

## IZVLEČEK/ABSTRACT

Diafiltracija je membranska filtracija pri kateri v fazi filtracije vključimo enkrat ali večkratno postopek redčenja retentata z vodo ali drugim topilom z namenom povečanja čistosti retentatne frakcije ali povečanja izplena molekul v permeatni frakciji. Namen poskusov je bil povečati izplen laktoferina v permeatni frakciji po končani mikrofiltraciji kisle sirotke. Z eksperimentom smo potrdili povečanje izplena laktoferina v permeatni frakciji z uporabo diafiltracijskega načina mikrofiltracije sirotke in s tem zmanjšali izgube laktoferina v postopku njegovega pridobivanja.

Diafiltration is a membrane filtration in which single or multiple processes of diluting the retentate with water or another solvent are included in the filtration phase to increase the purity of the retentate fraction or to increase the yield of molecules in the permeate fraction. The purpose of the experiments was to test whether additional diafiltration steps would increase the recovery of lactoferrin in the permeate fraction after the microfiltration of acid whey. The experiment confirmed the increase in lactoferrin recovery in the permeate fraction using the diafiltration method and thus the reduction of lactoferrin in the process of its production.



**Slika/Figure 1:** Naprava MMS SW25 (levo) in permeat prvega poskusa tekem diafiltracije (desno). MMS SW25 filtration device (left) and permeate fraction during diafiltration of the first experiment (right).

## METODE DELA

Diafiltracijo smo izvajali na napravi MMS SW25. Uporabili smo gradientno keramično membrano proizvajalca Pall z velikostjo por  $0,5\mu\text{m}$  (EP1940). Mikrofiltrirali smo 30 L kisle sirotke, diafiltrirali pa retentat, ki je predstavljal 10 % začetnega volumna kisle sirotke (t.j. 3 L). Sirotko so nam dobavili iz Mlekarnice Celeia. Na napravi MMS SW25 smo nastavili prvo črpalko na 50 % hitrosti, drugo črpalko pa na 65 %. Na permeatni peristaltični črpalci smo nastavili transmembranski tlak (TMP) na 0,9 bar. Pri teh pogojih je potekala mikrofiltracija in diafiltracija. V prvem poskusu smo diafiltracijo izvajali z dodatkom mehke vode, v drugem poskusu pa z dodatkom »flow-through« (FT) frakcije. FT frakcija predstavlja tako imenovano nevezano frakcijo sirotke po njenem pretakanju skozi kromatografsko kolono in je osiromašena beljakovin, ki se vežejo na kromatografski nosilec.

## REZULTATI IN DISKUSIJA

Po mikrofiltraciji 30 L kisle sirotke smo trem litrom retentata dodali 12 L mehke vode oziroma FT frakcije. Diafiltrirali smo do 3 L retentata in ponovno dodali 12 L mehke vode oziroma FT frakcijo. Parameter, ki nas je najbolj zanimal je bil »recovery« laktoferina oziroma dodaten izplen v določenem koraku diafiltracije.

## 1. POSKUS

V Preglednici 1 smo predstavili rezultate prvega poskusa, kjer smo diafiltracijo izvajali z dodatkom mehke vode. Z začetno mikrofiltracijo smo dosegli 85,13 % izplen laktoferina v permeat. V nadaljnjih dveh korakih diafiltracije, ob dodatku 12 L mehke vode, je bil izplen laktoferina podoben, in sicer 89,16 % v prvem koraku diafiltracije in 85,28 % ob drugem koraku diafiltracije. Z dodanimi korakoma diafiltracije, oziroma dvakratnemu redčenju retentata mikrofiltracije, smo dosegli 93,9% izplen laktoferina. Pri tem je drugi korak diafiltracije prispeval le 1,45% celokupne mase laktoferina.

## 2. POSKUS

V drugem poskusu (Preglednica 2) smo v fazi diafiltracije dodajali retentatu prve mikrofiltracije FT (flow-through) frakcijo sirotke. Z začetno mikrofiltracijo smo dosegli 65,81 % izplen laktoferina, ki se je nahajal v 30 L kisle sirotke. Izplen laktoferina pri procesu mikrofiltracije je bil za 20 % nižji od 1. poskusa. V nadaljnjih dveh korakih diafiltracije, ob dodatku 12 L FT frakcije, je bil izplen laktoferina v prvi diafiltraciji višji, in sicer 80,99 %, v drugem koraku diafiltracije pa podoben kot pri začetni mikrofiltraciji, 64,81 %. Z obema korakoma diafiltracije, oziroma dvakratnemu redčenju retentata mikrofiltracije, smo dosegli 87,90 % izplen laktoferina.

