rozdíl tlaků



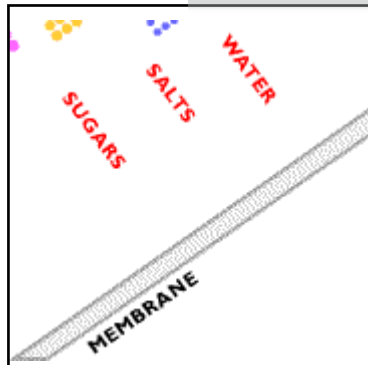
Mikrofiltrace



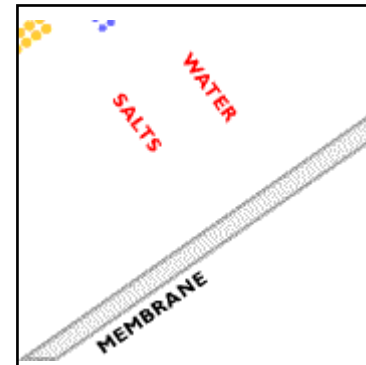
Ultrafiltrace



Nanofiltrace



Reverzní osmóza



Mikrofiltrace

0,1 - 10 μm
1 - 9 bar

Ultrafiltrace

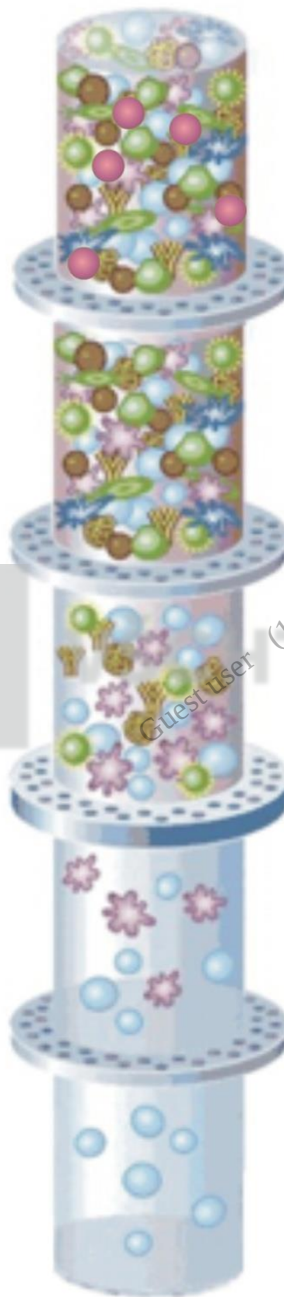
0,01 - 0,1 μm
5 - 14 bar

Nanofiltrace

0,001 - 0,01 μm
7 - 41 bar

Reversní osmóza

0,001 - 0,0001 μm
28 - 68 bar

