

# RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA INDUSTRIJSKEGA POSTOPKA IZOLACIJE LPO IZ SLADKE SIROTKE Z UPORABO CIM KROMATOGRFSKE KOLONE

## DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF AN INDUSTRIAL PROCESS FOR THE ISOLATION OF LPO FROM SWEET WHEY USING CIM CHROMATOGRAPHIC COLUMN

Marko Kete<sup>1</sup>, Jernej Oberčkal<sup>2</sup>, Mateja Frančeskin Krapež<sup>1</sup>, Alja Kisilak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Arhel d.o.o., Slovenija, marko.kete@arhel.si, <sup>2</sup>Inštitut za Mlekarstvo in probiotike, Slovenija

### UVOD / INTRODUCTION

Sirotka, sladka ali kislina, vsebuje proteine, ki izkazujejo protimikrobne, protivirusne in antioksidativne lastnosti. Ti proteini lahko posledično nudijo zaščito pred rakavimi obolenji, boleznimi srca ter pomagajo pri krepitvi imunskega sistema (Gonzalez-Chavez in sod., 2009). Proteini, ki predstavljajo večinski delež v sirotki so  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG), goveji serumski albumin (BSA) in imunoglobulini (npr. IgG). Poleg omenjenih so prisotni tudi drugi proteini, kot sta laktoperoksidaza (LPO) in laktoferin (LF), a predstavljata občutno nižji delež celokupnih proteinov (<1%) (Hahn et al., 1998). Ionsko izmenjevalna kromatografija (IEX) na CIM kromatografskih kolonah se uporablja na širokem področju izolacije različnih bioloških molekul in virusov. Prednosti CIM kromatografskih kolon (BiaSeparations, Sartorius) so predvsem v njihovi visoki ločljivosti, hitrosti ločbe in enostavnem prenosu metod iz laboratorijske na industrijsko raven. Za izolacijo LPO/LF iz SS in KS smo uporabili kolono z močnim kationskim izmenjevalcem (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Površinski naboj obeh proteinov je pri pH omenjenih sirotk (pH SS 6,6 in pH KS 4,6) pozitiven, kar privede do njune vezave na kromatografski nosilec.

Whey, sweet or acid, contains proteins that exhibit antimicrobial, antiviral and antioxidant properties. These proteins can therefore provide protection against cancer, heart disease and help strengthen the immune system (Gonzalez-Chavez et al., 2009). The major proteins in whey are  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG), bovine serum albumin (BSA) and immunoglobulins (e.g. IgG). In addition to those mentioned, other proteins are also present, like lactoperoxidase (LPO) and lactoferrin (LF). However, they represent a significantly lower proportion of total proteins (<1%) (Hahn et al., 1998). Ion exchange chromatography (IEX) on CIM chromatographic columns are used in the broad field of isolation of biological molecules and viruses. The advantages of CIM chromatographic columns (Bia Separations, Sartorius) are mainly in their high resolution, fast separation process, and simple upscale from laboratory to industrial level. A column with a strong cation exchanger (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) was used to isolate the LPO / LF from SW and AW. The surface charge of both proteins is positive at the pH of whey (pH SW 6.6 and pH AW 4.6), which leads to their binding to the chromatographic support.

### REZULTATI

Metodo za izolacijo LPO smo na laboratorijskem nivoju najprej razvili na KS, kar se zaradi nizke vsebnosti LPO (<5 mg/L) in visoke vsebnosti LF (80-150 mg/L) ni izkazalo kot učinkovito. Rezultati so pokazali, da zaradi preferenčne vezave LF, ki je v primerjavi z LPO bolj bazičen protein (Voswinkela in Kulozik, 2011), slednjega izrine. Uspešna izolacija je bila tako dosežena šele po predhodni odstranitvi LF iz KS, vendar smo se zaradi nizke vsebnosti LPO v KS nato preusmerili na SS, kjer je koncentracijsko razmerje med obema proteinoma obrnjeno. V primeru izolacije iz SS se je pristop pokazal kot uspešen. Zaradi slabše stabilnosti LPO v eluciji s fosfatnim pufram (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), kjer se je le-ta oborila in hitro izgubljala peroksidazno aktivnost, smo uporabili in-house razvito metodo stabilizacije proteina, kar se je izkazalo v ohranitvi aktivnosti in nični precipitaciji. Metodo razvito na laboratorijskem nivoju smo nato preizkusili še na polindustrijskem nivoju z uporabo 8L kromatografske kolone in še nekoliko optimizirali ostale puferne raztopine.



**Slika/Figure 1:** Pilotni kromatografski sistem sestavljen iz pufernega sistema, črpalk in 8L CIMmultus 8L SO<sub>3</sub> kromatografske kolone. / Pilot chromatographic system consisting of a buffer system, pumps and an 8L CIMmultus 8L SO<sub>3</sub> chromatographic column.

