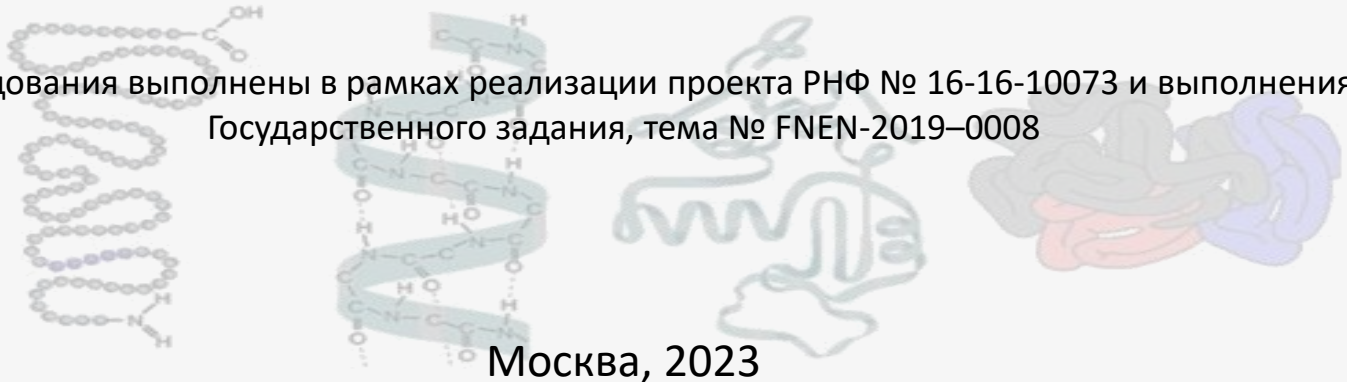


БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТКАНЕЙ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Котенкова Е.А., к.т.н.

Экспериментальная клиника-лаборатории биологически активных веществ
животного происхождения, ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова»
РАН, г. Москва

Исследования выполнены в рамках реализации проекта РНФ № 16-16-10073 и выполнения
Государственного задания, тема № FNEN-2019-0008



Москва, 2023

Факторы, влияющие на эффективность извлечения животных белков

- Степень гомогенизации
- Температура
- pI целевого белка
- Белковая агрегация
- Прочее



А еще разделение или очистка.....

- Тип фильтрации
- Материал мембраны
- Разбавление
- Диафильтрация
- Антиагрегирующие агенты

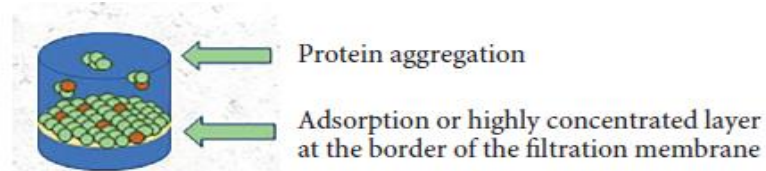


Figure 1. The main challenges during protein ultrafiltration

Существующие биотехнологические приемы

- Изменение pH
- Космотропные соли
- Хаотропы и хаотропные соли
- Неионные детергенты
- Сахара и многоатомные спирты

M. Lebendiker, T. Danieli/FEBS Letters 588 (2014) 236–246

243

Table 3
Additives Used to Stabilize Folding and to Prevent Aggregation Summary table of different publications [50,61–63,69,78–81] and from commercial websites (DILYX Biotechnologies OptiSol protein solubility screening kit application manual, HAMPTON: Solubility and stability screen).

