

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 2013-885

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

*A23J 1/20* (2006.01)  
*A23J 3/08* (2006.01)  
*A23C 21/00* (2006.01)  
*B01D 15/08* (2006.01)  
*C07K 14/79* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



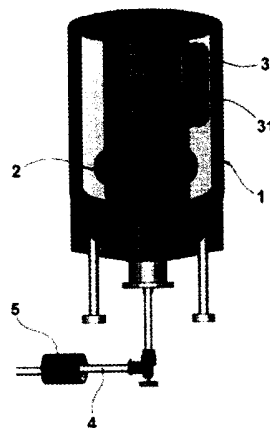
ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.11.2013**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **19.08.2015**  
(Věstník č. 33/2015)

- (71) Přihlašovatel:  
Univerzita Palackého, Olomouc, CZ
- (72) Původce:  
Mgr. Kateřina Holá, Olomouc, CZ  
prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D., Olomouc, CZ  
Bc. Ivo Medřík, Drahanovice, CZ
- (74) Zástupce:  
Ing. Petr Soukup, Vídeňská 8, 772 00 Olomouc

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Způsob separace syrovátkových proteinů z mléčného média a zařízení k provádění tohoto způsobu**

- (57) Anotace:  
Způsob separace syrovátkových proteinů, zejména laktoferinu nebo laktoperoxidázy, z mléčného média, s výhodou z čerstvého mléka nebo syrovátky, a to pomocí sorbentů, jehož podstatou je, že mléčné médium se nejdříve promícháním uvede do kontaktu s mechanicky nebo magneticky filtrovatelným sorbentem tvořeným polymerním materiálem funkcionalizovaným na kationtově výměnnou funkci, který je přitom udržován ve vznosu v odděleném filtračním prostoru obsahujícím filtrační mechanismus, zejména filtrační koš, a adsorbuje syrovátkové proteiny, načež se z filtračního prostoru vyjme filtrační mechanismus s adsorbovanými syrovátkovými proteiny a po jeho promytí za účelem odstranění nenavázaných proteinů a jiných nežádoucích složek mléčného média se podrobí eluci navázaných syrovátkových proteinů, které se následně zpracují do práškové formy. Zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů obsahuje skladovací tank (1) mléčného média opatřený hlavním míchadlem (2) a výpustí (4), jehož podstata spočívá v tom, že v oblasti proudění promíchávaného mléčného média je umístěn filtrační mechanismus (3) s obsahem ve vznosu udržovaných částic sorbentu, s výhodou filtrační koš tak, že je ponořen v separačním médiu, přičemž velikost ok filtračního mechanismus (3) se v závislosti na druhu použitého sorbentu pohybuje v rozmezí hodnot 1 μm až 1 cm.



CZ 2013 - 885 A3

TJK

111111  
111111  
111111  
111111  
111111

~~27/4/13 115~~

- 1 -

- 1 -

Způsob separace syrovátkových proteinů z mléčného média a zařízení k provádění tohoto způsobu

### Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti mlékárenského průmyslu a týká se způsobu separace syrovátkových proteinů, například laktoferinu nebo laktoperoxidázy, z mléčného média, zejména čerstvého mléka, a zařízení k provádění tohoto způsobu.

### Dosavadní stav techniky

Laktoferin (dále Lf) i laktoperoxidáza (dále LPO) jsou syrovátkové proteiny o stejné molekulové hmotnosti, a to 78 kDa. Oba tyto proteiny se nejvíce vyskytují v prvotním mateřském mléce, kde působí jako ochrana právě narozených mláďat před vlivy různých patogenů.

Lf je označován jako antibakteriální, antivirální a antimikrobiální protein [Levay, P. F.; Viljoen, M. *Hematol. J.* 1995, 80, 252-267]. Má ovšem i antioxidantní a dokonce i antikarcinogenní účinky [(a) Gutteridge, J. M.; Paterson, S. K.; Segal, A. W.; Halliwell, B. *Biochem. J.* 1981, 199, 259-261, (b) Tuccari, G.; Barresi, G. *Biomaterials* 2011, 24, 775-784]. O Lf lze tedy obecně říci, že svými bioaktivními účinky podporuje lidskou imunitu. Na trhu proto existuje velké množství farmaceutických výrobků a doplňků stravy obsahujících tento protein. Nejčastěji se přidává do produktů na posílení imunity, výjimkou nejsou ale ani produkty na potlačení akné, pro zdravou funkci močových cest, pro potlačení zánětlivých onemocnění trávicího traktu nebo produkty podávané při chudokrevnosti. Často se prodává i Lf samotný jako doplněk stravy nebo je obsažen v kojeneckých výživách.

LPO působí v těle jako antibakteriální látka a především jako antioxidant [Ostdal, H.; Bjerrum, M. J.; Pedersen, J. a; Andersen, H. J. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3939-3944]. V praxi se často přidává do kosmetických přípravků či do zubních past a ústních vod pro léčbu paradentózy.

Vzhledem k široké aplikaci obou uvedených proteinů byla od doby jejich objevení vyvinuta celá řada technik jejich velkoobjemových separací. Zvyšující se náročnost na kvalitu a čistotu Lf a LPO vedla v průběhu doby k vývoji sofistikovanějších a procesně i finančně efektivnějších separačním postupům. Obecně lze říci, že jako nejčastější zdroj pro velkoprodukcí Lf a LPO se bez ohledu na separační techniku používá kravské mléko. Koncentrace Lf je zde cca 100 mg.l<sup>-1</sup>, koncentrace LPO okolo 30 mg.l<sup>-1</sup>. Značnou výhodou Lf při izolaci z kravského mléka je jeho vysoká termostabilita [Sanchez, L.; Peiro, J. M.; Castillo, H.; Perez, M. D.; Ena, J. M.; Calvo, M. *J. Food Sci.* 1992, 57, 873-879]. Díky tomu lze Lf izolovat i ze syrovátky, což je odpadní produkt mlékárenství, který prošel pasterizací. Koncentrace Lf je ovšem v syrovátce značně nižší (až osmkrát) než v čerstvém mléku. Oproti tomu je méně stabilní LPO v syrovátce většinou již zcela v denaturovaném, tj. neaktivním, stavu.

Řešení dle spisu US 4 436 658 se zabývá problematikou separace Lf a imunoglobulinů (dále Ig) právě ze syrovátky pomocí kolonové adsorpce na silikagel při bazických podmínkách (pH 7,9 až 8,5). Ze silikagelu lze poté eluovat Lf změnou iontové sily (*I*) při nízkých hodnotách pH; např. *I* = 0,5 M, pH 4. Touto metodou jsou souběžně eluovány i Ig, proto má získaný Lf maximální čistotu do 70 %, běžně okolo 50 %. Tato čistota je naprosto nevyhovující stejně tak jako výtěžnost Lf na 1 litr čerstvého mléka.

Častěji je prováděna separace Lf, případně i LPO, pomocí kationtově-výměnné chromatografie. Je to způsobeno faktem, že pouze tyto dva minoritní



syrovátkové proteiny z velkého množství ostatních syrovátkových proteinů jsou za neutrálního pH v mléce/syrovátce kladně nabity, jejich hodnota pH je vyšší než 7, přičemž pH čerstvého mléka je okolo 6,7. Proto se v průmyslovém měřítku jiné postupy separace, jako např. zmíněná separace na silikagelu, gelová chromatografie, afinitní chromatografie, separace založené na specifické interakci s protilátkou, téměř nevyužívají.

Separace Lf pomocí kationtově-výměnné chromatografie, a to nejen ze syrovátky, je popsána ve spise US 4 791 193. Zde jsou detailně rozebrány typy iontoměničových adsorbentů z hlediska jejich kapacity pro modelový protein a dále pak výtěžnost a čistota izolovaného Lf. Jako nejvhodnější adsorbenty jsou zde identifikovány iontoměniče z (bio)polymerních materiálů, tj. agarosa, agarosa-dextran, hydroxylovaný polymethakrylát aj., se slabě kyselou karboxylovou funkcí na povrchu. Výhodou těchto sorbentů je jejich vysoká porozita, která zaručuje vysokou kapacitu, a jejich hydrofilní povaha, která nedenaturuje separované proteiny. Z těchto sorbentů lze navázaný Lf a LPO vymýt pouhou změnou iontové síly. Kromě syrovátky je zde Lf izolován i z odstředěného mléka, které v uvedeném případě neprošlo pasterizací. V zaběhnutém mlékárenském provozu, který se věnuje kompletnímu zpracování mléka, je však téměř nemyslitelné přestavět výrobu tak, aby pasterizace byla provedena až po odstředění. Kromě toho spis neřeší separaci LPO, která se během izolace Lf za daných podmínek také váže na iontoměničový sorbent.

