

FILTRACIJA IN DIAFILTRACIJA SIROTKE - OPTIMIZACIJA MASNEGA IZKORISTKA ZA LAKTOFERIN IN LAKTOPEROKSIDAZO / WHEY FILTRATION AND DIAFILTRATION – OPTIMIZATION OF MASS YIELD FOR LACTOFERRIN AND LACTOPEROXIDASE

Marko Kete¹, Nika Osel², Jernej Oberčkal³, Mateja Fračeskin Krapež¹
¹Arhel d.o.o., Slovenija, marko.kete@arhel.si
²Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo, Slovenija
³Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Slovenija

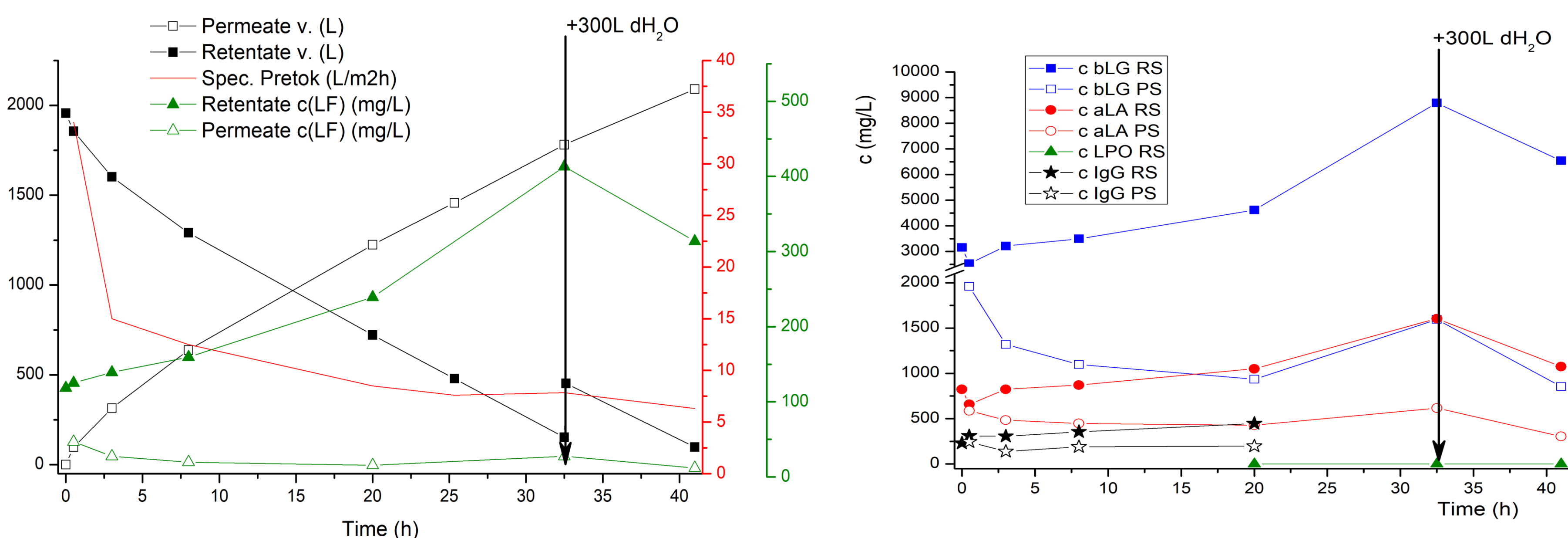
UVOD / INTRODUCTION

Za potrebe kromatografske izolacije proteinskih izolatov (LF/LPO) z uporabo CIM kromatografske kolone (Bia Separations, Sartorius) iz sirotke, je le-to potrebno predhodno filtrirati. S filtracijo preko filtra s porami ustrezne velikosti, se iz sirotke odstrani velika večina mikroorganizmov, večji proteinski agregati in mlečna maščoba. S tem se prepreči zamašitev kromatografske kolone (2 μm pore) in tako ohrani njeno stabilno in ustrezno delovanje. Stranski pojav filtracije sirotke je, kljub relativno velikim poram filtra 0.5 μm (JIUWU HI-TECH, membrana: CMF19040, ne-gradientna), delno zadrževanje ciljnih proteinov (LF in LPO) na retentatni strani filtra in s tem onemogočena razpoložljivost za kromatografsko izolacijo. Z namenom povečanja masnega pretoka omenjenih proteinov preko membrane in povečanja masnega izkoristka filtracije, smo testirali različne pristope filtracije in diafiltracije sirotke. Z uporabo različnih analitskih tehnik smo sledili koncentraciji sirotkinih proteinov ter ovrednotili oba pristopa.

