

OPTIMIZACIJA DIAFILTRACIJE IN KONCENTRIRANJA PROTEINSKIH ELUCIJ KOT PRIPRAVA NA SUŠENJE / OPTIMIZATION OF DIAFILTRATION AND CONCENTRATION OF PROTEIN ELUTIONS AS PREPARATION FOR DRYING

Marko Kete¹, Blaž Grile², Nika Osel², Mateja Fračeskin Krapež¹, Alja Kisilak¹

¹Arhel d.o.o., Slovenija, marko.kete@arhel.si

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija

UVOD / INTRODUCTION

Namen diafiltracije proteinskih elucijskih frakcij (LF/LPO/BLG) je odstranitev soli in morebitno prisotnih drugih sirotkinih proteinov iz raztopine s proteinskim produktom. Z uporabo membrane z ustrežno velikostjo por (50 kDa – LF/LPO in 10 kDa – BLG) in dodajanjem vode v raztopino omogočimo zadrževanje LF/LPO/BLG na retentatni strani, medtem ko voda z raztopljenimi solmi odteka preko permeatne strani membrane. Za diafiltracijo smo uporabljali tangencialno filtracijo s t.i. hollow fiber membranami proizvajalca Watersep (mini-Bioproducer24). Višje izkoristke sušenja v FBDS komori in ugoden potek samega sušenja je doseženo le ob dovolj visoki vsebnosti proteinskega produkta, medtem ko je za doseganje končnega odmerka potrebno doseči tudi dovolj visoko čistost, kar velja predvsem za LF zgoščino, in nizko vsebnost soli v vseh omenjenih proteinskih zgoščinah namenjenih sušenju. S sledenjem različnim fizikalno kemijskim lastnostim kot so: vsebnost vode, suha snov, ki razpade v hlapne produkte, nehlapna suha snov, koncentracija in čistost LF, skupni proteini, prevodnost zgoščine in pH smo določili ključne parametre, ki morajo biti izpolnjeni, da postopek sušenja v FBDS komori dosega visoke izkoristke, je ponovljiv in je hkrati v suhem produktu dosežena ciljna vsebnost učinkovine (LF).

The purpose of protein elution fractions (LF/LPO/BLG) diafiltration is to remove salts and other whey proteins present from the protein product concentrate. By using a membrane with an appropriate pore size (50 kDa - LF/LPO and 10 kDa - BLG), addition of water to the solution on retentate side, LF/LPO/BLG is retained on the retentate side, while water with dissolved salts flows through to permeate side of the membrane. For diafiltration we used tangential filtration using hollow fiber membranes from Watersep (mini-Bioproducer24). In order to achieve higher drying efficiency in the FBDS chamber and a stable drying process, it was necessary to achieve a sufficiently high content of protein product in the protein concentrate, a sufficiently high purity, especially for LF, and low content of salts in all three protein concentrates used for drying tests. We followed various physicochemical properties of protein concentrates, such as: water content, dry matter that decomposes into volatile products, non-volatile dry matter, concentration and purity of LF, total proteins, conductivity of concentrate and pH. After reviewing the data we determined the key parameters that must be met for the drying process in the FBDS chamber in order to achieve high efficiency, repeatability of the process and at the same time that the target content (LF) is achieved in the dry product.