Problematika separace Lf a LPO pomocí kationtově-výměnné chromatografie je řešena ve spise US 5 516 675. Zde je popsáno, při jakých podmínkách jsou eluovány jednotlivé proteiny navázané na iontoměničový sorbent. Jsou zde použity různé hodnoty pH a různé hodnoty iontové síly. LPO je zde eluována jako první při pH nižším než 5, iontovou silou do hodnoty 0,5 M. Následně jsou eluovány Ig při pH okolo 7 a  $I \leq 0,5$  M, přitom jen malé množství Ig se váže na kationtový iontoměnič, tj. mají isoelektrický bod nad 7, a jejich množství je v různých typech i ve várkách mléka

jiné, většinou však téměř zanedbatelné. Jako poslední je eluován Lf při pH okolo 7 a  $I = 1$  M. Diskutabilní je však čistota izolovaných frakcí (80 % a vyšší), která byla určena SDS-PAGE (polyacrylamid gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného), pomocí které se nedá rozlišit Lf a LPO. Navíc používání pufrů při elucích proteinů je v průmyslových aplikacích procesně náročnější.

Další relevantní spis US 5 596 082 aplikuje výše uvedené postupy při kolonové separaci Lf a LPO na kationtovém iontoměničči o velikosti náplně vyšší než 100  $\mu\text{m}$ , s výhodou i 300  $\mu\text{m}$ , eluce probíhá gradientem iontové síly při neutrálním pH. Díky těmto parametrům náplně kolony může syrovátka kolonou protékat vysokou rychlostí, a to až 600 objemů kolony za hodinu. To je zvláště výhodné při separacích z médií, kde je separovaná látka přítomna pouze v malém množství, tak jako právě Lf a LPO v mléce. Toto řešení však stále neposkytuje možnost separace Lf a LPO z mléčného média, které neprošlo pasterizačním procesem.

Jeden ze způsobů, který lze také použít pro rychlejší izolaci Lf a LPO je tzv. membránová separace. Při této separaci neprotéká syrovátka kolonou, ale systémem membrán, které jsou také funkcionalizované na typickou kationtově-výměnnou separaci (-OSO<sub>3</sub>H, -COOH aj.). Tento způsob separace je např. uveden v publikaci *Isolation and purification of proteins* (Hatti-Kaul, R. & Mattiasson, B. Marcel Dekker, Inc.: New York, 2003). Tato separace je však ještě náročnější na předzpracování syrovátky či mléčného média, bez kterého může mnohem častěji docházet k blokování separační jednotky než u kolonového uspořádání. Separace z čerstvého mléka se tedy při tomto uspořádání jeví nereálná.

Další známé spisy týkající se velkokapacitní separace Lf a LPO již pouze rozšiřují zde uvedené separační postupy. Jako příklad je možno uvést spis US 7 932 069, ve kterém je popsán proces produkce čistější frakce LPO díky vysrážení ostatních nečistot během ultrafiltrace. Další příklad obdobného procesu je uveden ve

spise US 5 919 913, kde je řešena separace lidského Lf z mléka transgenně upravených krav. Nedílnou součástí produkce těchto proteinů je také i čištění získaných roztoků pomocí ultrafiltrace a následné sušení do práškové formy pomocí sprejového sušení či lyofilizačních procesů. Tyto známé postupy je vhodné kombinovat takovým způsobem, aby docházelo k co nejnižší degradaci kvality, tj denaturaci čištěných vzorků proteinů. Jako příklad použitelného postupu čištění lze uvést řešení výrobní linky dle spisu CZ 23725 U1, kde je popsáno, jak vhodnou kombinací zmíněných procesů lze dosáhnout minimálního znehodnocení vzorků.

Je zřejmé, že zavedené separační postupy poskytují frakce Lf a LPO o dostatečné čistotě. V současné době je však klíčovým parametrem jejich výtěžnost na objem zpracovávaného mléka, a také kvalita Lf a LPO. Oba tyto klíčové parametry závisí především na typu mléčného média, ze kterého jsou tyto proteiny izolovány. Výhodou izolace ze syrovátky je jednoznačně nízká cena, koncentrace Lf je zde však velmi nízká a LPO se zde již téměř nevyskytuje. Odstředěné mléko oproti tomu má vysokou koncentraci Lf, kvalita a koncentrace LPO je zde však stále závislá na typu pasterizace. Pro mlékárenské provozy zabývající se produkcí širší škály produktů je však výhodnější provádět pasteraci, při které je LPO plně denaturována. Ke všemu se musí odstředěné mléko před separací ještě náročně předzpracovávat, aby nedocházelo k blokování kolon, popř. membrán, čímž se notně zvyšuje procesní náročnost.

Problematiku separačního média řeší spis US 2005/0220953 A1 popisující, jak získat koncentrovaný roztok Lf v průběhu zpracování mléka. Nízká koncentrace Lf v syrovátce je způsobena tím, že při srážení kaseinu ve výrobě sýrů a tvarohů dochází i k sedimentaci Lf, který má opačný náboj než kasein a silně s ním iontově interaguje. V syrovátce je posléze jen minimum Lf. Tato patentová přihláška popisuje postup, jak následně jednoduše uvolnit Lf do roztoku ze sraženého kaseinu např. iontovou silou, tj. roztoky NaCl. Získaný roztok se následně musí předzpracovat před



samotnou chromatografickou separací, a to odstraněním NaCl. Sražený kasein je také nutné z roztoku NaCl přečistit, zvláště pokud je kasein následně zpracován např. na tvary. Díky tomuto postupu se sice zvýší výtěžnost na objem zpracovávaného mléka a získá se poměrně koncentrovaný roztok Lf, čímž se zkrátí doba chromatografické separace, ale proces se technologicky náročnější. Ke všemu lze takto využít jen omezené množství mléka, které již prošlo pasterizací.

Aby byly splněny všechny podmínky kladené na separaci Lf a LPO, tj. čistota, kvalita a dobrá výtěžnost, jeví se jako nejvhodnější izolovat Lf a LPO kationtově-výměnnou chromatografií rovnou z čerstvého mléka. Čerstvé mléko nicméně obsahuje kuličky tuku (až 10  $\mu\text{m}$  velké), které ucpávají separační jednotku (kolonu, membránu). V literatuře je možné dohledat postupy, aplikující čerstvé mléko na kolonu při 37 °C [C. J. Fee and A. Chand, *Sep. Purif. Technol.*, 2006, 48, 143-149]. Při této teplotě totiž tuk přechází do kapalné fáze a neblokuje kolonu. V průmyslovém měřítku je však zcela nemyslitelné zahřát čerstvé mléko na tuto teplotu kvůli možnosti velmi rychlého přemnožení bakterií.

Rozumná cesta, jak separovat Lf a LPO o vysoké kvalitě, tedy z čerstvého média, je separace z mléčného proteinového koncentrátu (MPK). MPK se připravuje kombinací mikrofiltrace a ultrafiltrace. Z čerstvého mléka se mikrofiltrací oddělí tuk a kasein, který se dále zpracovává. Prošlé syrovátkové proteiny se zakoncentrují pomocí ultrafiltrace, aby se Lf a LPO nemuselo separovat z velkého množství média. Tento technologický postup je však extrémně procesně a investičně náročný a je téměř nemožné ho zavést do zaběhnutých mlékárenských provozů.

Jako vhodnou alternativou stávajícím procesů se jeví magnetická separace, která má nespornou výhodu v tom, že je založena na tzv. vsádkové separaci, tedy že separované látky jsou z média vychytávány pouhým mechanickým mícháním sorbentu v celém objemu tohoto média. Lze ji tedy použít i v heterogenních

systémech, ze kterých lze magnetický sorbent jednoduše odstranit vnějším magnetickým polem. Díky vsádkové separaci nemusí médium protékat přes separační jednotku (kolonu, membránu), což je procesní krok, jehož časová náročnost u typických velkokapacitních chromatografických přístupů roste s objemem média. Magnetická separace se tedy jeví jako relativně časově nenáročná a také nenáročná na kvalitu a homogenitu separačního média.