Additive	Recommended initial concentration	Recommended concentration range
<i>Sugars and osmolytes</i>		
Glycerol	10%	0–40%
TMAO (trimethylamine N-oxide)	0.5 M	0–1 M
Glucose	0.5 M	0–2 M
Sucrose	0.5 M	0–1 M
Trehalose	0.5 M	0–1 M
Ethylene glycol	10%	0–60%
D-Sorbitol	0.5 M	0.2–1 M
Mannitol	2%	
Xylitol	0.5 M	0.2–1 M
Glycine betaine	1 M	
<i>Amino acids and amino acid derivatives</i>		
Glycine	250 mM	0.5–2 M
Arginine L-HCl	125 mM	0–2 M
Arginine ethylester	250 mM	0–500 mM
Proline	250 mM	0–1 M
Potassium glutamate	250 mM	0–500 mM
Arginine L-HCl + L-glutamic acid (L-Glu)	50 mM each	

224

S.E. Bondos, A. Bicknell / Analytical Biochemistry 316 (2003) 223–231

Table 1
Agents that may promote protein solubility

	Additive	Recommended concentration range
Kosmotropes	MgSO ₄	0–0.4 M
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0–0.3 M
	Na ₂ SO ₄	0–0.2 M
	Cs ₂ SO ₄	0–0.2 M
Weak kosmotropes	NaCl	0–1 M
	KCl	0–1 M
Chaotropes	CaCl ₂	0–0.2 M
	MgCl ₂	0–0.2 M
	LiCl	0–0.8 M
	RbCl	0–0.8 M
	NaSCN	0–0.2 M
	NaI	0–0.4 M
	NaClO ₄	0–0.4 M
	NaBr	0–0.4 M
	Urea	0–1.5 M
	Glycine	0.5–2%
	L-arginine	0–5 M
	Sucrose	0–1 M
	Glucose	0–2 M
Lactose	0.1–0.5 M	
Ethylene glycol	0–60% v/v	
Xylitol	0–30% w/v	
Mannitol	0–15% w/v	
Inositol	0–10% w/v	
Sorbitol	0–40% w/v	
Glycerol	5–40% v/v	

Table 1. Amino acids used to stabilize proteins and to prevent aggregation [27,28]

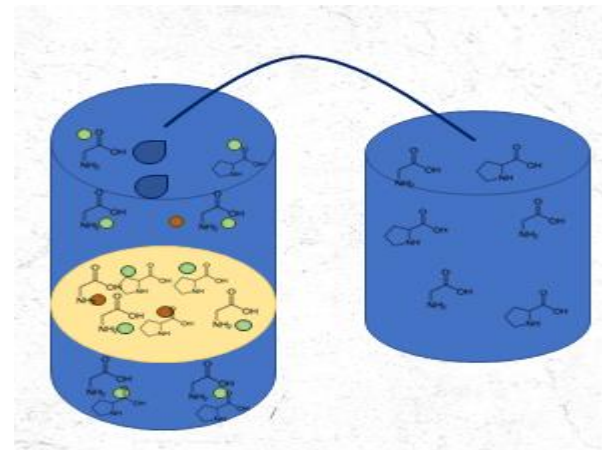
Amino acid and derivatives thereof	Recommended initial concentration	Recommended concentration range
Glycine	250 mM	0.5–2 M/0.5–2%
Arginine L-HCl	125 mM	0–2 M
Arginine ethylester	250 mM	0–500 mM
Proline	250 mM	0–1 M
Potassium glutamate	250 mM	0–500 mM
Arginine L	50 mM	0–5M

Извлечение белков из сердец и аорт свиней методом комплексной диафильтрации

Методология

Извлечение белков

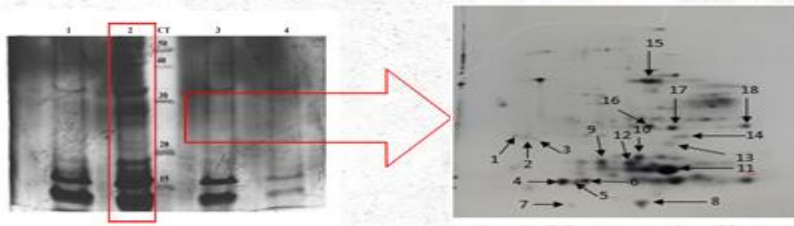
- Экстракция (0.9% NaCl, гомогенат сердец и аорт свиней = 4 : 1)
- Центрифугирование (3500 rpm, 8 min)
- Разбавление (концентрация белка менее 2 g/L) и диафильтрация (1 – 0,1M Pro, 0,5% Gly, 2 – 0,1M Pro, 1,0% Gly, 3 – 0,3M Pro, 0,5% Gly, 4 – 0,3M Pro, 1,0% Gly)
- Лиофилизация (3,5Pa, минус 40°C)
- Диализ (3.5kDa, 10 подходов) и лиофилизация