REZULTATI

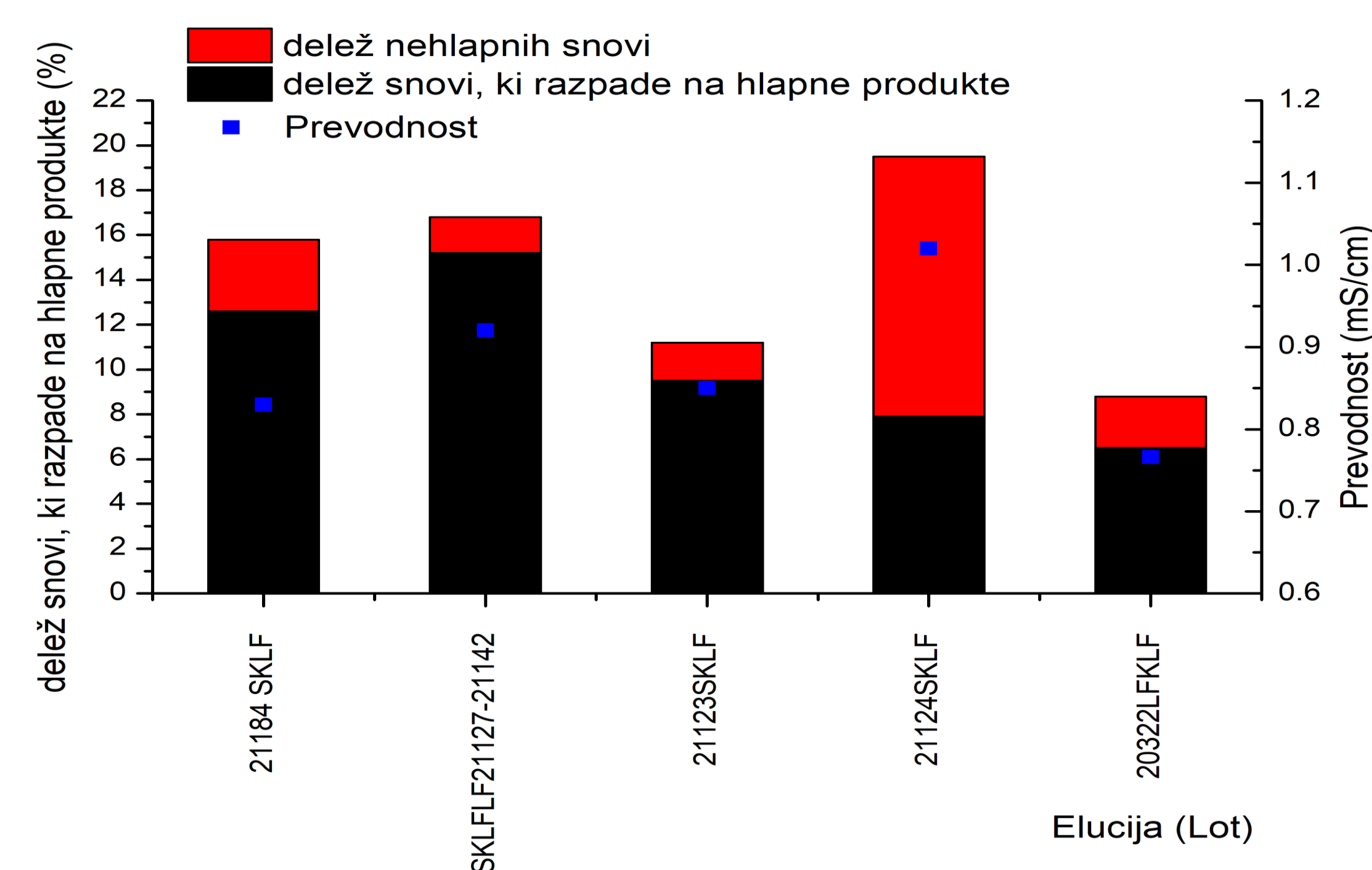
Rezultati, pridobljeni z merjenjem prevodnosti in termo gravimetričnim analizatorjem (TGA, Slika 1) so pokazali, da nekateri koncentri LF po diafiltraciji še vedno vsebujejo večjo maso nehlapnih snovi, kar je predvsem posledica nezadovoljive odstranitve soli (NaCl) in se odraža tudi v višji prevodnosti raztopine. S podaljšanjem postopka diafiltracije smo poskusili dodatno znižati vsebnost soli in povišati vsebnost, ki razpade na hlapne snovi (proteini) ter to tudi dosegli. Poudariti je potrebno, da k prevodnosti zgoščine doprinesejo tudi prisotni proteini oz. proteinski izolat, zato se s podaljšanjem diafiltracije le ta ne zniža občutno, a kljub temu nakazuje na še dodatno zmanjšanje vsebnosti soli (Slika 1). Rezultati, ki v povzetku niso predstavljeni, so pokazali tudi, da vsebnost soli ter prisotnost neželenih proteinov (nižja čistost) v primeru LF koncentratov, negativno vplivata na odmerek v končnem produktu. Poleg tega je za doseganje visoke učinkovitosti sušenja potrebno v koncentratu dosežati dovolj visoko vsebnost proteinov (>10 wt%). Z uporabo omenjenih rezultatov smo kasneje določili parametre, ki naj bodo značilni za koncentriran LF izolat in mejne vrednosti, ki jih mora le ta dosežati po postopku diafiltracije in pred sušenjem v FBDS komori (Tabela 1).

Po optimiranem postopku diafiltracije smo pripravili še dve zgoščini LF (Tabela 2), pripravljene z združenjem več predhodno diafiltriranih zgoščin LF, pri čemer smo dosegli dovolj nizko prevodnost koncentrata, visoko vsebnost LF ter visoko relativno čistost. Sušenje v FBDS komori je bilo v obeh primerih uspešno in dalo zadovoljiv rezultat.

