

Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir



Razvoj metode in optimiziranega industrijskega postopka izolacije laktoferina

Marko Kete, Tjaša Prevc, Maja Čič, Blaž Lokar, Mateja Frančeškin Krapež, Tinkara Vardjan, Alja Kisilak, Maja Zupančič Justin

Arhel d.o.o., Slovenija

Vsebina predstavitve

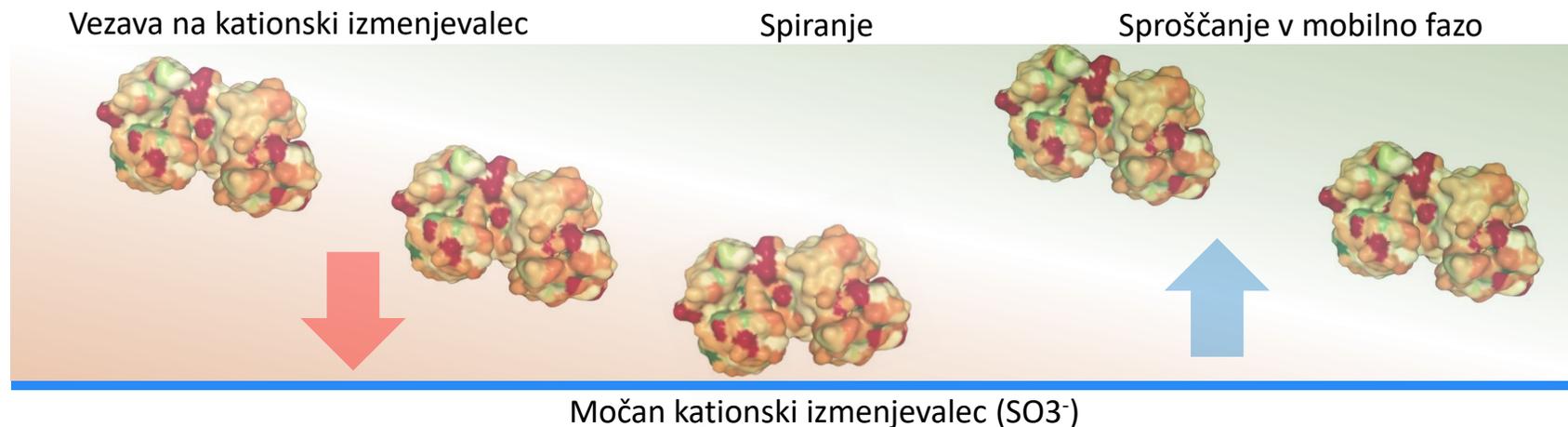
- Uvod (kisla sirotka, laktoferin (LF), izolacija LF z uporabo CIM[®] monolitnih kromatografskih kolon)
- Spremljevalna analitika
- Razvoj metode izolacije LF
- Polindustrijski sistem za izolacijo LF
- Optimiziracija industrijskega postopka izolacije laktoferina

Sirotkini proteini

- kažejo protimikrobne, protivirusne in antioksidativne lastnosti (pomagajo pri krepitvi imunskega sistema, ščitijo pred boleznimi srca, rakom)
- Beljakovine sirotke: α -laktalbumin (α -LA), β -laktoglobulin (β -LG), goveji serumski albumin (BSA) in imunoglobulini (IgG), laktoperoksidaza (LPO) in
- laktoferin (LF) je 80 kDa velik glikoziliran protein (regulacija Fe^{3+} , protimikrobno delovanje proti širokemu spektru bakterij, gliv, kvasovk, virusov in parazitov, zaščita pred vnetnimi in rakavimi boleznimi ter druge encimske funkcije)

Izolacija LF z uporabo monolitnih kromatografskih kolon CIM[®]

- beljakovine sirotke se razlikujejo po IEP (razpon od pH = 4,5 do 9,5), LF IEP = 8,5 – 9,0
- v kislih pogojih se LF veže na močan kationski izmenjevalec
- monolitna kromatografska kolona CIM[®] omogoča visoko ločljivosti kljub visokim pretokom