Протеомные исследования

- 1D электрофорез по Laemmli
- 2D электрофорез по O'Farrell

Результаты



Nr	Protein (gene)	S / M/ C *	Mw/pl (exp.)**	Mw/pl (calc.)**
3	Peroxiredoxin-2 (PRDX2)+ Deamidated (16Q)+ Acetyl (Protein N-term)	118/10/39	21,5/3,10	21,8/3,23
4	Mixture of fatty acid-binding protein, heart (FABP3)+ Acetyl (Protein N-term) and SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein isoform X1 (SH3BGR1)***[1]	111/21/73 113/4/46	14,5/5,40	14,7/5,11 14,1/8,43
5	Mixture of fatty acid-binding protein, adipocyte (FABP4)+ Acetyl (Protein N-term) and hemoglobin subunit beta (HBB)***[1]	191/23/83 73/3/23	14,5/5,6	14,7/5,29 16,2/7,10
6	Fatty acid-binding protein, heart (FABP3)+ Acetyl (Protein N-term)	128/19/68	14,5/5,70	14,7/5,11
9	Transgelin (TAGLN)	200/28/67	17,3/6,00	22,6/8,87
12	Transgelin (TAGLN)	225/32/70	17,0/6,30	22,6/8,87

Извлечение белков из поджелудочной железы свиней

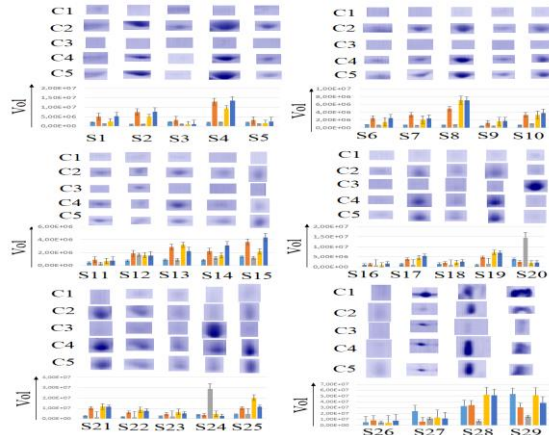
Методология

Извлечение белков

- Экстракция
 - 1) 0,9% NaCl
 - 2) 0,9% NaCl, 1M L-Arg
 - 3) 0,9% NaCl, 0,5 M trehalose
 - 4) 0,9% NaCl, 1% Gly, 0,1M Pro
- Центрифугирование (3500 rpm, 8 min)