Jako magnetický materiál pro separaci biosubstancí se nejčastěji používají nanočástice či mikročástice založené na oxidech železa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), které jsou komerčně dostupné či se dají připravit jednoduchými syntetickými postupy. Možností jejich povrchových úprav, tzv. funkcionalizací, je nepřeborné množství. Na jejich povrch se dá ukotvit celá řada polymerních či povrchově aktivních látek, které mohou být dále modifikovány. Dosud použité postupy pro separaci, izolaci či purifikaci proteinů byly důkladně shrnuty v literatuře [Safarik, I.; Safarikova, M. *BioMagn. Res. Technol.* 2004, 17, 1-17].

Zásadní práce ve vývoji magnetických separačních metod byla vypracována v německém Karlsruhe a je popsána ve spise US 6942806. Zde byla vyvinuta metoda nazývaná se High Gradient Magnetic Fishing (vychytávání gradientovým magnetickým polem), dále jen HGMF. Jedná se o specifický způsob vychytávání magnetických částic, který je založen na průtočné separaci částic „vypínatelným“ permanentním magnetem. Poměrně důležitou roli v konceptu HGMF, hrají magnetické sorbenty. Pro dobré fungování HGMF musí tyto sorbenty splňovat následující parametry. Musí být co nejméně porézní pro rychlou adsorpci cílené látky (do 5 minut) a měly by být superparamagnetické, tzn. nevykazující žádnou remanentní magnetizaci, a tím i dobře rozptýlitelné po separaci. Další parametry jsou vysoká plocha povrchu pro vyšší kapacitu ( $20$  až  $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) a velikost těchto částic (spíše agregátů částic) nad  $500 \text{ nm}$  pro rychlejší odpověď na magnetické pole či případnou možnost separace částic přes velmi jemné mechanické filtry [Franzreb,

M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 70, 505-516].

Tento systém byl také vyzkoušen na separaci Lf a LPO. Jako magnetické částice byly použity agregáty superparamagnetického oxidu železa připravené precipitační metodou dle Massarta. Tyto agregáty byly následně funkcionalizovány na silně kyselou kationtově výměnnou skupinu (-OSO<sub>3</sub>H) náročnou několikakrokovou syntézou, která byla založena na metodě funkcionalizace povrchu částic. Nejlepší kapacita, která byla dosažena adsorpcí modelového proteinu, lysozymu, na povrch takto připravených částic, měla hodnotu 230 mg lysozymu na 1 g částic při pokojové teplotě. Neuspokojivá byla však čistota vyizolovaného Lf, protože pomocí těchto částic nebylo možné od sebe rozseparovat Lf a LPO [(a) Heebøll-Nielsen, A.; Justesen, S. F. L.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T. *Sep. Sci. Technol.* 2004, 39, 2891-2914, (b) Heebøll-Nielsen, A.; Justesen, S. F. L.; Thomas, O. R. T. *J. Biotechnol.* 2004, 113, 247-262].

Jednou z dalších metod, která byla použita pro separaci Lf, byla afinitní magnetická separace pomocí magnetických nanočástic, na kterých byl ukotven heparin. Takto připravené částice vykazovaly kapacitu 164 mg proteinu na gram částic při 37 °C v roztoku samotného Lf, a díky specifické adsorpci navazovaly ze syrovátky pouze tento protein, který byl následně eluován roztokem NaCl. [Chen, L.; Guo, C.; Guan, Y.; Liu, H. *Sep. Purif. Technol.* 2007, 56, 168-174]. Poměrně nízká kapacita a velmi finančně i procesně náročná příprava těchto částic se však zdá jako velká limitace rozšíření tohoto přístupu do větších měřítek.

Lze shrnout, že magnetické separace založené na vsádkové separaci mají velký potenciál ve velkokapacitních izolacích biomakromolekul ze „surového“ a tedy i nehomogenního média. Tyto separace by mohly svými výhodami zastínit tradiční chromatografické postupy díky své nenáročnosti na předpřípravu média a díky

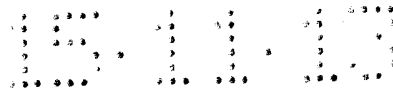


procesní jednoduchosti. V případě izolace Lf však zatím nebyl použit postup magnetické izolace, a to ani v případě HGMF, který by poskytoval Lf o velké čistotě, byl ekonomicky i procesně nenáročný a zároveň by umožňoval izolovat Lf z čerstvého mléka, stejně jako ostatních mléčných médií, ve větším měřítku. Je proto úkolem předkládaného vynálezu představit novou metodu separace Lf a LPO, která by s využitím výše uvedených a popsanych postupů umožnila získávání těchto proteinů ze všech druhů mléčných médií při zavedení do zaběhnutých mlékárenských provozů, které se zabývají produkcí široké škály svých produktů, a to neinvazní formou při poměrně malých zásazích do technologií výroby mléčných produktů při malé finanční náročnosti na pořízení příslušného zařízení.

#### Podstata vynálezu

Stanoveného cíle je dosaženo vynálezem, kterým je způsob separace syrovátkových proteinů, zejména laktoferinu nebo laktoperoxidázy, z mléčného média, s výhodou z čerstvého mléka nebo syrovátky, a to pomocí sorbentů, jehož podstata spočívá v tom, že mléčné médium se nejdříve promícháním uvede do kontaktu s mechanicky nebo magneticky filtrovatelným sorbentem tvořeným polymerním materiálem funkcionalizovaným na kationtově výměnnou funkci, který je přitom udržován ve vzhledu v odděleném filtračním prostoru obsahujícím filtrační mechanismus, zejména filtrační koš, a adsorbuje syrovátkové proteiny, načež se z filtračního prostoru vyjme filtrační mechanismus s adsorbovanými syrovátkovými proteiny a po jeho promytí za účelem odstranění nenasázaných proteinů a jiných nežádoucích složek mléčného média se podrobí eluci navázaných syrovátkových proteinů, které se následně zpracují do práškové formy.

Ve výhodném provedení je adsorpce syrovátkových proteinů je prováděna po dobu 0,1 až 24 hodin, optimálně 2 až 6 hodin, při teplotě 1 až 85°C za použití



sorbentu obsahující kationtově výměnnou skupinu  $-\text{COO}^-$  nebo  $-\text{OSO}_3^-$  nebo  $-\text{PO}_3^{2-}$  nebo  $-\text{OPO}_3^{2-}$  nebo sorbentu obsahujícího enkapsulovanou magnetickou složku, s výhodou materiál na bázi anorganických sloučenin kovů či částic nulamocných kovů, zejména magnetické částice oxidů dvojmocného nebo trojmocného železa, popřípadě je adsorpce prováděna za použití směsi vybraných sorbentů.

Je rovněž výhodné, že po promytí sorbentu vodou nebo roztokem uvolňujícím nenavázané proteiny a nežádoucí složky mléčného média jsou z něj eluovány jeden nebo oba syrovátkové proteiny iontovou silou, s výhodou v krokovém gradientu, když v případě separace proteinů z mléčného média obsahujícího zároveň laktoferin a laktoperoxidázu je po adsorpci proteinů a promytí sorbentu v prvním kroku eluována laktoperoxidáza a případné nečistoty jako imunoglobuliny iontovou silou v rozsahu  $0,01$  až  $0,3 \text{ mol/dm}^3$ , v druhém kroku zbývající laktoperoxidáza iontovou silou v rozsahu  $0,05$  až  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  a v posledním kroku laktoferin iontovou silou  $0,3$  až  $5 \text{ mol/dm}^3$ , když velikost iontové síly je volena v závislosti na kyselosti kationtově výměnné skupiny použitého sorbentu. V případě separace proteinů z mléčného média obsahujícího převážně laktoferin jsou po adsorpci proteinů a promytí sorbentu v prvním kroku eluovány případné nečistoty jako imunoglobuliny iontovou silou v rozsahu do  $0,3 \text{ mol/dm}^3$  a následně laktoferin iontovou silou až  $5 \text{ mol/dm}^3$ .

V optimálním případě jsou vyizolované proteiny zpracovány do práškové formy diaultrafiltrací nebo lyofilizací nebo sprejovým sušením a po eluci syrovátkových proteinů je použitý sorbent regenerován promytím vodou a teplotní nebo chemickou sterilizací a znovu použit pro separaci.

Konečně je výhodné, že v případě použití sorbentu obsahujícího enkapsulovanou magnetickou složku je mléčné médium vrácené do dalšího výrobního procesu podrobováno magnetické separaci.