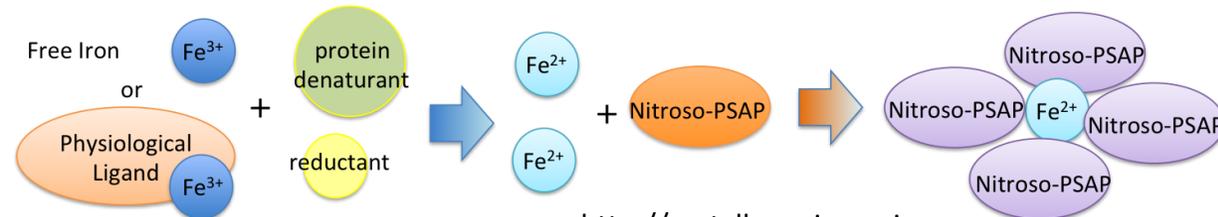
Spremljevalna analitika

- Kromatografska analiza: PATfix™ HPLC system, using CIMac™ SO3 ali COOH-0,1 mL (BIA Separations, Sartorius)

- SDS PAGE (Biorad)



- Določanje bioaktivnosti: meritve potenciala za vezavo Fe^{3+} (C-vrednost) in delež že vezanega Fe^{3+} (A-vrednost) – spektrofotometrične meritve (NRL Pharma Inc.)



<http://metallogenics.co.jp>

Zaključna konferenca projekta LIFE for Acid Whey –
LIFE16ENV/SI/000335; Ljubljana, 15.2.2022

$\lambda_{\text{peak}} = 750 \text{ nm}$



Razvoj metode izolacije LF

- CIMac™ in CIMmultus™ SO3 (Bia Separations, Sartorius) monolitne kromatografske kolone