Протеомные исследования

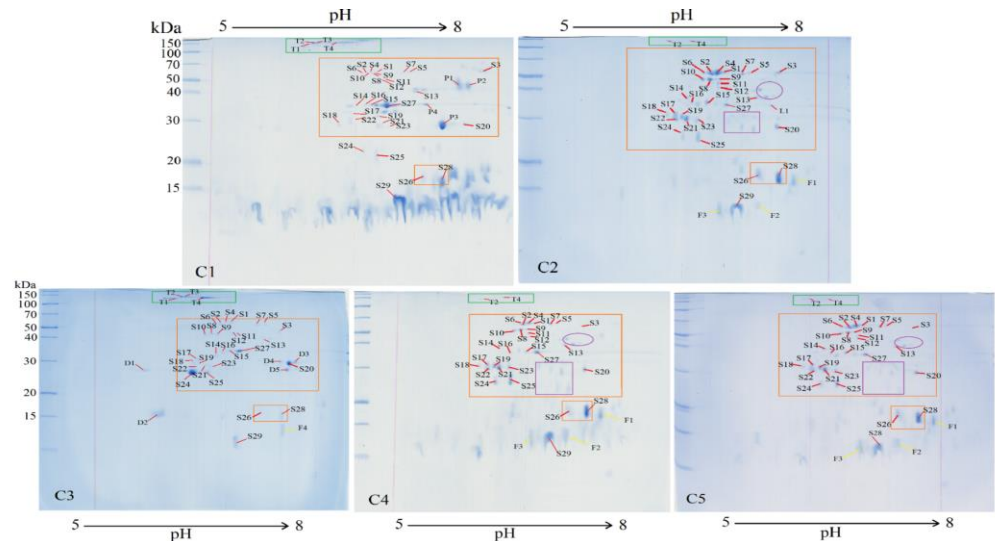
- 1D электрофорез по Laemmli
- 2D электрофорез по O'Farrell



Результаты определения концентрации общего белка в экстрактах

Экстрагент	0,9% NaCl	0,9% NaCl, 1 M L-Arg	0,9% NaCl, 0,5 M trehalose	0,9% NaCl, 1% Gly, 0,1 M L-Pro
Концентрация белка, г/л	24,84 ± 1,08	33,36 ± 0,64*	29,47 ± 1,58*	28,22 ± 1,36*

* – статистически значимое отличие от экстракции 0,9% NaCl (p < 0,1)



C1 – поджелудочная железа; C2 – 0,9% NaCl; C3 – 0,9% NaCl, 1 M L-Arg; C4 – 0,9% NaCl, 0,5 M trehalose; C5 – 0,9% NaCl, 1% Gly, 0,1 M L-Pro. Белковые фракции, относительное изменение объема которых достоверно различалось, обозначены красными стрелками.

Выводы

- Добавление 0,1M Pro, 1,0% Gly как в разбавленный экстракт, так и в питающий раствор при диафильтрации наиболее эффективно предотвращает агрегацию белков при получении белковой фракции с Мм менее 50 кДа из сердец и аорт свиней
- Раствор 0,9% натрия хлорида достаточно эффективно способен извлекать широкий спектр белковых веществ из ткани поджелудочной железы.
- Добавление антиагрегирующих агентов характеризовалось селективностью к определенным группам белков.
- Несмотря на то, что аргинин продемонстрировал наилучшие результаты в предотвращении образования агрегатов в ряде научных работ, наибольшее содержание общего белка в экстракте с добавлением 1 М L-аргинина обуславливалось увеличением содержания трех мажорных белковых фракций, а не разнообразием белкового состава.
- Добавление 0,5 М трегалозы к раствору 0,9% натрия хлорида или смеси 1% глицина и 0,1 М L-пролина приводило к увеличению содержания ряда белковых фракций, в том числе и с рI, смещенной в щелочную область.

Web of Science[™] Поиск

Optimized small tissue specific protein isolation trough complexed diafiltration technique

Автор: Elena, K (Elena, Kotenkova); Chernukha, IM (Chernukha, Irika M.); Kovalyov, LI (Kovalyov, Leonid I.)

Показать номер Web of Science ResearcherID и ORCID (предоставлено Clarivate)

JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

Том: 99. Страница: 387-387. Приложение: 3. Аннотация в встрече: PSVI-26

Опубликовано: NOV 2021

Дата индексации: 2021-12-31

Тип документа: Meeting Abstract

Ключевые слова

Ключевые слова автора: diafiltration; dialysis; tissue specific proteins; proteomics

Адрес:

- 1 RAS, VM Gorbatov Fed Res Ctr Food Syst, Moscow, Russia
- 2 Russian Acad Sci, Fed Res Ctr Fundamentals Biotechnol, Fed State Inst, Moscow, Russia