Dále je podstatou vynálezu zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů obsahující skladovací tank mléčného média opatřený hlavním míchadlem a výpustí, jehož podstata spočívá v tom, že v oblasti proudění promíchávaného mléčného média je umístěn filtrační mechanismus s obsahem ve vznosu udržovaných částic sorbentu, s výhodou filtrační koš, tak, že je ponořen v separačním médiu, přičemž velikost ok filtračního mechanismu se v závislosti na druhu použitého sorbentu pohybuje v rozmezí hodnot 1  $\mu\text{m}$  až 1 cm.

Ve výhodném provedení je filtrační mechanismus umístěn ve vnitřním prostoru skladovacího tanku nebo je filtrační mechanismus umístěn v separačním tanku instalovaném v potrubním systému mimo skladovací tank, přičemž v potrubním systému je mezi skladovacím tankem a separačním tankem zabudováno plnění čerpadlo a na výtoku ze separačního tanku průtočné čerpadlo.

V optimálním provedení zařízení je filtrační mechanismus vybaven sekundárním míchadlem a na výpusti ze skladovacího tanku je zabudován magnetický separátor.

Vynálezem se dosahuje vyššího účinku v tom, že se na rozdíl od konvenčního chromatograficko-kolonového přístupu vyznačuje značně jednodušším procesem adsorpce, který je prováděn pouhým rozmícháváním sorbentu v celém objemu média. Médium, tj. čerstvé mléko, mléčný proteinový koncentrát, syrovátka atd. nemusí protékat pod tlakem přes kolonu či membránu jako u typického chromatografického přístupu. Díky tomu navíc nemůže docházet k častému blokování a ucpávání separační jednotky, tedy kolony nebo membrány, a zároveň není doba separace závislá na objemu média ale pouze na poměru sorbentu k médiu. Další výhodou dle tohoto vynálezu je možnost použití navržené separace i v čerstvém mléku. To umožňuje izolovat Lf a LPO v té nejlepší kvalitě i výtěžnosti před samotnou pasterizací. Zjednodušení nastává i při samotném procesu eluce.

Eluční objem potřebný pro vyvázání proteinů ze sorbentů pouhým mechanickým promícháním je totiž značně menší než při protékání elučního roztoku kolonou. Menší eluční objem značně ulehčuje další zpracování vyizolovaných proteinů. Ve srovnání s dnes nejmodernějším způsobem separace, tj. chromatografickou separací z mléčného proteinového koncentráту, se košově-vsádková separace jeví jako neinvazivní, tedy finančně i technologicky méně náročná, pro zavedení do zaběhnutých mlékárenských provozů, které se zabývají produkcí široké škály svých produktů. Kvalita i čistota Lf a LPO je u obou procesů srovnatelná. Košově-vsádková separace pomocí porézních sorbentů však poskytuje možnost izolovat ze širšího spektra mléka. Díky tomu se tato izolace jeví jako vhodnou alternativou k současným separačním procesům, avšak nabízí možnost vyšší výtěžnosti na objem celkově zpracovaného mléka za současného snížení technologické náročnosti.

*Objasnění výkresů*  
~~Popis obrázků na připojených výkresech~~

Podstata vynálezu a jeho konkrétní provedení jsou schematicky znázorněny na připojených výkresech, na nichž

obr.1 je schéma základního provedení zařízení pro provádění způsobu separace podle vynálezu s filtračním košem umístěným ve skladovacím tanku,

obr.2 je schéma alternativního provedení zařízení s filtračním košem umístěným v separačním tanku,

obr.3 je snímek z optického mikroskopu s vyobrazením magnetický kationtový iontoměnič s  $-OSO_3H$  funkcí o velikosti částic 50 až 80  $\mu m$ , který byl použit při separaci Lf a LPO,

obr.4 a obr.5 jsou vyobrazení sorbentu z obr.3 nad a pod filtrační tkaninou z nerezového materiálu s oky 50  $\mu m$ , ze které lze konstruovat výplň separačních košů,

obr.6 je grafické znázornění závislosti maximální kapacity (tj. hmotnosti vyvázaného proteinu) Lf na hmotnosti použitého sorbentu –OSO<sub>3</sub>H funkcí,

obr.7 je grafické znázornění závislosti maximální kapacity (tj. hmotnosti vyvázaného proteinu) Lf na hmotnosti použitého sorbentu s –COOH funkcí a

obr. 8 zobrazuje SDS-PAGE vyizolovaných proteinů, které byly získány postupem, který je uveden v příkladu 1 (I – proteinové standardy dle velikostní škály v kDA, II – Lf standard, III – proteiny v čerstvém mléku: Imunoglobuliny, Lf/LPO, hovězí sérový albumin, Imunoglobuliny (velká podjednotka), Imunoglobuliny (malá podjednotka), β–laktoglobulin, α–laktalbumin). IV – proteiny v čerstvém mléku po izolaci Lf a LPO, V – proteiny vymyté ze sorbentu vodou, VI – 1. frakce dle postupu v příkladu 1, VII – 2. frakce dle postupu v příkladu 1, VIII – 3. frakce dle postupu v příkladu 1.)

*uskutečnění*  
Příklady provedení vynálezu

Způsob separace Lf a LPO podle vynálezu je založený na tzv. košově-vsádkové separaci těchto proteinů pomocí typických chromatografických sorbentů z čerstvého mléka, z odstředěného mléka či ze syrovátky nebo z ostatních Lf obsahujících médií. Tento typ separace kombinuje možnost vsádkové separace jako v případě magnetických separací, tj. izolace pomocí rozmíchání sorbentu v celém objemu média, a zároveň využívá typických chromatografických sorbentů, které lze z média odstranit mechanickým filtrováním případně i vnějším magnetickým polem. Zároveň lze po eluci, tedy vymytí, separovaných proteinů sorbent opakovaně použít.

Uvedeného cíle je dosaženo, použije-li se při separaci Lf a LPO sorbent typický pro kolonové uspořádání separací Lf a LPO, tedy sorbent splňující následující parametry:

- a) Sorbent je tvořen polymerním materiálem, který je funkcionalizován na typickou kationtově výměnnou funkci, např.  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{OSO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ ,  $-\text{OPO}_3^{2-}$  či jinou skupinou s kyselým vodíkem nebo ve formě její soli.
- b) Polymerní materiál sorbentu má především hydrofilní charakter, avšak není ve vodě za běžných podmínek rozpustný. Hydrofilní charakter je vhodný pro zachování nativního stavu proteinů v průběhu separace. Dále musí polymerní materiál splňovat možnost další funkcionalizace na typickou kationtově výměnnou funkci. Zejména se jedná o materiály tvořené ve vodě nerozpustnými polysacharidy (např. agaróza, celulóza, modifikovaný dextran) nebo případně i nehydrofilními organickými látkami běžně využívanými jako stacionární fáze chromatografických kolon při separaci biomakromolekul, např. sorbenty které vznikly polymerací akrylamidu, styrenu, divinylbenzenu, metakrylátů aj.
- c) Pro dosažení cíle tohoto vynálezu musí dále sorbent vykazovat potřebnou mechanickou stabilitu a určitou velikostní distribuci, aby vydržel procesní nároky na něj kladené při separaci Lf a LPO a zároveň aby byl i mechanicky filtrovatelný. Se značnou výhodou lze použít sorbent splňující výše zmíněné nároky (a, b), jenž dále vykazuje sférický charakter, tj. má kulovitý tvar, a má velikost v řádech desítek až stovek mikrometrů, např. s distribucí 50 až 80  $\mu\text{m}$ , 80 až 150  $\mu\text{m}$ , pro snadnou filtrovatelnost mechanickými filtry. Díky sférickému tvaru je sorbent posléze i mechanicky stabilnější.
- d) Dále musí být sférické částice sorbentu vysoce porézní a vykazovat vysokou kapacitu pro Lf/LPO.
- e) Sorbentem je i polymerní materiál s uvnitř zabudovaným magnetickým materiálem, s výhodou magnetické nanočástice oxidu železa případně jiný materiál reagující na vnější magnetické pole. Tato magnetická složka následně slouží jako druhý pojistný mechanismus, kromě mechanicky-filtrujícího způsobu, jak odstranit sorbent z mléčného či jiného média.