0.1 mL



1 mL



80 mL



800 mL



8000 mL



Laboratorijski nivo

Manjši preparativni nivo

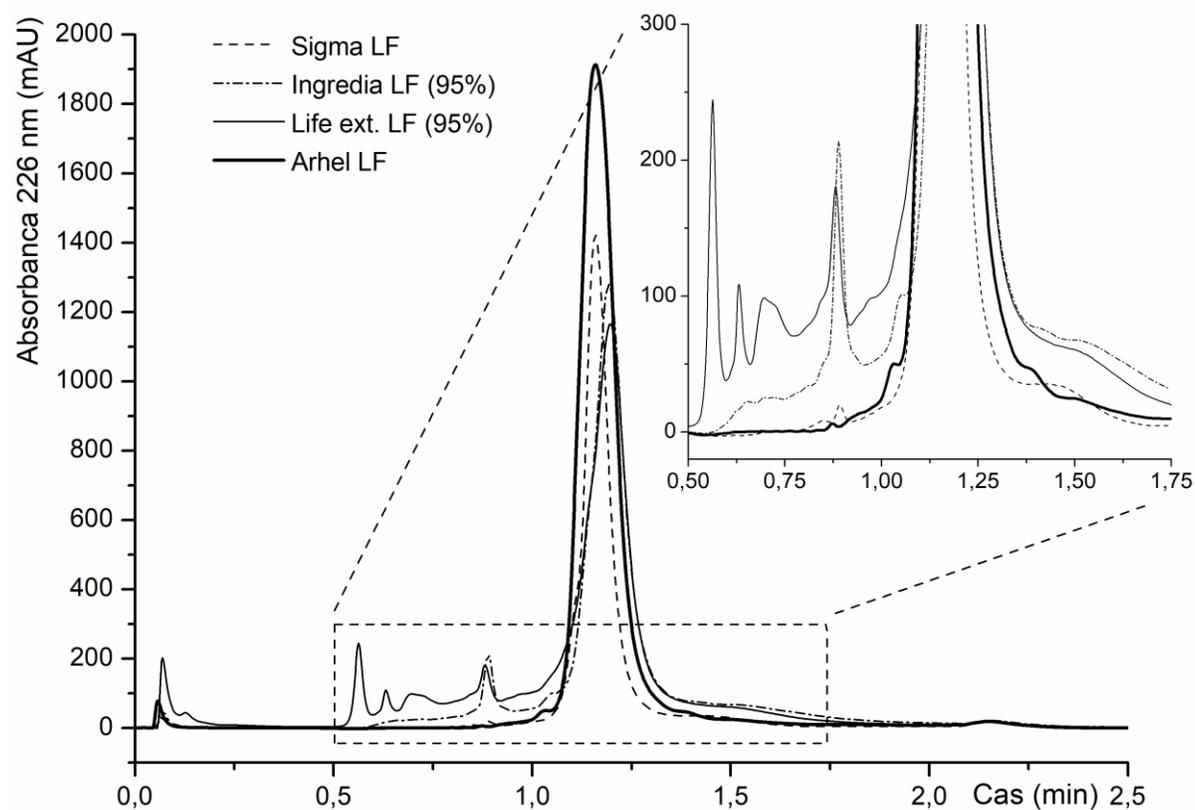
Polindustrijski/industrijski nivo

Razvoj metode izolacije LF

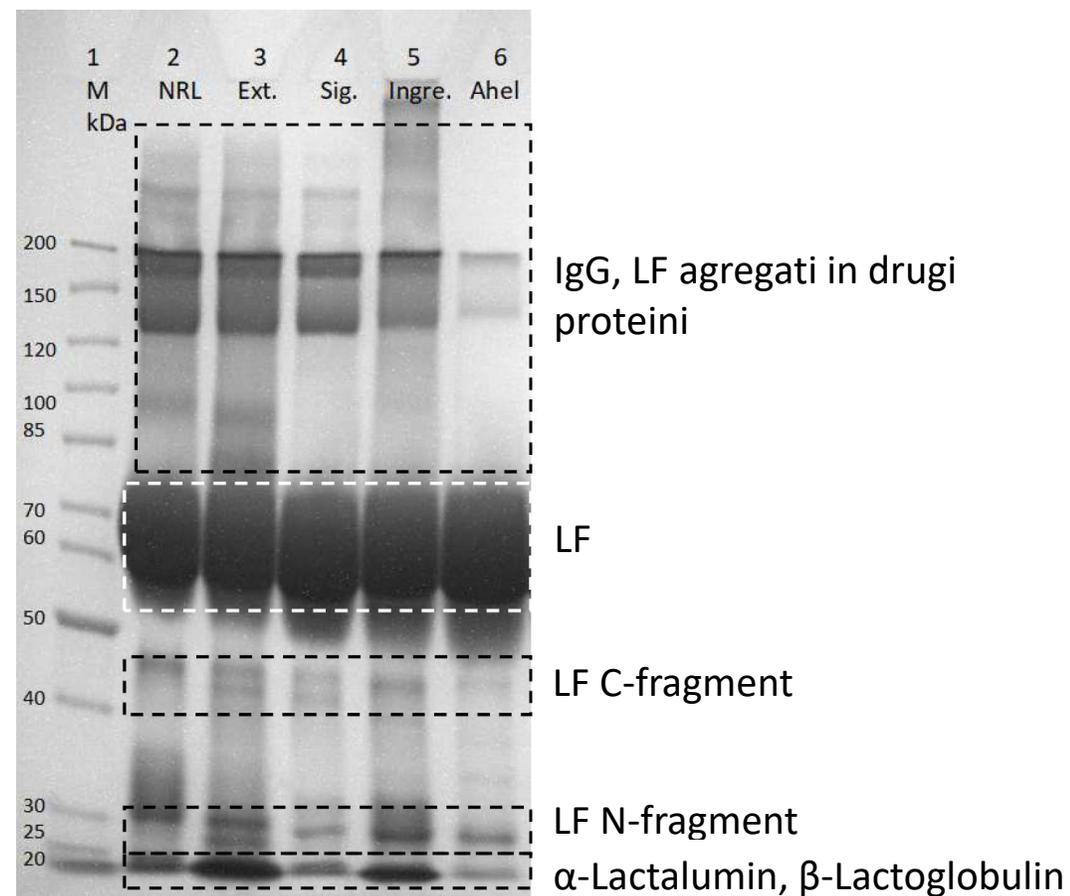
- prenos metode izolacije LF na višje preparativne ravni je enostaven, potreba po manjši optimizaciji in spremembi pufernih pogojev
- uporaba pulzne (stopenjske) ali gradientne ali kombinirane elucijske metode
- na polindustrijskem nivoju smo dodatno testirali različno sestavo pufrov na osnovi fosfata, karbonata ali citrata in izolacijo LF/LPO iz sladke sirotke (SS).
- metodo za izolacijo LF smo v obliki patentne prijave vložili v več državah po svetu:
Kete Marko, Štrancar Aleš, Lokar Blaž, Zupančič Justin Maja. Method for manufacturing highly purified lactoferrin and lactoperoxidase from milk, colostrum and acid or sweet whey: application number EP18204674.8. Munich: European Patent Office, 2018. 2 f.