### ZAKLJUČKI/CONCLUSIONS

Rezultati raziskovalnega dela so pokazali, da je SS zaradi 20 - 50-krat višje vsebnosti LPO in 5 - 6-krat nižje vsebnosti LF bolj primerna za izolacijo LPO. Eksperimente smo najprej opravili na laboratorijskem nivoju (CIMmultus SO<sub>3</sub> 1mL kolona). V začetni fazi smo elucijo LPO izvajali s solnim gradientom, kasneje pa razvili metodo s stopenjsko elucijo, ki omogoča enostavnejši prenos na večje kromatografske kolone. S ciljem izboljšanja stabilnosti eluirane LPO smo, s testiranjem na pilotnem nivoju z uporabo CIMmultus SO<sub>3</sub> 8L kolone, dodatno prilagodili sestavo elucijskega pufera in še nekoliko optimizirali ostale elucijske puferne. Rezultat je ponovljiva metoda izolacije LPO iz SS, pri čemer se laktoperoksidazna aktivnost (237 - 305 U/mg) ohranja in je primerljiva z LPO standardom proizvajalca Sigma (261 - 283 U/mg).

The results of research work showed that SW is more suitable for LPO isolation due to 20-50-times higher LPO content and 5-6-times lower LF content. The experiments were first performed at the laboratory level (CIMmultus SO<sub>3</sub> 1mL column). In the first stage, the LPO elution was performed with a conductivity gradient. Later, a step elution method was developed, which allowed upscaling to larger chromatographic columns with ease. Finally, to improve eluted LPO's stability, we adjusted the composition of the elution buffer and slightly optimized other elution buffers by testing on a pilot level using a CIMmultus SO<sub>3</sub> 8L column. The result is a repeatable method for LPO isolation from SW where by lactoperoxidase activity (237 - 305 U/mg) is maintained and is comparable to LPO standard from manufacturer Sigma (261 - 283 U/mg).

#### Zahvala/Acknowledgements:

Raziskava je bila sofinancirana s projektom LAKTIKA - Frakcioniranje in oplemenitenje sirotkinih proteinov ter izraba preostanka za oblikovanje novih funkcionalnih živil in prehranskih dopolnil (OP20.03521) Operativnega programa za izvajanje evropske kohezijske politike v obdobju 2014 - 2020 in projektom LIFE for Acid Whey - Ponovna uporaba odpadne sirotke za ekstrakcijo bioaktivnih beljakovin z visoko dodano vrednostjo (LIFE16 ENV/SI/000335) evropskega finančnega instrumenta LIFE.

#### Viri/References

Gonzalez-Chavez, S. A. et al. (2009). International Journal of Antimicrobial Agents, 33(4): 301-1-8.,  
Hahn, R. et al (1998). Basel, 1-4 september 1996. Journal of Chromatography A, 795(2): 277-287.

**Tabela 1/ Table 1:** Laktoperoksidazna aktivnost zgoščin LPO izražena v U/mg. Za primerjavo je v tabeli predstavljena tudi aktivnost standarda LPO proizvajalca Sigma./ Peroxidase activity of LPO concentrates in terms of U/mg of LPO. For the purpose of comparison, the activity of Sigma standard was also determined.

LPO Koncentrat	Optimizacija pufov			Test ponovljivosti 3x				LPO (Sigma)	
	Lot 21231	Lot 21256	Lot 21263	Lot 21270	Lot 21312	Lot 21319	Lot 21319 (združen KLPO)		
Skupni prot. (g/100g)	1.83	1.39	0.71	1.46	1.61	1.94	2.31	/	
Koncentriran (K) LPO (IEX HPLC, purity %)	71.2	39.5	40.6	49.4	56.0	51.0	53	/	
Skupni LPO prot. (g/100g)	1.303	0.549	0.288	0.721	0.902	0.990	1.2243	/	
Volumen (L)	0.952	0.825	1.00	1.025	1.04	0.995	2.00	/	
c LPO (mg/mL)	13.03	5.49	2.88	7.21	9.02	9.89	12.243	2.5	
Specifična LPO aktivnost (U/mg)	221.3	123.1	6.68	304.40	237.7	252.6	201.4	282.5/261.5	
Volumski delež (φ)	0.163	0.141	0.171	0.176	0.178	0.170	=1.00	/	
Vsota LPO aktivnosti glede na volumski delež LPO elucije (21231 + 21256 + 21263 + 21270 + 21312 + 21319)								193.5	/

Rezultati testov ponovljivosti so pokazali dobro ponovljivost in stabilen produkt LPO, ki ohranja specifično aktivnost preko celotnega procesa kromatografije in zgoščevanja elucije (Tabela 1). Rezultati IEX HPLC analitike in SDS page so pokazali, da je čistost produkta med eksperimenti v rang 49 - 71%. Opazili smo, da je stopnja čistosti proteina v pozitivni korelaciji s količino vezane LPO na kromatografski koloni. Pri tem smo količino vezane LPO grobo ocenili z encimskim testom peroksidazne aktivnosti koncentriranih LPO elucij. Rezultati so pokazali, da je bila pri večji masi vezane LPO na kromatografski koloni čistost končne elucije višja. Rezultatje tudi v skladu z dognanji spremljanja poteka izolacije LF iz kisle in sladke sirotke. Glavni razlog za ta pojav lahko v obeh primerih pripišemo učinku izpodrivanja drugih beljakovin z nižjo afiniteto do vezave na kromatografski nosilec kot jo ima LPO oziroma LF.