Základní provedení zařízení k provádění dané separace je znázorněno na obr.1 a sestává ze skladovacího tanku 1 mléčného média, např. čerstvého mléka, opatřeného hlavním míchadlem 2, v jehož vnitřním prostoru je umístěn filtrační mechanismus 3, s výhodou filtrační koš, velikost jehož ok se v závislosti na druhu použitého sorbentu pohybují v rozmezí hodnot 1  $\mu\text{m}$  až 1 cm tak, že je ponořen v separačním médiu. Na výpusti 4 ze skladovacího tanku 1 je pak zabudován pojistný magnetický separátor 5 pro zajištění 100% oddělení magnetického sorbentu z média. Díky proudění média ve skladovacím tanku 1 dochází k obměně média i ve filtračním mechanismu 3, kde je pomocí sekundárního míchadla 31 zajišťován vznos částic sorbentu a dochází k jejich intenzivnímu kontaktu se separačním médiem. Filtrační mechanismus 3 mechanicky zamezí přímému kontaktu sorbentu s celým objemem média, avšak zachová možnost jejich vzájemné interakce.

V alternativním provedení zařízení podle obr.2 je filtrační mechanismus 3, tedy koš, umístěn v separačním tanku 6 instalovaném v potrubním systému 9 vyvedeném mimo skladovací tank 1, kam je mléčné médium přečerpáváno pomocí plňčího čerpadla 7, které zajišťuje neustálou obměnu média. Ze separačního tanku 6 je pak médium vedeno průtočným čerpadlem 8 zpět do skladovacího tanku 1. Průtok média přes separační mechanismus 3 je možno zajišťovat po celou dobu jeho skladování před samotným zpracováním mléka.

Vlastního cíle tohoto vynálezu, tj. separace Lf a LPO z mléčných či jiných Lf obsahujících médií pomocí košově-vsádkové separace za použití uvedených sorbentů, vykazujících vysokou kapacitu pro Lf a LPO, je dosaženo pomocí několika jednoduchých operací.

Počáteční krok při izolaci Lf a LPO je adsorpce těchto proteinů pomocí sorbentu, tj. pomocí kationtově-výměnné interakce. S výhodou je sorbent při adsorpci mechanicky rozmíchán do celého objemu mléka/syrovátky i ve velkých objemech.

Množství vyizolovaného Lf/LPO následně závisí zejména na kapacitě použitého sorbentu pro daný protein, na poměru magnetického sorbentu k množství média, na době kontaktu a teplotě média. Další důležitý faktor ovlivňující čistotu separovaných proteinů je pH daného mléčného média, tato hodnota by měla být okolo 7 (např. 6,7, tj. pH čerstvého mléka).

Fáze sorpce, tj. vychytávání, proteinů jde s velkou výhodou provádět v skladovacích nádobách, např. tancích, ze samotného čerstvého mléka před jeho vlastním zpracováním jako je pasterizace, odstředění, aj., jak je znázorněno na obr.1. Podmínkou je, aby tato skladovací nádoba v sobě měla vložený či zabudovaný filtrační mechanismus, například koš, tedy pevnou konstrukci obloženou filtrační tkaninou z nerezového potravinářského materiálu. Proces sorpce proteinů je zaručen mechanickým pohybem sorbentu, avšak díky filtračnímu koši se sorbent nemůže dostat do dalších mlékárenských zpracovatelských procesů a je mechanicky zachycen při vypouštění mléka na filtrační tkanině filtračního koše. V případě použití magnetického derivátu tohoto sorbentu může být na odtoku čerstvého mléka do další fáze zpracování umístěn magnetický separátor pro kompletní zachycení sorbentu, aby bylo dosaženo 100% záruky, že se sorbent nedostane do dalších zpracovatelských fází. Tyto magnetické separátory jsou komerčně dostupné a jsou také často používány v potravinářském průmyslu, např. při výrobě čokolády.

Tento košově-vsádkový proces separace proteinů z čerstvého mléka lze také provádět v jiných uspořádáních, jak je zobrazeno na obr. 2. Tato separace je založena na stejném principu jako výše uvedený proces separace, jen je sorbent umístěn ve vedlejší, až desetkrát menším, tanku s filtračním košem s vlastním mechanickým mícháním. Čerstvé mléko je v tomto menším separačním tanku obměňováno pomocí čerpadel, čímž je kompletně odděleno od samotného separačního procesu a celý zpracovatelský proces mléka je tak zcela nenarušen. Magnetická separace může být pak zařazena jen jako pojistná separace.

Další fází separace je několikanásobné promytí sorbentu vodou pro odstranění nenasázaných proteinů a jiných nežádoucích složek mléka. Poté následuje samotná eluce nasázaných proteinů. Eluci lze provést, obdobně jako adsorpci, pouhým mechanickým mícháním sorbentu v elučním roztoku. S výhodou lze eluci provést až v desetině objemu oproti objemu mléčného média, ve kterém byla provedena adsorpce. Lf a LPO se ze sorbentů eluují při obdobných hodnotách iontové síly jaké jsou využívány při klasických chromatografických řešeních. Při nízké iontové síle, např. 0,05 až 0,2 mol/dm<sup>3</sup> (dále M) roztoku NaCl o pH 7, která závisí na typu použitého sorbentu, se ze sorbentů eluují nežádoucí imunoglobuliny, jejichž pH dosahuje vyšší hodnoty než 7. Při nepatrně vyšší iontové síle, např. 0,1 až 0,5 M NaCl se eluuje LPO a při iontové síle 0,5 až 1 M roztoku NaCl se eluuje Lf. Získané roztoky proteinů po odstranění sorbentu lze pouze odsolit a zakonzentrovat (např. dialtrafiltrací), posléze ponechat vyschnout běžně používanými procesy (např. sprejové sušení, lyofilizace). Sorbent následně stačí opět promýt vodou, sterilizovat, například teplotně nebo chemicky, a vrátit pět na začátek separace do separačního tanku a celý proces separace proteinů mnohonásobně opakovat.

Následně uvedené příklady nastiňují jen malou část ze široké škály možností separace Lf a LPO pomocí porézních sorbentů dle technického řešení. Jako sorbent zde byl použit magnetický kationový iontoměnič na bázi celulózy s -OSO<sub>3</sub>H a -COOH funkcí. Jako sorbent lze však použít i jiné typy (magnetických) porézních sorbentů, které se s výhodou používají jako náplně kolon pro separaci proteinů (bez magnetické složky). Je zde ilustrován především fakt, že lze Lf a LPO izolovat z čerstvého mléka, dále pak poměr částic k mléčnému médiu, a čistoty elučních frakcí v závislosti na kapacitě a typu použitého sorbentu (slabě kyselá či silně kyselá výměnná funkce).

Čistota Lf a LPO frakcí byla určena pomocí poměru koncentrace daného proteinu k celkové koncentraci všech proteinů. Koncentrace Lf byla určena pomocí

ELISA KITu, koncentrace LPO pomocí stanovení peroxidázové aktivity tohoto enzymu k ABTS a celková koncentrace proteinů pomocí Bradfordovy analýzy.

Příklad 1 :

Do 50 ml čerstvého mléka, které neprošlo pasterizací, bylo přidáno 0,8 ml koncentrovaného komerčně dostupného magnetického celulóзовého sorbentu s  $-OSO_3H$  funkcí, 50 až 80  $\mu m$ , který byl před samotným použitím třikrát promyt vodou. Hodnota pH vzniklé suspenze byla 6,7. Tato směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu následujících dvou hodin. Magnetický sorbent byl následně stažen ručním magnetem a třikrát promyt vodou. Poté byly eluovány proteiny mechanickým promícháním po dobu 10 minut ve třikrokovém elučním krokovém gradientu iontové síly v 5 ml roztoku NaCl o pH 7. V první frakci se při iontové síle 0,1 M eluovala LPO znečištěná bazickými imunoglobuliny, čistota této frakce LPO byla 60 %, výtěžek 1 mg. V druhé frakci bylo eluováno 0,6 mg LPO o čistotě 85 %. V posledním kroku byl eluován Lf, 4 mg o čistotě  $\geq 95$  %. SDS-PAGE vyizolovaných proteinů je zobrazena na obr. 3. Magnetický sorbent byl následně promyt vodou a znovu několikrát použito ve stejném uspořádání s obdobnými výtěžnostmi. Mléko bylo následně testováno na změnu tučnosti a kyselosti. Mléko před samotným přidáním sorbentu a mléko po odstranění částic s absorbovanými proteiny vykazovalo stejné hodnoty tučnosti i kyselosti.