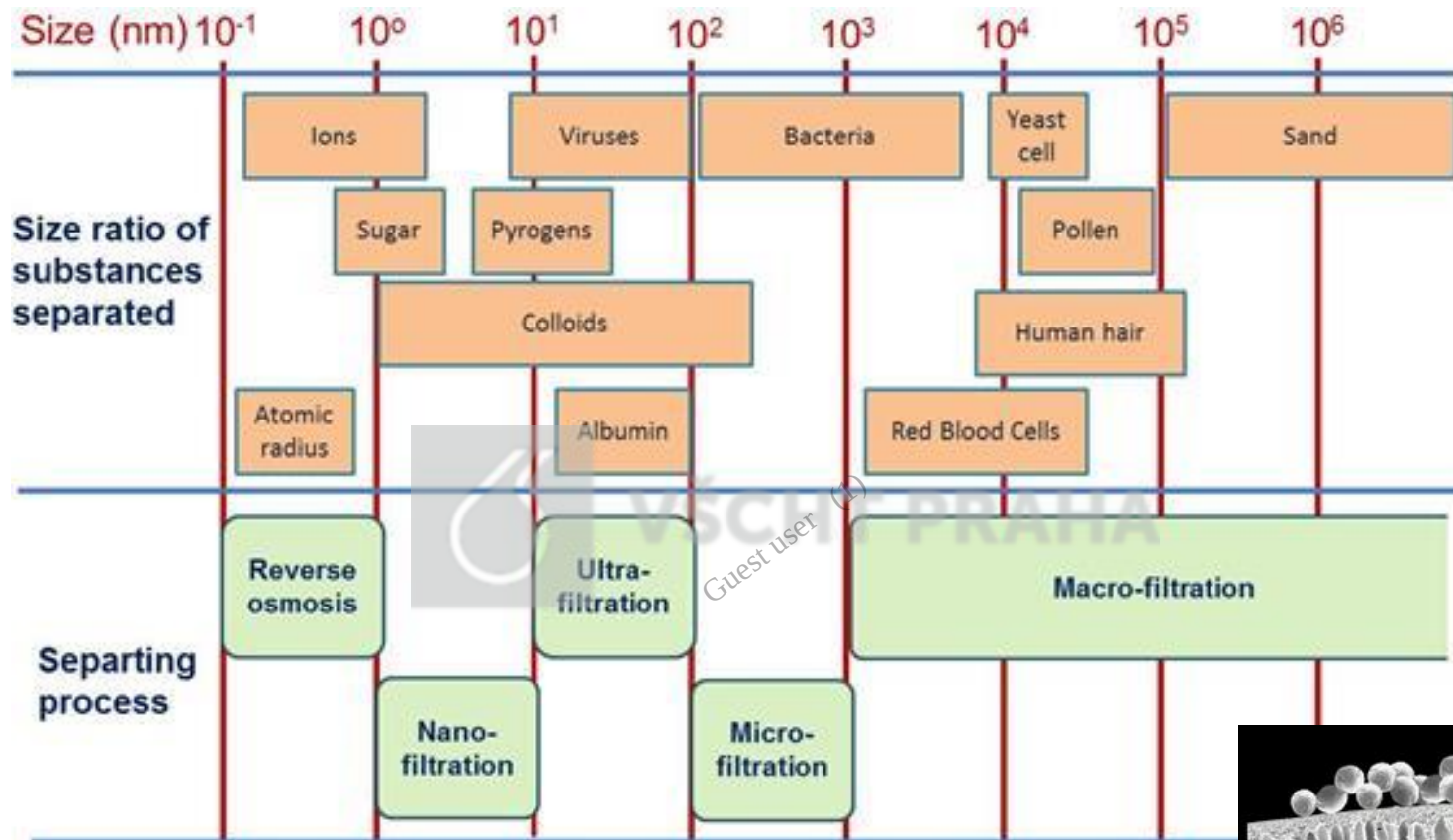


bakterie, červené krvinky,
barevné pigmenty,
nerozpustné částice

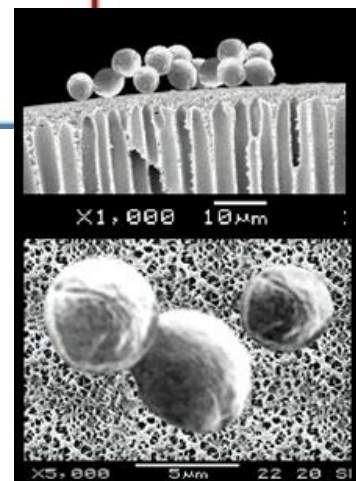
viry, proteiny/enzymy,
olejové emulze

aminokyseliny, cukry,
antibiotika, soli

jednomocné ionty,
voda

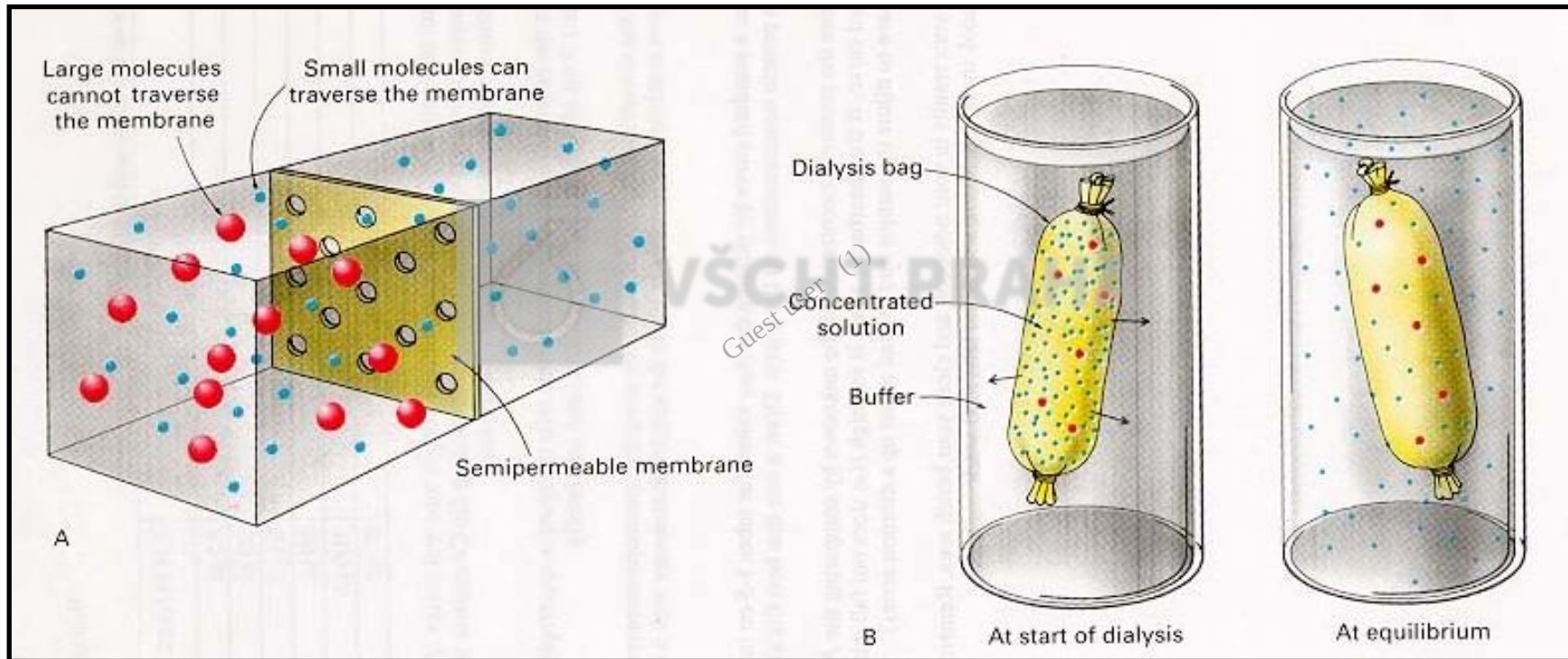


zygote - *Cryptosporidium*

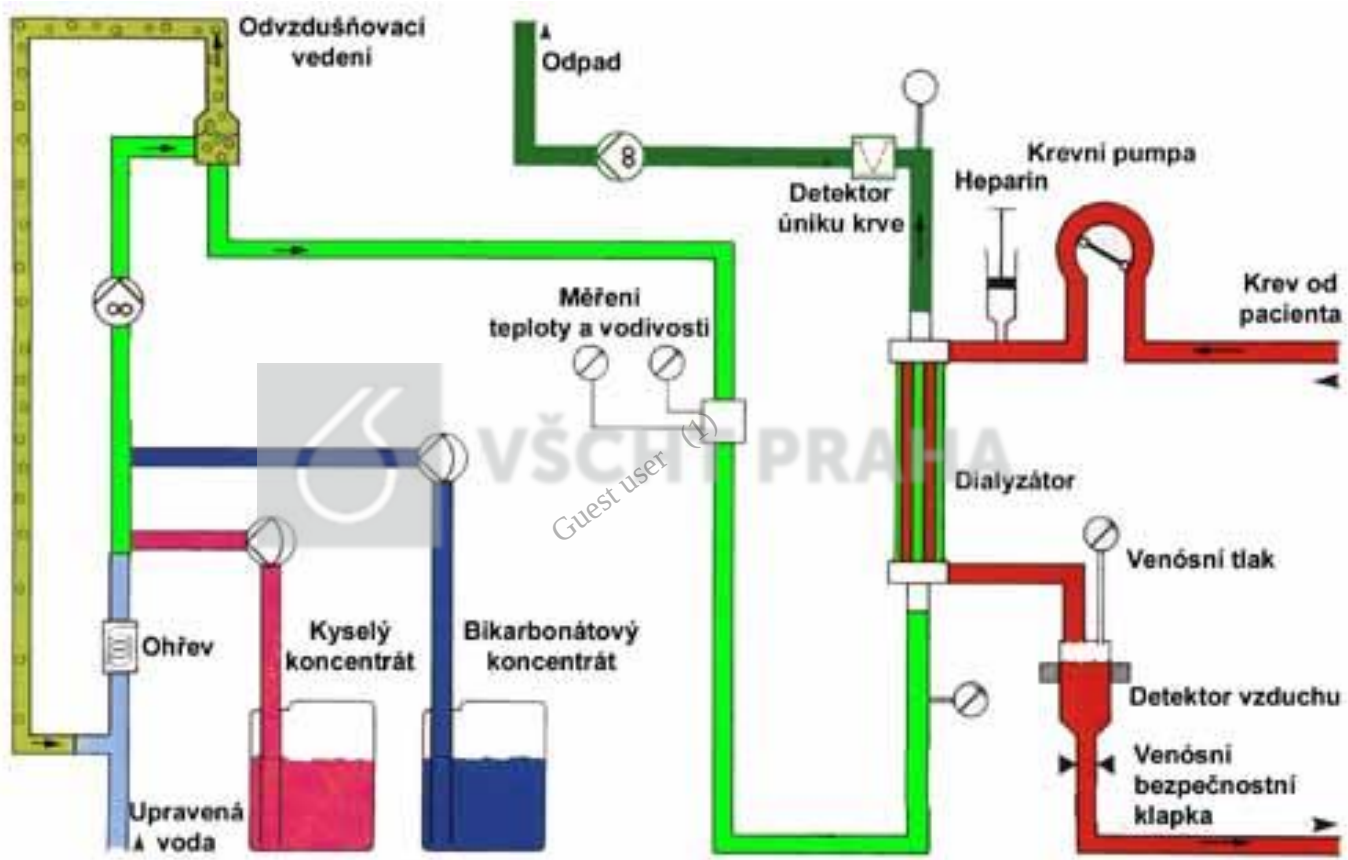


Dialýza