Razvoj metode izolacije LF - Rezultati

IEX HPLC:



SDS PAGE:



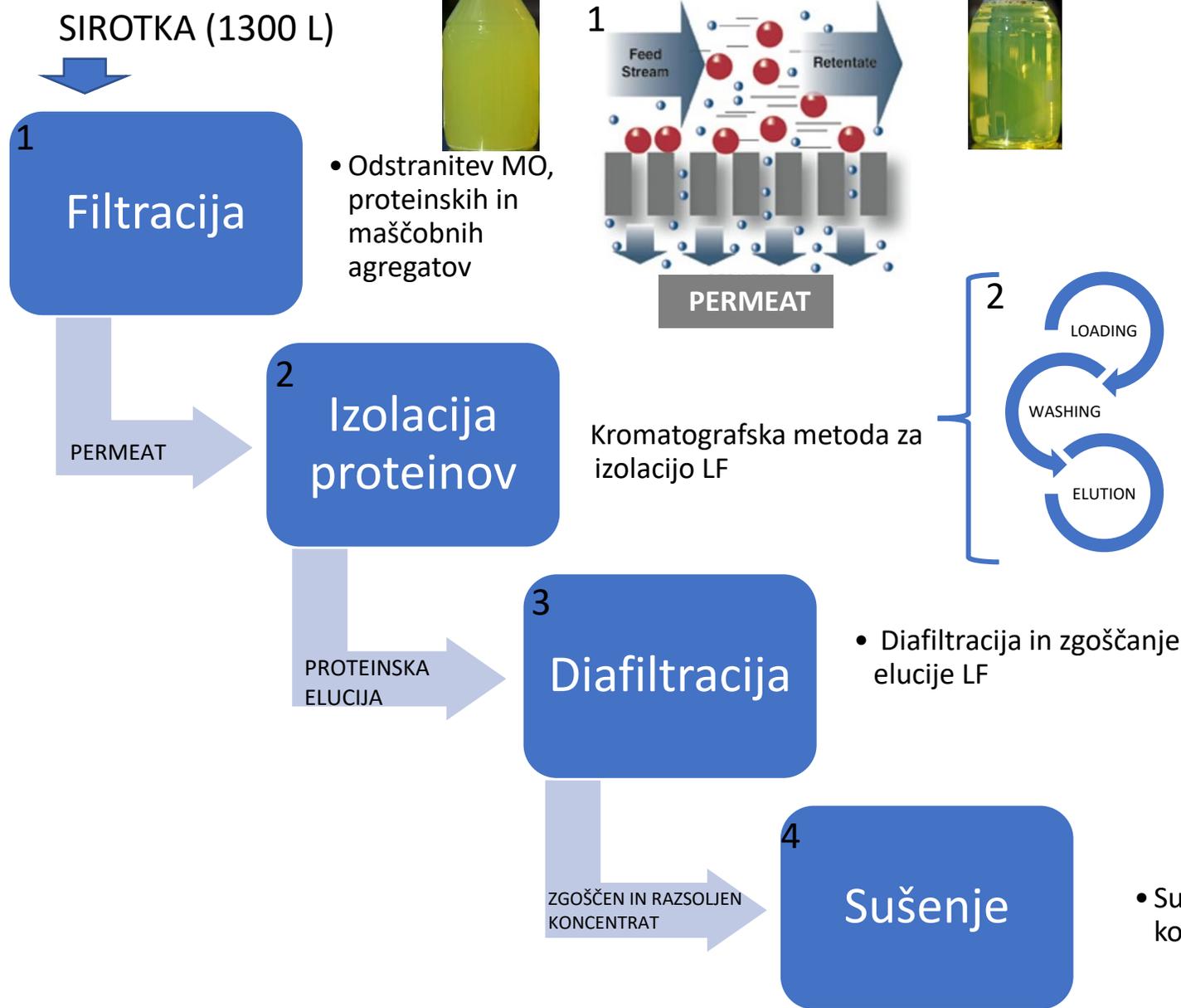
Razvoj metode izolacije LF - Rezultati

- primerjava z z drugimi na trgu prisotnimi LF: dosegamo primerljivo, večkrat celo višjo čistost (>98% - IEX HPLC), ter bistveno višjo celokupno bioaktivnost (C + A vrednost) v primerjavi z vsemi analiziranimi vzorci:

Vzorci laktoferina	Life Extension (Lactoferrin caps - Bioferrin; 95% Apolactoferrin)	Ingredia Nutritional (Prodiet Lactoferrin, >95%)	NRL Pharma	Sigma goveji laktoferin; ≥85%	Arhel d.o.o. (>98%)
C-vrednost [%]	48,6 (31,1 – vz.)	52,1	49,2	7,5	70,0 - 74,0
A-vrednost [%]	11,7 (7,5 – vz.)	7,7	9,0	58,5	2 - 4,9
Skupaj (A+C) [%]	60,3	59,8	58,2	66,0	74,9



Pilotni sistem za izolacijo LF



Pilotni sistem za izolacijo LF



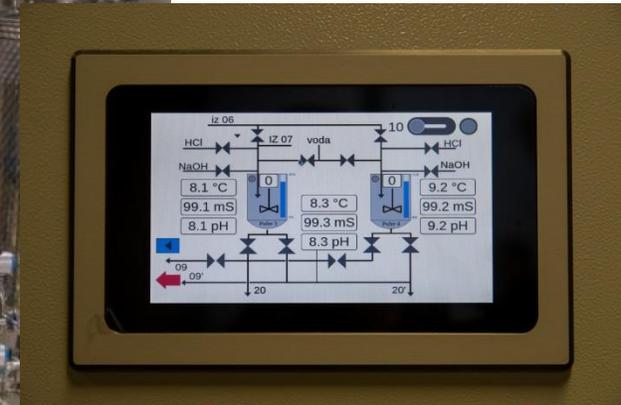
Hladilne cisterne za sprejem in hranjenje sirotke



Filtrski sistem za filtracijo sirotke



Pilotni HPLC s puferskim sistemom in UV detektorjem



CIMmultus™ SO3-8000 (Bia Separations, Sartorius) monolitna kromatografska kolona

Pilotni sistem za izolacijo LF - Rezultati

- Na polindustrijski ravni smo vzporedno z optimizacijo metode izolacije LF izvajali tudi testiranja predpriprave sirotke na samo izolacijo (mikrofiltracija) in ponovljivost kromatografskega cikla izolacije
- na dveh CIMmultus™ SO3-8000 (Bia Separations, Sartorius) monolitnih kromatografskih kolonah smo opravili 138 kromatografskih ciklov izolacije LF
- postopek zagotavlja visoko stopnjo ponovljivosti, ohranjanje funkcionalnosti kromatografske kolone in izolacijo visoko čistega produkta LF z visoko bioaktivnostjo



Pilotni sistem za izolacijo LF: sušenje izolatov

- Priprava na sušenje: zgoščanje in razsoljevanje LF elucije z uporabo diafiltracijskega sistema
- Testi sušenja zgoščenih LF izolatov:
 - Liofilizacija (0% izgub, dolgotrajno, energijsko potratno)
 - Spray drying (hitrost, izgube > 30%, nepretočni prah)
 - FBDS komora (Fluid Bed Drying System) – neposredna uporaba zgoščine pri postopku oblaganja (FFA) (hitrost, izgube < 10%, pretočni sferični delci)

