



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2519–268X print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8501
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 637.127.576

Dextran gels for the exclusive chromatography of milk serum proteins

V.G. Yukalo, K.Ye. Datsyshyn

Ternopil Ivan Pul'uj National Technical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 10.01.2018
Received in revised form
19.02.2018
Accepted 21.02.2018

Ternopil Ivan Pul'uj National
Technical University, Ruska St., 56,
Ternopil, 46001, Ukraine
Tel.: +38-097-788-46-96
E-mail: katkostyuk3103@gmail.com;
biotech@tu.edu.te.ua

Yukalo, V.G., & Datsyshyn, K.Ye. (2018). Dextran gels for the exclusive chromatography of milk serum proteins. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(85), 3–8. doi: 10.15421/nvlvet8501

The ability of serum proteins to form biologically active peptides as a result of proteolysis in the gastrointestinal tract stimulated the research of the ways of their selection. Homogeneous serum proteins (β -lactoglobulin, α -lactalbumin, lactoferrin, serum albumin, immunoglobulins) are necessary for isolating, researching and using biologically active peptides. Today, there are many industrial techniques and laboratory methods that allow obtaining the individual purified serum proteins. They include ultrafiltration or diafiltration, demineralization by electro dialysis, thermal denaturation, differential heating, preparative electrophoresis on paper, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, and others. The main disadvantages of these methods are many stages, duration of procedure as well as the use of extreme factors, which can lead to the structure damage and changes in the composition of protein molecules. In view of above, an exclusive chromatography on dextran gels may be promising. This method has several advantages: accessibility, the ability to perform fractionation in different conditions (temperature, ionic composition, pH), simultaneous purification from low molecular compounds of milk serum, minimal damage to protein molecules. It is important to choose the correct gel and to separate the chromatographic peaks into sectors for analyzing the protein composition in order to improve the resolution of the method. The purpose of the work was to select a dextran gel for fractionating milk serum proteins with exclusive chromatography. Taking into account the range of molecular masses of serum proteins, the following dextran gels were chosen: G-75, G-100 and G-150. The studies were carried out in columns of chromatography set for liquid chromatography of «Reanal» company. The fractional composition and homogeneity of the serum proteins were determined by disc-electrophoresis in the native conditions for neutral and acidic proteins in the plates of the polyacrylamide gel. The proteins composition in selected chromatographic fractions was analyzed by disc-electrophoresis in a polyacrylamide gel. The obtained results indicate the expediency of using exclusive chromatography on dextran gels to isolate homogeneous serum protein in native conditions. The most promising for the first stage of immunoglobulins, β -lacto-globulin, α -lactalbumin and proteose-peptone fraction obtaining appeared the sephadexes G-100 and G-150 by the electrophoresis results.

Key words: milk whey proteins, protein fractions, exclusive chromatography.

Декстранові гелі для ексклюзивної хроматографії протеїнів сироватки молока

В.Г. Юкало, К.Є. Дацишин

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, м. Тернопіль, Україна

Здатність протеїнів сироватки молока утворювати біологічно активні пептиди в результаті протеолізу в шлунково-кишковому тракті стимулювала дослідження шляхів їх виділення. Гомогенні протеїни сироватки (β -лактоглобулін, α -лактальбумін, лактоферин, альбумін сироватки крові, імуноглобуліни) необхідні для виділення, дослідження і застосування біологічно активних пептидів. Відомі методи фракціонування протеїнів сироватки часто є складними, багатостадійними або призводять до денатурації протеїнів. У зв'язку з цим, перспективною може бути ексклюзивна хроматографія на декстранових гелях. Цей метод має ряд переваг: доступність, можливість проводити фракціонування в різних умовах (температура, іонний склад, pH), мінімальне пошкодження молекул протеїнів. Метою роботи було проведення вибору декстранового гелю для фракціонування протеїнів сироватки молока ексклюзивною хроматографією. Враховуючи діапазон молекулярних мас протеїнів сироватки, було вибрано наступні декстранові гелі: G-75, G-100, G-150. Дослідження проводили на колонках з хроматографічного набору для

рідинної хроматографії фірми «Reanal». Склад протеїнів у відібраних хроматографічних фракціях аналізували диск-електрофорезом в поліакриламідному гелі. Отримані результати свідчать про доцільність використання ексклюзивної хроматографії на декстранових гелях для виділення гомогенних протеїнів сироватки молока в нативних умовах. Найбільш перспективними для першої стадії отримання імуноглобулінів, β -лактоглобуліну, α -лактальбуміну і протеозо-пептонної фракції за даними електрофорезу виявились сефадекси G-100 і G-150.