- difuze nízkomolekulárních látek polopropustnou membránou



Princip hemodialyzy

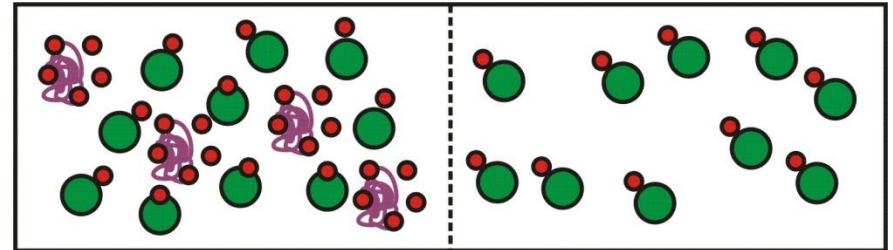


•http://www.inmed.cz/index.php?page=princip_dialyzy

Příklady:

Na⁺

$$\varphi_M = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{Na1}}{c_{Na2}}$$



Cl⁻

$$\varphi_M = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{Cl1}}{c_{Cl2}}$$

$$\frac{RT}{F} \ln \frac{c_{Na1}}{c_{Na2}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{Cl2}}{c_{Cl1}}$$

$$c_{Na1} c_{Cl1} = c_{Na2} c_{Cl2}$$

* Do jednoho prostoru dialyzační nádoby je umístěn roztok proteinu o koncentraci 0,1 mmol/l, který je při pH 7 ve svém isoelektrickém bodě. Tento roztok obsahuje ještě 10 mM NaCl. V druhém prostoru o stejném objemu je deionizovaná voda. Jaké bude rozložení iontů po ustanovení rovnováhy?