Liofoliziran



Sušen s "spray drierjem"

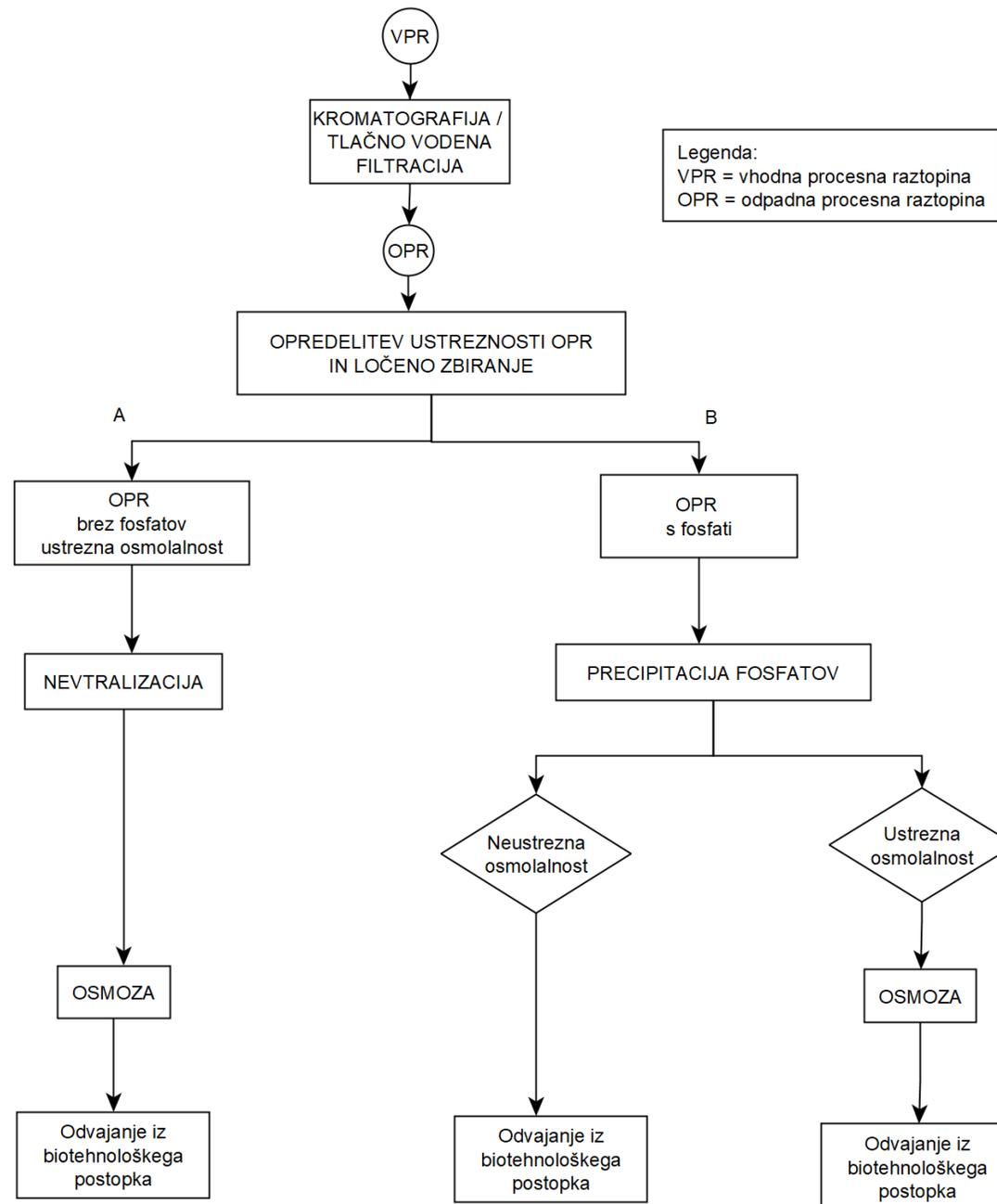


Sušen v FBDS komori



Optimiziracija industrijskega postopka izolacije laktoferina

- Optimizacija pufernih raztopin: Ponovna uporaba/reciklaža



Optimizacija pufernih raztopin - Rezultati

- Optimizacija pufernih raztopin:
 - testirali več načinov njihove ponovne uporabe v postopku kromatografske izolacije,
 - možnost recikliranja surovin - polno odstranitev fosfatov iz pufernih raztopin
 - ponovne uporabe raztopin z visoko slanostjo v procesih zgoščevanja preostankov sirotke - znatno zgostitev preostankov sirotke