Категории/классификация

Области исследования: Agriculture

THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING, 2022, vol. 7, no. 2

DOI: <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-10-76-82>

Available online at <https://www.meatjournal.ru/jour>

Review article

Open Access

Received 21.04.2022

Accepted for review 11.06.2022

Accepted for publication 20.08.2022

TECHNOLOGICAL APPROACHES TO THE EXTRACTION AND PURIFICATION BY ULTRAFILTRATION TECHNIQUES OF TARGET PROTEIN MOLECULES FROM ANIMAL TISSUES: A REVIEW

Elena A. Kotenkova¹, Ekaterina K. Polishchuk²
V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

Keywords: protein stability and solubility, kosmotrope, chaotrope, amino acid, sugar, polyhydric alcohol, detergent, osmolyte

Abstract

Effective isolation and purification of protein is a great challenge nowadays. The key aspect is protein stability and solubility, which primarily depend on protein structure and its amino acid sequence. Manipulations with pH and ionic strength are the first attempts to increase protein stability and solubility. Different additives that are allowed or prohibited in the food industry are applied for overcoming protein aggregation. Sugars, polyhydric alcohols and amino acids are the most attractive among them. Trehalose, glycerol, arginine, glycine and proline demonstrated outstanding properties that make them perspective for application during isolation and purification of proteins singly or in combination with each other or other compounds. However, the algorithm of effective isolation and purification of proteins could be significantly varied depending on its structure.

For citation: Kotenkova, E.A., Polishchuk, E.K. (2022). Technological approaches to the extraction and purification by ultrafiltration techniques of target protein molecules from animal tissues: a review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 7(12), 76-82. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-10-76-82>

Funding:

The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019-0008 of the state assignment of the V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS.

THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING, 2022, vol. 7, no. 2

DOI: <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-4-258-264>

Available online at <https://www.meatjournal.ru/jour>

Review article

Open Access

Received 21.04.2022

Accepted for review 09.11.2022

Accepted for publication 28.12.2022

BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES FOR INTENSIFICATION OF PROTEIN EXTRACTION FROM THE PORCINE PANCREAS

Elena A. Kotenkova¹, Anastasiya G. Akhromskaya, Ekaterina E. Polishchuk, Marina A. Aryuzina, Maria E. Spirina
V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

Keywords: aggregation, anti-aggregation agent, extraction, protein, 2 DE, trehalose, arginine, glycine, proline

Abstract

Processing of secondary products after slaughter of farm animals is in demand. The pancreas is a rich source of bioactive protein substances, effective extraction of which is a serious problem today due to their aggregation. The aim of the work was to assess the extractability of protein substances of the porcine pancreas using sodium chloride, trehalose, arginine, and combination of glycine and proline. The protein concentration was determined by the biuret reaction and their protein composition was assessed by densitometry of two-dimensional electropherograms using software ImageMaster[™] 2D Platinum powered by Melanie 8.0. The results showed a positive effect of anti-aggregation agents on the release of protein substances into a solution. The highest protein concentration (33.86±0.6%) was observed when adding 1M L-arginine; however, it was conditioned mainly by an increase in the content of three major protein fractions rather than by diversity of the protein composition. In general, the use of 0.9% NaCl as an extractive agent was quite effective, but selectivity to certain protein groups was observed for anti-aggregation agents such as sodium chloride, trehalose, arginine, glycine and proline, as well as their combination. The obtained results are important for intensification of protein substances including target ones with the subsequent application in different fields.

For citation: Kotenkova E. A., Akhromskaya, A. G., Polishchuk, E. K., Aryuzina M. A., Spirina M. E. (2022). Biotechnological techniques for intensification of protein extraction from the porcine pancreas. *Theory and Practice of Meat Processing*, 7(4), 258-264. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-4-258-264>

Funding:

The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019-0008 of the state assignment of the V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS.

Благодарю за внимание!



**Российский
научный фонд**

Экспериментальная клиника-лаборатория
биологически активных веществ
животного происхождения

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.
Горбатова» РАН, г. Москва

E-mail: lazovlana92@yandex.ru