Glede BLG koncentrata, smo bili za doseganje zadovoljivega rezultata pri sušenju pozorni le na doseganje nizke prevodnosti in dovolj velike vsebnosti proteinov, medtem ko se je izkazalo, da LPO zaradi svojih značilnosti ne dovoljuje priprave ustreznega koncentrata visoke čistosti. Izkazalo se je namreč, da se viskoznost LPO koncentrata kljub nizki vsebnosti skupnih proteinov (<5%) zelo poveča, kar pa onemogoča dodatno diafiltracijo in učinkovito sušenje v FBDS komori.

Proteinski izolat	Zgoščina proteinskega izolata po diafiltraciji	Faktor zgotovitve KLF	Prevodnost KLF	pH KLF
EL3	KLF	>50x oz. zgoščine LF:	0.3 – 0.5 mS/cm	6 -7
min. čistost elucije LF: 85% (IEX-HPLC); prevodnost: 45-75 mS/cm	min. čistost zgoščine LF: 95% (IEX-HPLC)	vsebnost LF oz. celokupnih proteinov		

Tabela/Table 1: Parametri, ki so značilni za LF izolat in mejne vrednosti, ki jih mora dosežati zgoščina proteinskega izolata LF pred sušenjem v FBDS. / Parameters of LF isolate and determined limit values, which should be met for final LF concentrate before drying in FBDS.



Slika/Figure 1: Vsebnost snovi, ki med TGA analizo razpade na hlapne (proteini) in nehlapne produkte (soli), ter prevodnost analiziranega koncentrata. / Content of volatile (proteins) and non-volatile products (salts) determined by TGA analysis and the conductivity of the analyzed LF concentrates.

LF Lot	Začetni volumen (L)	Končni volumen (L)	pH zgoščine	Končna prevodnost (mS/cm)	Masa LF (g) v zgoščini	Relativna čistota (area%)
21228SKLF	9	1.224	6.55	0.279	239	99.1
21295SKLF	6.9	2.89	6.25	0.687	393.6	95.6

Tabela/Table 2: Zgoščini LF, ki smo ju pripravili po optimiranem postopku diafiltracije. Zgoščini sta bili pripravljene po združenju več predhodno diafiltriranih LF izolatov, ki smo jih še dodatno diafiltrirali. / LF concentrates prepared by an optimized diafiltration process. They were prepared by combining several pre-concentrated LF isolates, which were further diafiltered.

ZAKLJUČKI/CONCLUSIONS

Višje izkoristke sušenja v FBDS komori in ugoden potek samega sušenja je doseženo le ob dovolj visoki vsebnosti proteinskega produkta, medtem ko je za doseganje končnega odmerka potrebno doseči tudi dovolj visoko čistost, kar velja predvsem za LF zgoščino, in nizko vsebnost soli v vseh omenjenih proteinskih zgoščinah namenjenih sušenju. S sledenjem različnim fizikalno kemijskim lastnostim kot so: vsebnost vode, suha snov, ki razpade v hlapne produkte, nehlapna suha snov, koncentracija in čistost LF, skupni proteini, prevodnost zgoščine in pH smo določili ključne parametre, ki morajo biti izpolnjeni, da postopek sušenja v FBDS komori dosega visoke izkoristke, je ponovljiv in je hkrati v suhem produktu dosežena ciljna vsebnost učinkovine (LF).

In order to achieve higher drying efficiency in the FBDS chamber and a stable drying process, it was necessary to achieve a sufficiently high content of protein product in the protein concentrate, a sufficiently high purity, especially for LF, and low content of salts in all three protein concentrates used for drying tests. We followed various physicochemical properties of protein concentrates, such as: water content, dry matter that decomposes into volatile products, non-volatile dry matter, concentration and purity of LF, total proteins, conductivity of concentrate and pH. After reviewing the data we determined the key parameters that must be met for the drying process in the FBDS chamber in order to achieve high efficiency, repeatability of the process and at the same time that the target content (LF) is achieved in the dry product.

Zahvala/Acknowledgements:

Predstavljeni rezultati so bili doseženi v okviru raziskav sofinanciranih s strani projektov LIFE for Acid Whey – LIFE16 ENV/SI/000335 in LAKTIKA - pogodba št. C3330-18-952002. Za redne tedenske dobave sirotke v pilotnih fazah izvedbe projekta se zahvaljujemo Mlekarni Celeia.