Patentna prijava:

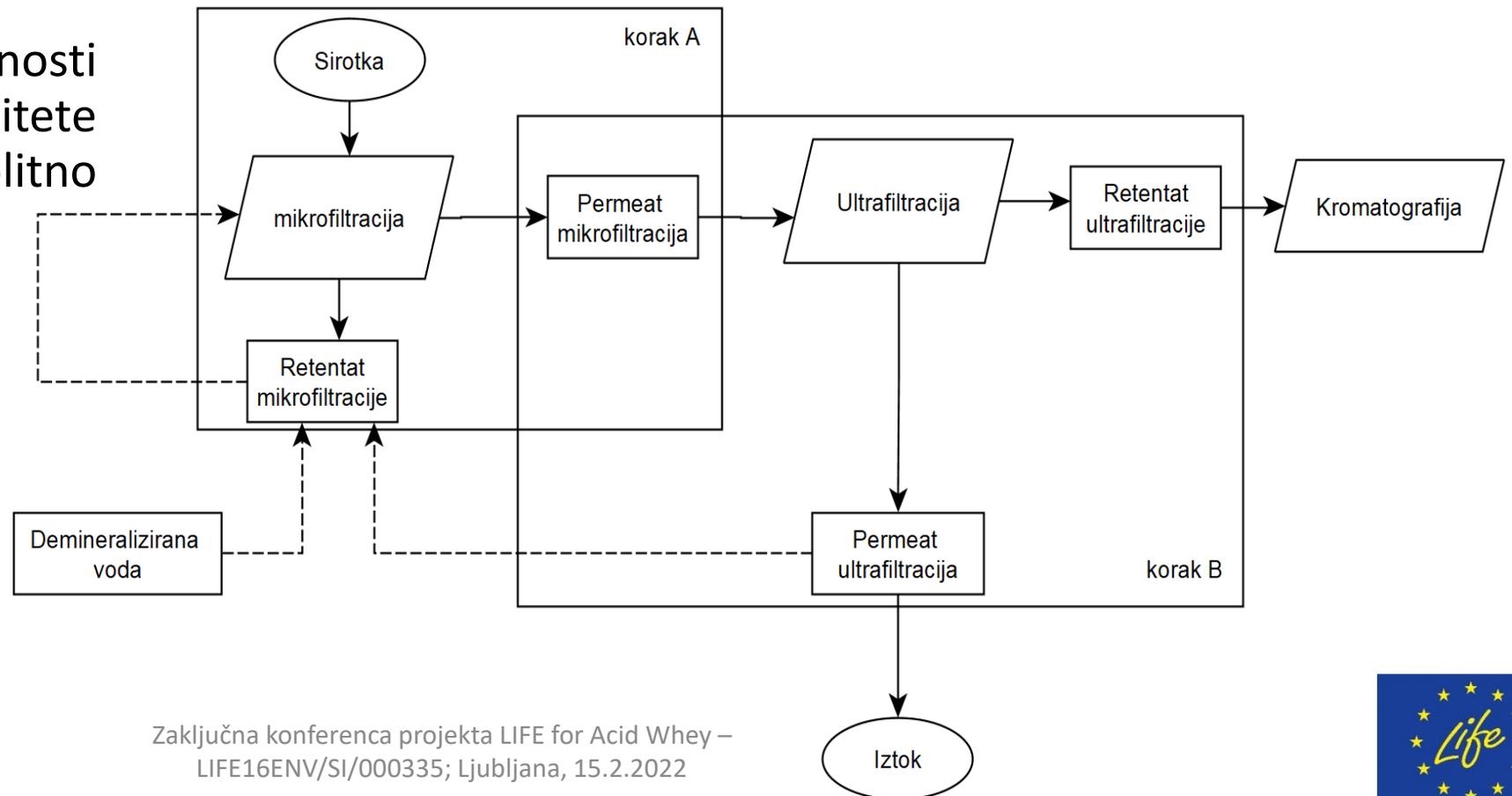
Zupančič Justin Maja, Kete Marko, Čič Maja, Vardjan Tinkara. Postopek obdelave odpadnih procesnih raztopin kromatografskih postopkov in tlačno vodenih filtracijskih postopkov. Patentna prijava št. P-202100230. Arhel d.o.o, 2021a.