For the purpose of chromatographic isolation of whey proteins (LF/LPO) using CIM chromatographic column (Bia Separations, Sartorius), the whey must be pre-filtered. Filtration of whey through a filter with pores of the appropriate size removes the majority of microorganisms, larger protein aggregates and milk fat. This prevents clogging of the chromatographic column (2 μm pores) and thus maintains its stable and proper functionality. The side effect of whey filtration was, despite the relatively large filter pores of 0.5 μm (JIUWU HI-TECH, membrane: CMF19040, non-gradient), partial retention of target proteins (LF and LPO) on the retentate side of the filter, which were consequently not available for chromatographic isolation. In an attempt to increase the mass transfer of these proteins through the membrane and consequently increase the mass efficiency of filtration, we tested different approaches to filtration and diafiltration of whey. Using various analytical techniques, we monitored the concentration of whey proteins and evaluated both approaches.

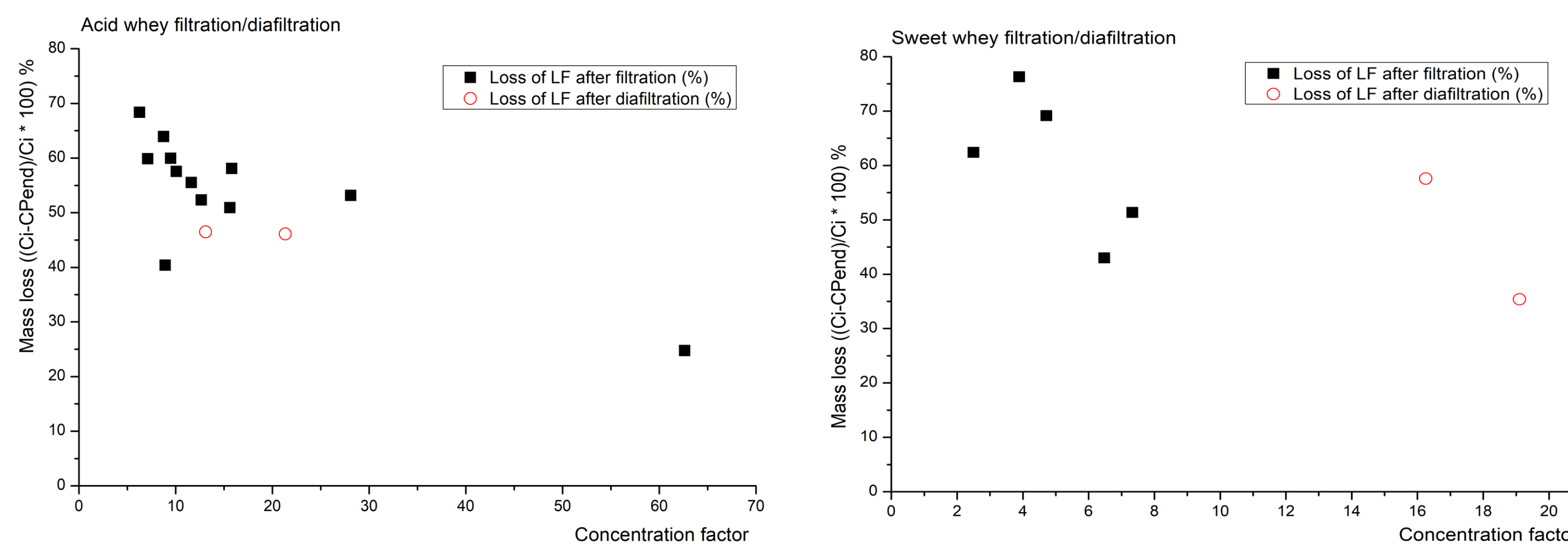
REZULTATI

Izvedli smo dvanajst filtracij in dve diafiltraciji kisle ter pet filtracij in dve diafiltraciji sladke sirotke. Vse filtracije in diafiltracije sirotke so bile opravljene pri enakih nastavitvah filtracijske naprave in v primerljivem temperaturnem območju (5-8°C). Na Sliki 1 je predstavljen primer spremljanja različnih parametrov med posamezno filtracijo, poleg katerih smo spremljali še druge, ki v prispevku niso prikazani. Izkazalo se je, da v primeru filtracije na retentatni strani v večji meri zastajajo LF, LPO in imunoglobulin G (IgG), medtem ko manjši proteini alfa-laktalbumin (aLA) in beta-laktoglobulin (bLG) lažje prehajajo membrano (Heidebrecht, H. J., Kulozik, U., 2019). To vodi do znižane koncentracije LF in LPO v permeatu po opravljeni filtraciji sirotke. Z dodajanjem prečiščene vode v zadnji fazi filtracije smo poizkusili masni izkoristek filtracije za LF in LPO dvigniti. Spremljanje masnega toka sirotkinih proteinov, predvsem LF, je pokazalo, da med obema pristopoma k filtraciji sirotke ni razlike. Izkazalo se je celo, da na sam masni izkoristek LF (Slika 2) vpliva predvsem koncentracijski faktor, tj. razmerje med končnima volumnoma permeata in retentata in tako višje doseženo razmerje vodi v večji izkoristek. Zanimarljiva razlika med filtracijo in diafiltracijo sirotke na omenjenem filtrskem sistemu in pomembnejši vpliv koncentracijskega faktorja na izkoristek lahko povežemo s pojavom sekundarne plasti na površini ne-gradientne keramične membrane. Ta nastane med filtracijo in je sestavljena iz mešanice mikroorganizmov, maščob, proteinskih agregatov in netopnih soli (Piry A. et. al, 2012). Le-ta dodatno omeji prehod sirotkinih proteinov preko membrane in predstavlja sekundarno membrano, ki se jo zaradi svoje nepredvidljivosti težko nadzira. Z namenom dodatne optimizacije filtracije smo zato tekom projekta izvedli še poskusne filtracije na drugih tipih membran, ki zaradi gradienta por omogočajo bolj nadzorovano filtracijo sirotke.