$$C_{Na1} C_{Cl1} = C_{Na2} C_{Cl2}$$

$$(10 - x)^2 = x \cdot x$$

$$100 - 20x + x^2 = x^2$$

$$100 = 20x$$

$$x = 5 \text{ mmol} / l$$



$$c_{Na1} = 5 \text{ mmol} / l$$

$$c_{Cl1} = 5 \text{ mmol} / l$$

$$c_{Na2} = 5 \text{ mmol} / l$$

$$c_{Cl2} = 5 \text{ mmol} / l$$

* Do jednoho prostoru dialyzační nádoby je umístěn roztok proteinu o koncentraci **0,1 mmol/l**, který při pH 7 nese volný náboj -7; je tedy ve formě soli, v našem případě např. sodné. Tento roztok obsahuje ještě 10 mM NaCl. V druhém prostoru o stejném objemu je deionizovaná voda. Jaké bude rozložení iontů po ustanovení rovnováhy?

$$C_{Na1}C_{Cl1} = C_{Na2}C_{Cl2}$$

$$(0,1 + (10 - x))(10 - x) = x^2$$
$$x = 5,17 \text{ mmol / l}$$



$$c_{Na1} = 5,53 \text{ mmol / l}$$

$$c_{Cl1} = 4,83 \text{ mmol / l}$$

$$c_{Na2} = 5,17 \text{ mmol / l}$$

$$c_{Cl2} = 5,17 \text{ mmol / l}$$

* Do jednoho prostoru dialyzační nádoby je umístěn roztok proteinu o koncentraci **100 mmol/l**, který při pH 7 nese volný náboj -7; je tedy ve formě soli, v našem případě např. sodné. Tento roztok obsahuje ještě 10 mM NaCl. V druhém prostoru o stejném objemu je deionizovaná voda. Jaké bude rozložení iontů po ustanovení rovnováhy?

$$C_{Na1}C_{Cl1} = C_{Na2}C_{Cl2}$$

$$(100.7 + (10 - x))(10 - x) = x^2$$

$$x = 0,139 \text{ mmol/l}$$

⇓

$$c_{Na1} = 700,139 \text{ mmol/l}$$

$$c_{Cl1} = 0,139 \text{ mmol/l}$$

$$c_{Na2} = 9,861 \text{ mmol/l}$$

$$c_{Cl2} = 9,861 \text{ mmol/l}$$

* Zásobní roztok sodné soli proteinu ($c=3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) měl takové pH, že jeho volný náboj činil -5. Roztok dále obsahoval pufr s přidavkem 0,1 M NaCl. Do druhého prostoru o stejném objemu je umístěn pufr, který neobsahuje ani sodné ani chloridové ionty. Jaké bude rozložení chloridových a sodných iontů po ustanovení rovnováhy?

$$c_{Na1} c_{Cl1} = c_{Na2} c_{Cl2}$$

$$(5.3 \cdot 10^{-3} + (0,1 - x))(0,1 - x) = x^2$$

$$(0,115 - x)(0,1 - x) = x^2$$

$$0,0115 = 0,215x$$

$$c_{Na2} = c_{Cl2} = 0,05 \text{ mol / l}$$



$$c_{Na1} = 0,065 \text{ mol / l}$$

$$c_{Cl1} = 0,05 \text{ mol / l}$$

$$c_{Na2} = 0,05 \text{ mol / l}$$

$$c_{Cl2} = 0,05 \text{ mol / l}$$



* Zásobní roztok sodné soli proteinu ($c=3 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měl takové pH, že jeho volný náboj činil -5. Roztok dále obsahoval 0,1 M NaCl. Proti jakému objemu vody je nutno dialyzovat 0,1 l tohoto roztoku, aby po ustanovení rovnováhy klesla koncentrace iontu Na^+ v roztoku bílkoviny na 0,02 mol/l?