Optimiziracija industrijskega postopka izolacije laktoferina

- Razvoj metode za povečanje vezavne kapacitete kromatografske kolone na LF

Preizkušali različne možnosti povečanja vezavne kapacitete LF na SO3 monolitno kromatografsko kolono.

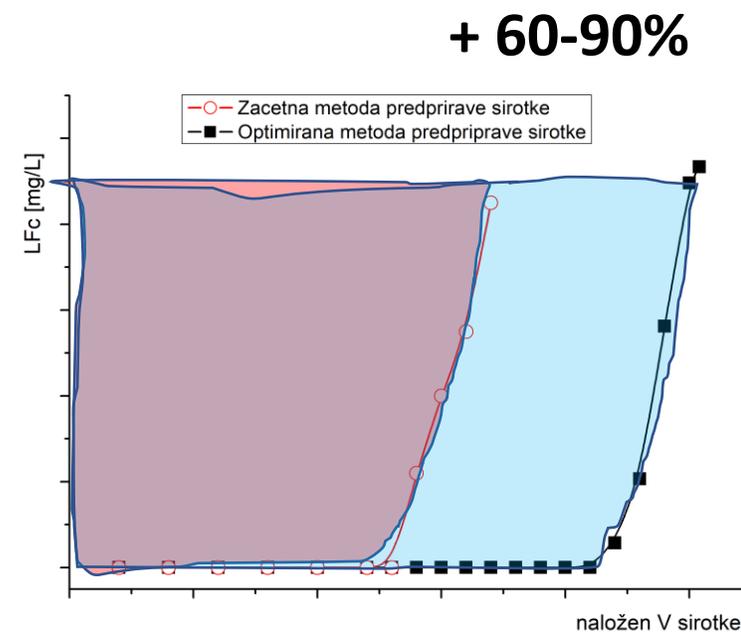


Razvoj metode za povečanje vezavne kapacitete kromatografske kolone na LF - Rezultati

- stopnja zgoščevanja je lahko različna
- uspelo povečati kapaciteto vezave LF za 60 do 90% v primerjavi z izhodiščno metodo izolacije

Patentna prijava:

Zupančič Justin Maja, Kete Marko, Prevc Tjaša, Štrancar Aleš.
Postopek povečanja zmogljivosti kromatografske ekstrakcije proteinskih molekul iz kompleksnih organskih matriksov.
Patentna prijava št. P-202100196. Arhel d.o.o, 2021b.



Povzetek

- Razvoj metode izolacije LF iz sirotke
- Prenos metode iz laboratorijskega nivoja na polindustrijski nivo z manjšimi modifikacijami pufrov
- Postopek izolacije zagotavlja visoko stopnjo ponovljivosti, ohranjanje funkcionalnosti kromatografske kolone in izolacijo visoko čistega produkta LF z visoko bioaktivnostjo
- Optimizirana poraba surovin
- Razvoj metode za povečanje vezavne kapacitete kromatografske kolone na LF
- Tri patentne prijave

Zahvale

Raziskava je bila sofinancirana s projektom LIFE for Acid Whey (št. pogodbe LIFE16 ENV/SI/000335) evropskega finančnega instrumenta LIFE in projektom LAKTIKA (št. pogodbe OP20.03521) OP EKP 2014 – 2020.

Za dobave sirotke se zahvaljujemo mlekarnam Planika, Celeia in Pomurske mlekarne.

Za pomoč in usmeritve v fazah razvoja metode izolacije LF se zahvaljujemo dr. Alešu Štrancarju, BIA Separations.