Slika/Figure 1: Primer spremljanja specifičnega pretoka in koncentracij sirotkinih proteinov med diafiltracijo sladke sirotke. Slika je tudi splošen primer za vse izvedene eksperimente filtracije/diafiltracije sirotke, le da se v primeru filtracije na retentatno stran ni dodalo prečiščene vode kot je sicer prikazano. / Example of monitoring specific flow and whey protein concentrations during sweet whey diafiltration. The figure is also a general example for all performed whey filtration / diafiltration experiments, except that in the case of filtration, no purified water was added to the retentate side.

Slika/Figure 2: Masne izgube LF tekom filtracije/diafiltracije glede na vhodno maso LF v sirotki v odvisnosti od koncentracijskega faktorja filtracije in tipa filtracijskega procesa. / Mass loss during filtration / diafiltration in relation to the input mass of LF in whey, depending on the concentration factor of filtration and the type of filtration process.



ZAKLJUČKI/CONCLUSIONS

Izkazalo se je, da na retentatni strani v večji meri zastajajo LF, LPO in IgG, medtem ko manjši proteini (aLA in bLG) lažje prehajajo membrano. To vodi do znižane koncentracije LF in LPO v permeatu po opravljeni filtraciji sirotke, kar se kaže v nižjem masnem izkoristku za LF in LPO. Z namenom dviga izkoristka filtracije smo opravili več primerjalnih filtracij in diafiltracij kisle in sladke sirotke, pri čemer smo vrednotili vpliv koncentracijskega faktorja ter v primeru diafiltracije, vpliv dodatka prečiščene vode, ki jo med filtracijo dodajamo na retentatno stran, na masni izkoristek. Kot glavni zaključek lahko izpostavimo, da med masnimi izkoristki filtracije ali diafiltracije ni bilo bistvenih razlik. Izkazalo se je, da ima na izkoristek nekoliko večji vpliv koncentracijski faktor filtracije, pri čemer se z njegovim večanjem dviga tudi sam masni izkoristek postopka.

We observed that LF, LPO and immunoglobulin G (IgG) had been retained on the retentate side to a greater extent, while smaller proteins, like alpha-lactalbumin (aLA) and beta-lactoglobulin (bLG), cross the membrane more easily. This leads to a reduced concentration of LF and LPO in the permeate whey, which is reflected in lower mass yield for LF and LPO. In order to increase the filtration efficiency, we performed several comparative filtrations and diafiltrations of acid and sweet whey, evaluating the influence of the concentration factor on mass recovery and in the case of diafiltration, the influence of purified water added to the retentate side on mass recovery. As the main conclusion, we can point out that there were no significant differences in recovery efficiency between filtration or diafiltration processes. It turned out that the concentration factor of filtration has a slightly greater influence on the efficiency, and with its increase, the mass efficiency of the process itself increases.

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.

Viri/References

Heidebrecht, H. J., Kulozik, U. (2019). International Dairy Journal 93 (2019) 1-10
 Piry A., et al. J. Dairy Sci. 95 :1590-1602