$$c_{\text{Na}1} c_{\text{Cl}1} = c_{\text{Na}2} c_{\text{Cl}2}$$

$$0,02 \cdot (0,02 - 5 \cdot 3 \cdot 10^{-3}) = c_{\text{Na}2} \cdot c_{\text{Cl}2}$$

$$c_{\text{Na}2} = c_{\text{Cl}2} = \sqrt{0,0001} = 0,01 \text{ mol / l}$$

$$n_{\text{Cl}2} = n_0 - n_{\text{Cl}1}$$

$$n_{\text{Cl}2} = V_1 \cdot c_0 - V_1 \cdot c_{\text{Cl}1}$$

$$n_{\text{Cl}2} = 0,1 \cdot 0,1 - 0,1 \cdot 0,005$$

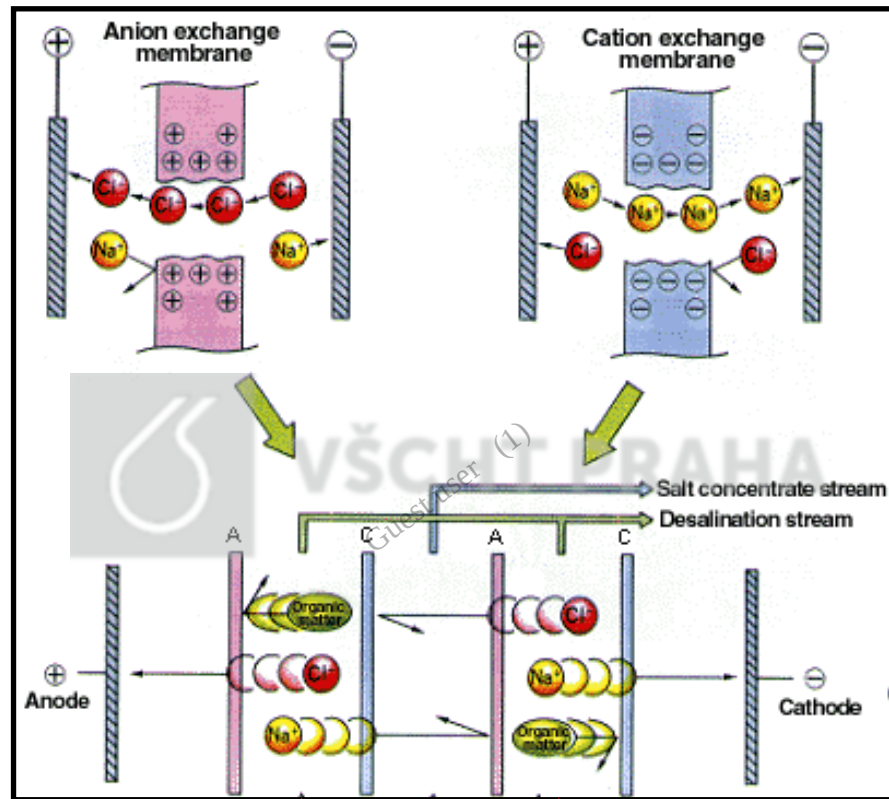
$$n_{\text{Cl}2} = 0,0095 \text{ mol}$$

⇓

$$V_2 = \frac{n_{\text{Cl}2}}{c_{\text{Cl}2}}$$

$$V_2 = \frac{0,0095}{0,01} = 0,95 \text{ l} \quad \checkmark$$

Elektrodialyza



vzorek

anionaktivní iontově
selektivní membrána

kationaktivní iontově
selektivní membrána



- odsolování syrovátky
- odsolování mořské vody
- odstraňování nitrátů z pitné vody
- odstraňování kyselin z organických produktů
- odstranění kyselosti džusu

další způsoby odsolování a zahušťování:

- gelová chromatografie - Sephadex G-25, BioGel P-3
- vakuové odpařování
- použití polyethylenglykolu
- lyofilizace
- precipitace
- chromatografie na reverzní fázi (C4)
- ionexová chromatografie