**Preglednica/Table 1:** Vsebnosti laktoferina (LF) v retentatni in permeatni frakciji tekem diafiltracije z dodajanjem vode. / Lactoferrin (LF) contents in retentate and permeate fraction during diafiltration with addition of soft water.

I. POSKUS	POTEK POSKUSA	Volumen (L)	LF (mg)	OZNAKA	% začetnega laktoferina	% izplena LF
KORAK 0	MIKROFILTRACIJA	30	5294,55	KISLA SIROTKA	100	85,13
		27	4507,65	PERMEAT 0	85,13	
		3	134,78	RETENTAT 0	2,54	
KORAK 1	DODATEK 12 L mehke vode	12	386,88	PERMEAT 1	7,3	89,15
		3	47,04	RETENTAT 1	0,88	
KORAK 2	DODATEK 12 L mehke vode	12	77,04	PERMEAT 2	1,45	85,27
		3	13,3	RETENTAT 2	0,25	
				SUM	93,9	

**Preglednica/Table 2:** Vsebnosti laktoferina (LF) v retentatni in permeatni frakciji tekem diafiltracije z dodajanjem flow-through (FT) frakcije sirotke. / Lactoferrin (LF) contents in retentate and permeate fraction during diafiltration with addition of flow-through (FT) whey fraction.

2. POSKUS	POTEK POSKUSA	Volumen (L)	LF (mg)	OZNAKA	% začetnega laktoferina	% izplena LF
KORAK 0	MIKROFILTRACIJA	30	4690,75	KISLA SIROTKA	100	65,81
		27	3040,35	PERMEAT 0	64,81	
		3	478,87	RETENTAT 0	10,2	
KORAK 1	DODATEK 12 L FT frakcije	12	738,77	PERMEAT 1	15,74	80,99
		3	173,3	RETENTAT 1	3,69	
KORAK 2	DODATEK 12 L FT frakcije	12	344,09	PERMEAT 2	7,33	64,81
		3	186,75	RETENTAT 2	3,98	
				SUM	87,9	

## ZAKLJUČKI/CONCLUSIONS

Postopek diafiltracije je v obeh eksperimentih potrdil možnost povečanja skupnega deleža laktoferina v permeatni frakciji sirotke in s tem zmanjšanja izgub laktoferina v postopku filtracije. Glede na to, da vsak dodaten korak filtracije predstavlja strošek v smislu porabe časa in energije, je potrebno ovrednotiti rentabilnost dodatnih korakov glede na vrednost pridobljenega produkta. V primeru redčenja z vodo se je pokazal kot zadovoljiv že en korak redčenja. V primeru redčenja z FT frakcijo sirotke, so bili rezultati manj konsistentni in bi potrebovali več ponovitev za potrditev primernosti FT frakcije kot ustreznega topila v postopku diafiltracije.

The diafiltration process in both experiments confirmed the possibility of increasing lactoferrin recovery in the permeate fraction of whey and thus a reduction in lactoferrin losses in the filtration process. Given that each additional filtration step represents a cost in terms of time and energy consumption, it is necessary to evaluate the profitability of additional steps in relation to the value of the obtained product. In the case of dilution with water, one dilution step has been shown to be satisfactory. However, in the case of dilution with FT whey fraction, the results were less consistent and more replicates would be needed to confirm the suitability of the FT fraction as a suitable solvent in the diafiltration process.

### Zahvala/Acknowledgements:

Raziskava je bila sofinancirana s projektom LIFE for Acid (LIFE16 ENV/SI/000335) evropskega finančnega instrumenta LIFE in projektom LAKTIKA (OP20.03521) Operativnega programa za izvajanje evropske kohezijske politike v obdobju 2014 – 2020. Za redne tedenske dobave sirotke v pilotnih fazah izvedbe projekta se zahvaljujemo Mlekarnici Celeia.