Příklad 2 :

Adsorpce i eluce Lf a LPO byla provedena obdobně jako v příkladu 1. Magnetický sorbent však byl míchán v čerstvém mléce, jehož teplota byla po celou dobu adsorpce udržována v rozmezích 2 až 8 °C. Doba mechanického míchání byla proto zvednuta na 4 hodiny. První frakce obsahovala LPO o výtěžku 0,8 mg o přibližné čistotě 65 %, druhá frakce 0,45 mg LPO o čistotě 80 % a poslední frakce 4,2 mg Lf o čistotě  $\geq 95$  %.

Příklad 3 :

Adsorpce i eluce Lf a LPO byly provedeny obdobně jako v příkladu 1. Namísto magnetického kationtového iontoměniče se silně kyselou funkcí (-OSO<sub>3</sub>H), byl použit iontoměnič se slabě kyselou funkcí (-COOH). Tento magnetický iontoměnič vykazoval vyšší maximální kapacitu pro Lf (viz obr. 7). Do 200 ml čerstvého mléka byly přidány 2 ml tohoto magnetické iontoměniče. Postup adsorpce i eluce byl totožný jako v příkladu 1. Takto bylo získáno 3,2 mg LPO o čistotě 55 % z 1. Frakce, 2,9 mg LPO o čistotě 70 % z 2. Frakce a 12 mg Lf o čistotě ≥95 % z 3. frakce.

Příklad 4 :

Adsorpce Lf a LPO z 200 ml čerstvého mléka byla provedena stejným způsobem jako v příkladu 1, jako sorbent byl použit magnetický kationtový iontoměnič se středně kyselou funkcí (-O-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>). V první frakci se při iontové síle 0,05 M eluovala LPO, čistota této frakce LPO byla 45 %, výtěžek 5 mg. V druhé frakci bylo při iontové síle 0,2 M eluováno 2,8 mg LPO o čistotě 80 %. V posledním kroku bylo eluováno 15,8 mg Lf o čistotě ≥95 %.

Příklad 5 :

Pět mililitrů komerčně dostupného magnetického celulóзовého sorbentu s -OSO<sub>3</sub>H funkcí, bylo přidáno do 0,5 litru syrovátky (pasterizace 85 °C po dobu 20 s, kyselé srážení kaseinu, pH upraveno pomocí NaOH na hodnotu okolo 7). Magnetický sorbent byl následně v syrovátce mechanicky míchán (150 rpm) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Sorbent byl následně magneticky stažen a obdobně třikrát promyt vodou. Vzhledem k faktu, že samotná syrovátka již nevykazovala přítomnost LPO, byl sorbent jednou promyt málo koncentrovaným roztokem NaCl (*I* = 0,2 M) a posléze byl eluován samotný Lf iontovou silou 1 M. Takto bylo získáno 6 mg Lf o čistotě ≥ 98 %.



~~TRK~~

15.11.15

~~07.0043-815~~

- 21 -

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob separace syrovátkových proteinů, zejména laktoferinu nebo laktoperoxidázy, z mléčného média, s výhodou z čerstvého mléka nebo syrovátky, a to pomocí sorbentů, **vyznačující se tím**, že mléčné médium se nejdříve promícháním uvede do kontaktu s mechanicky nebo magneticky filtrovatelným sorbentem tvořeným polymerním materiálem funkcionalizovaným na kationtově výměnnou funkci, který je přitom udržován ve vznosu v odděleném filtračním prostoru obsahujícím filtrační mechanismus, zejména filtrační koš, a adsorbuje syrovátkové proteiny, načež se z filtračního prostoru vyjme filtrační mechanismus s adsorbovanými syrovátkovými proteiny a po jeho promytí za účelem odstranění nenasázaných proteinů a jiných nežádoucích složek mléčného média se podrobí eluci navázaných syrovátkových proteinů, které se následně zpracují do práškové formy.
2. Způsob separace syrovátkových proteinů podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že adsorpce syrovátkových proteinů je prováděna po dobu 0,1 až 24 hodin, optimálně 2 až 6 hodin, při teplotě 1 až 85°C.
3. Způsob separace syrovátkových proteinů podle nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že adsorpce syrovátkových proteinů je prováděna za použití sorbentu obsahující kationtově výměnnou skupinu  $-\text{COO}^-$  nebo  $-\text{OSO}_3^-$  nebo  $-\text{PO}_3^{2-}$  nebo  $-\text{OPO}_3^{2-}$  nebo sorbentu obsahujícího enkapsulovanou magnetickou složku, s výhodou materiál na bázi anorganických sloučenin kovů či částic nulamocných kovů, zejména magnetické částice oxidů dvojmocného nebo trojmocného železa, popřípadě je adsorpce prováděna za použití směsi vybraných sorbentů.

4. Způsob separace syrovátkových proteinů podle nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že po promytí sorbentu vodou nebo roztokem uvolňujícím nenavázané proteiny a nežádoucí složky mléčného média jsou z něj eluovány jeden nebo oba syrovátkové proteiny iontovou silou, s výhodou v krokovém gradientu.
5. Způsob separace syrovátkových proteinů podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že v případě separace proteinů z mléčného média obsahujícího zároveň laktoferin a laktoperoxidázu je po adsorpci proteinů a promytí sorbentu v prvním kroku eluována laktoperoxidáza a případné nečistoty jako imunoglobuliny iontovou silou v rozsahu 0,01 až 0,3 mol/dm<sup>3</sup>, v druhém kroku zbývající laktoperoxidáza iontovou silou v rozsahu 0,05 až 0,5 mol/dm<sup>3</sup> a v posledním kroku laktoferin iontovou silou 0,3 až 5 mol/dm<sup>3</sup>, když velikost iontové síly je volena v závislosti na kyselosti kationtové výměnné skupiny použitého sorbentu.
6. Způsob separace syrovátkových proteinů podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že v případě separace proteinů z mléčného média obsahujícího převážně laktoferin jsou po adsorpci proteinů a promytí sorbentu v prvním kroku eluovány případné nečistoty jako imunoglobuliny iontovou silou v rozsahu do 0,3 mol/dm<sup>3</sup> a následně laktoferin iontovou silou až 5 mol/dm<sup>3</sup>.
7. Způsob separace syrovátkových proteinů podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že vyizolované proteiny jsou zpracovány do práškové formy dialtrafiltrací nebo lyofilizací nebo sprejovým sušením.
8. Způsob separace syrovátkových proteinů podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že po eluci syrovátkových proteinů je použitý sorbent regenerován promytím vodou a teplotní nebo chemickou sterilizací a znovu použit pro separaci.

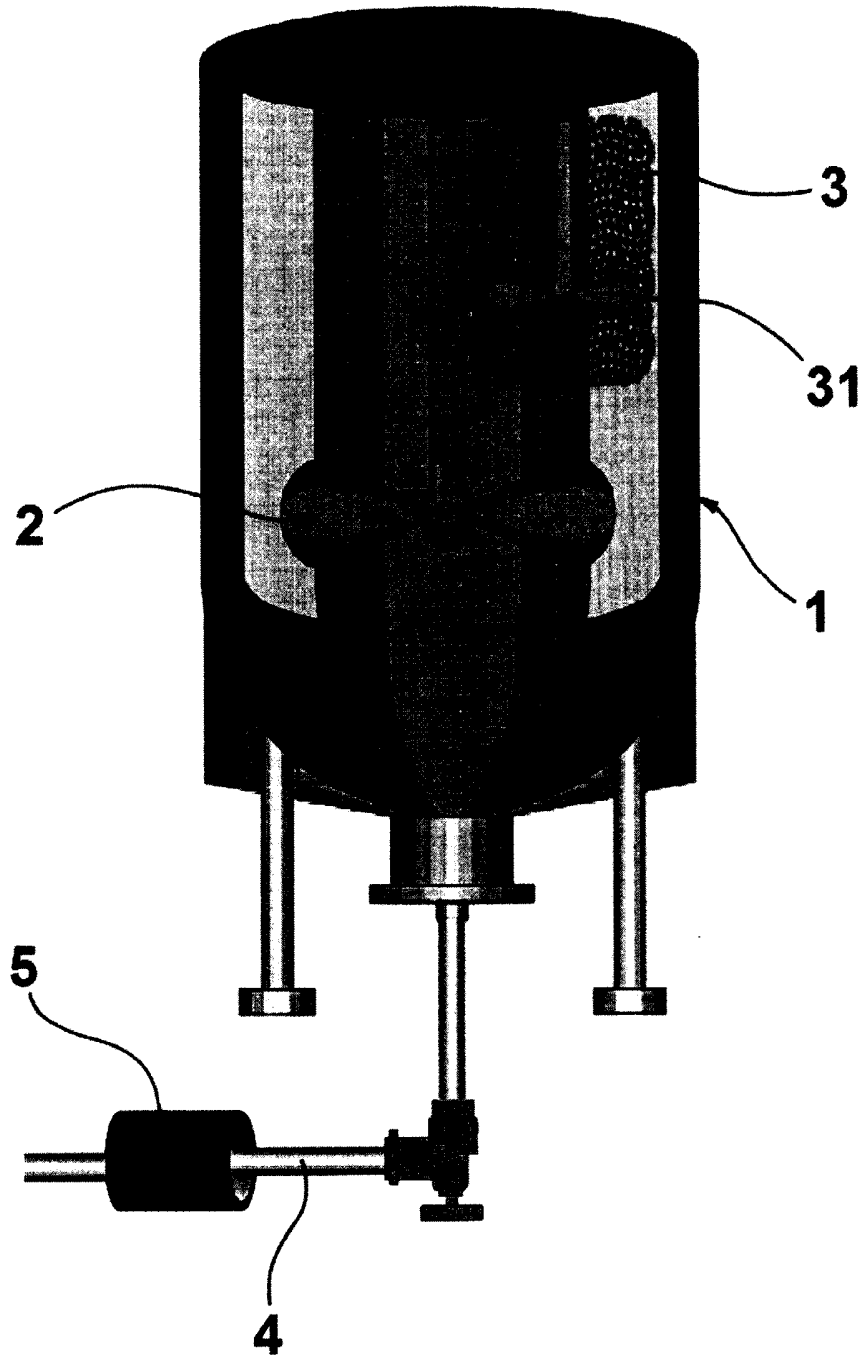


9. Způsob separace syrovátkových proteinů podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že v případě použití sorbentu obsahujícího enkapsulovanou magnetickou složku je mléčné médium vrácené do dalšího výrobního procesu podrobováno magnetické separaci.
  
10. Zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů podle nároků 1 až 9, obsahující skladovací tank (1) mléčného média opatřený hlavním míchadlem (2) a výpustí (4), **vyznačující se tím**, že v oblasti proudění promíchávaného mléčného média je umístěn filtrační mechanismus (3) s obsahem ve vzhledu udržovaných částic sorbentu, s výhodou filtrační koš, tak, že je ponořen v separačním médiu, přičemž velikost ok filtračního mechanismu (3) se v závislosti na druhu použitého sorbentu pohybuje v rozmezí hodnot 1  $\mu\text{m}$  až 1 cm.
  
11. Zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že filtrační mechanismus (3) je umístěn ve vnitřním prostoru skladovacího tanku (1).
  
12. Zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že filtrační mechanismus (3) je umístěn v separačním tanku (6) instalovaném v potrubním systému (9) mimo skladovací tank (1), přičemž v potrubním systému (9) je mezi skladovacím tankem (1) a separačním tankem (6) zabudováno plnicí čerpadlo (7) a na výtoku ze separačního tanku (6) průtočné čerpadlo (8).
  
13. Zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů podle některého z nároků 10 až 12, **vyznačující se tím**, že filtrační mechanismus (3) je vybaven sekundárním míchadlem (31).

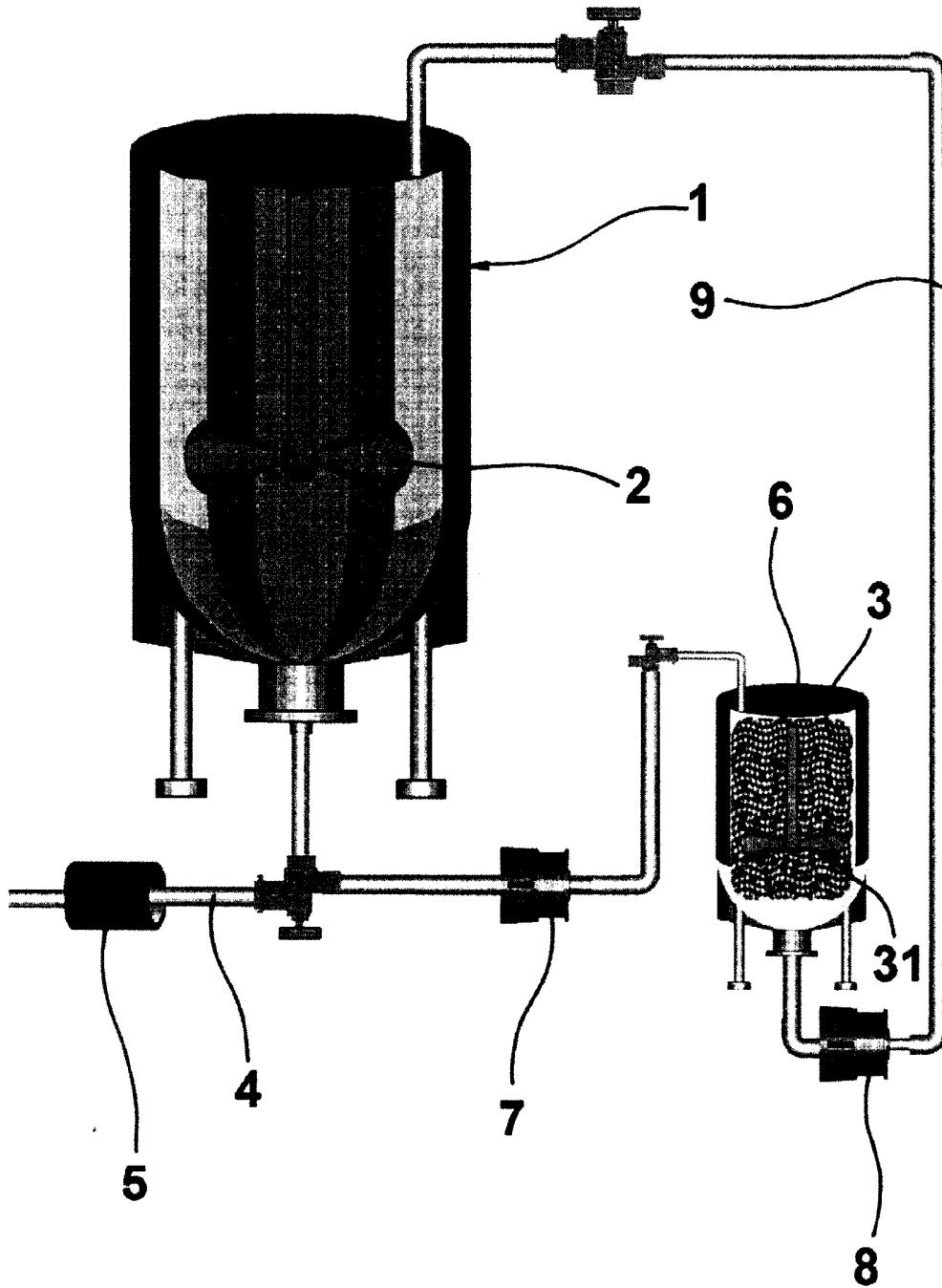


- 24 -

14. Zařízení k provádění způsobu separace syrovátkových proteinů podle některého z nároků 10 až 13, **vyznačující se tím**, že na výpusti (4) ze skladovacího tanku (1) je zabudován magnetický separátor (5).



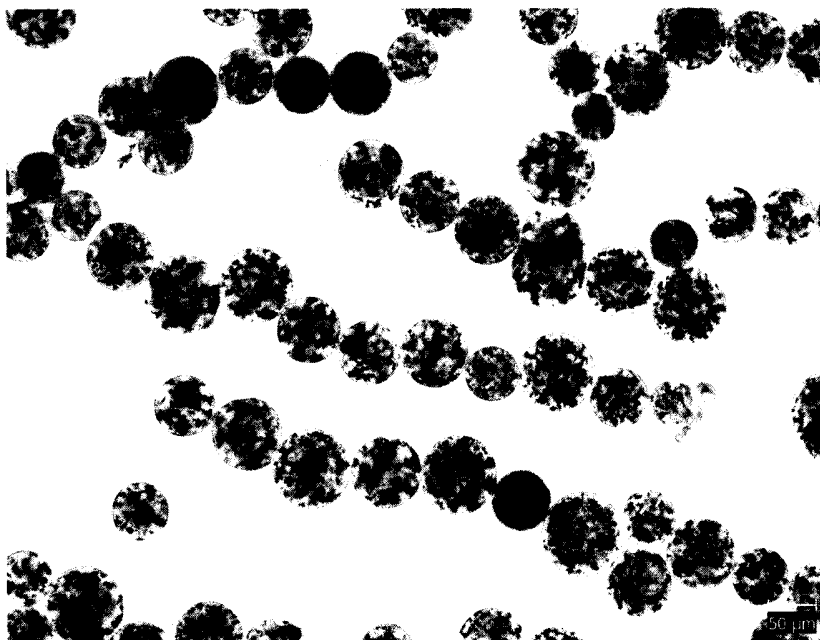
OBR. 1



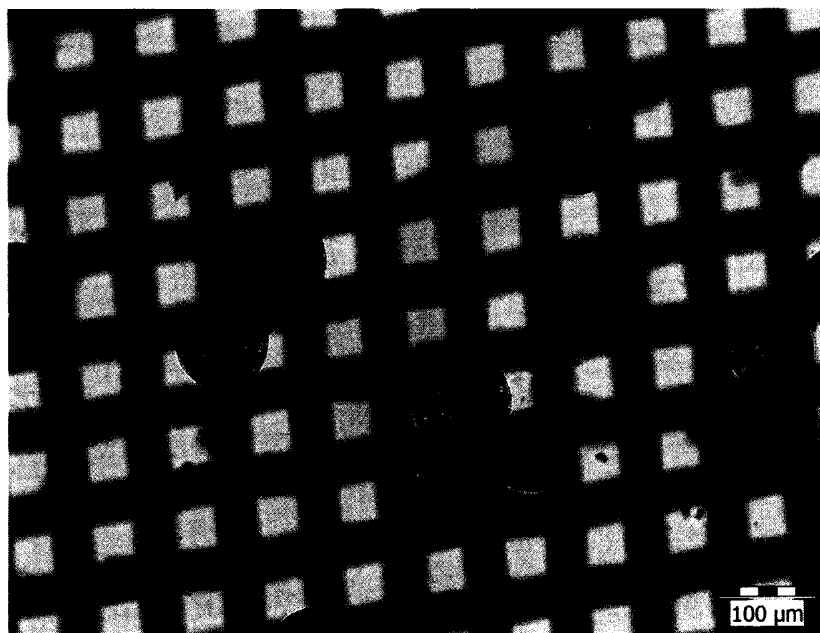
OBR. 2

3/5

PV 885-2013

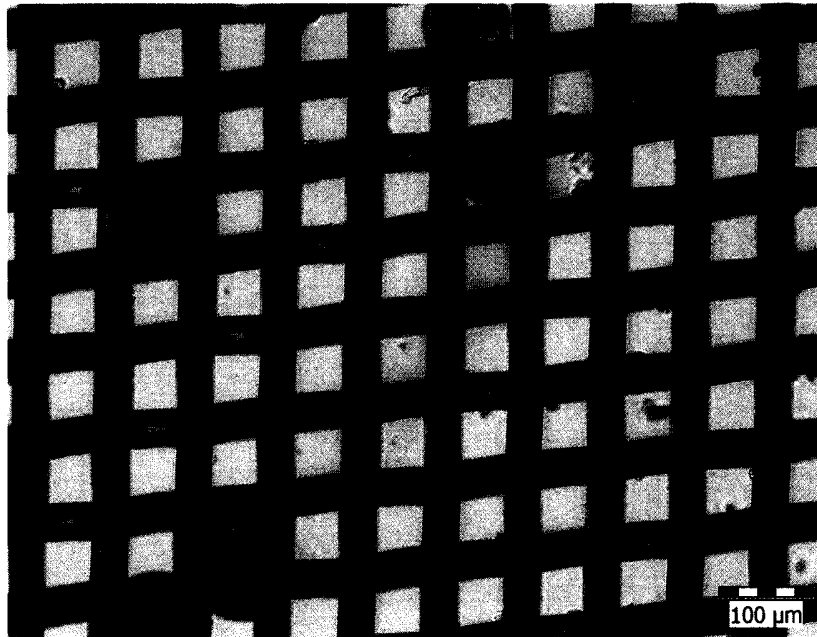


**OBR. 3**

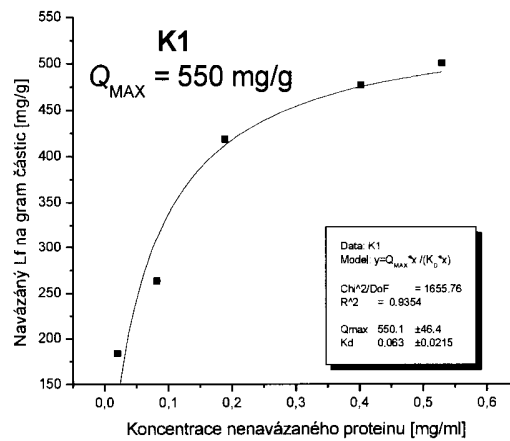


**OBR. 4**

01157



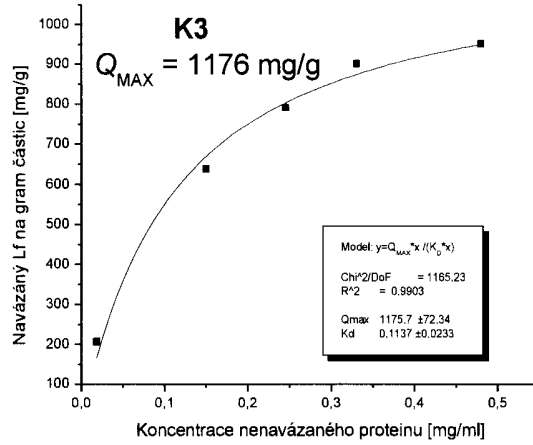
OBR. 5



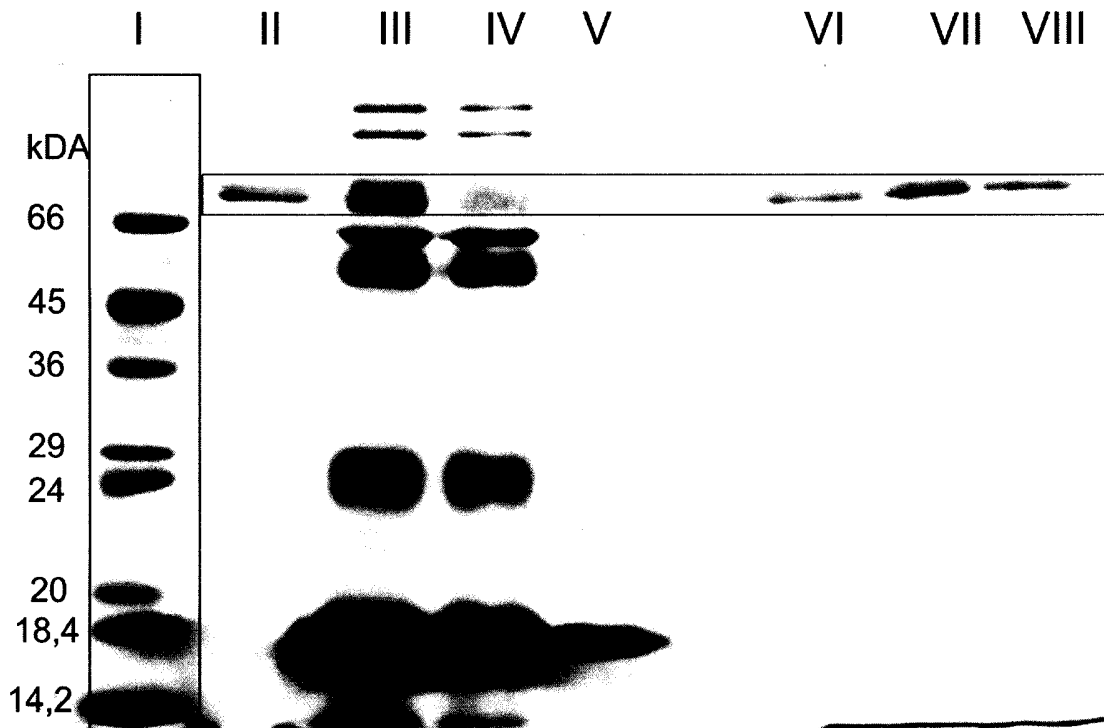
OBR. 6

5/5

PV 885-2013



OBR. 7



OBR. 8

0114