Ключові слова: протеїни сироватки молока, протеїнові фракції, ексклюзивна хроматографія.

Вступ

Фракційний склад протеїнів сироватки молока вивчається з початку минулого століття. Вже у 70-х роках були отримані кристали основних протеїнів сироватки молока (Fox et al., 2015; Yukalo and Datsyshyn, 2017). На сьогоднішній день розроблено декілька підходів для примислового виділення загального протеїну сироватки. До найбільш поширених відносяться: ультрафільтрація або діалізація, демінералізація електродіалізом, іонообмінна хроматографія і термальна денатурація. Також у препаративних кількостях можна отримати протеїни сироватки молока висолуванням та ексклюзивною хроматографією або гель-фільтрацією (McSweeney and Fox, 2013). Відкриття додаткової функції протеїнів сироватки молока, а саме здатності утворювати біологічно активні пептиди у процесі протеолізу в шлунково-кишковому тракті стимулювало пошук методів отримання окремих протеїнових фракцій (Iukalo et al., 2013). На сьогоднішній день відомо багато лабораторних методик, які дозволяють виділити окремі очищені протеїни. Це диференційне висолування (з використанням $MgSO_4$ або $(NH_4)_2SO_4$), препаративний електрофорез на папері, іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі та ін. (Konrad, 2008; Lozano, 2008). Недоліками цих методів є багатостадійність, довготривалість та використання екстремальних факторів, що можуть призвести до пошкодження структури і зміни складу молекул протеїнів.

У зв'язку з цим, перспективною може бути ексклюзивна хроматографія на декстранових гелях. Препаративний варіант цього виду хроматографії вже успішно використовувався для отримання загального протеїну сироватки молока (McSweeney and Fox, 2013). До переваг ексклюзивної хроматографії можна віднести її доступність, можливість проведення фракціонування в різних умовах (температура, рН, склад іонів), одночасну очистку від низькомолекулярних сполук сироватки молока, мінімальні пошкодження молекул протеїнів у процесі фракціонування. До недоліків відноситься менша роздільна здатність у порівнянні з іншими видами хроматографії. Для підвищення роздільної здатності методу важливим є правильний вибір гелю, а також розділення хроматографічних піків на сектори для аналізу протеїнового складу.

Метою роботи було вибір декстранового гелю для фракціонування протеїнів сироватки молока ексклюзивною хроматографією.

Матеріал і методи досліджень

Сироватку отримували зі свіжого молока кислотністю 17–19 °Т. Молоко знежирювали центрифугуванням (5000 об/хв протягом 15 хв). Протеїни

казеїнового комплексу відділяли центрифугуванням після ізоелектричного осадження при рН 4,6. Протеїни сироватки молока очищали від низькомолекулярних сполук і переводили в середовище необхідного буферу гель-фільтрацією на колонці з сефадексом G-25 («Pharmacia»).

Концентрацію протеїнів визначали спектрофотометрично ($\lambda = 280$ нм). Для розрахунку концентрації використовували наступні коефіцієнти поглинання ($D_{1\text{см}}^{1\%}$): 19,6 – для β -лактоглобуліну (β -BG); 20,1 – α -лактальбуміну (α -LA) і 12,3 – для загального протеїну сироватки молока (Farrell et al., 2004).

Ексклюзивну хроматографію протеїнів сироватки молока проводили на декстранових гелях фірми «Pharmacia» в колонках з набору для рідинної хроматографії фірми «Reanal». В хроматографічних і електрофоретичних дослідженнях, а також для приготування буферів використовували реактиви фірми «Pharmacia», «Reanal», «Sigma» та вітчизняні реактиви високого ступеня очистки.

Фракційний склад і гомогенність протеїнів сироватки молока визначали диск-електрофорезом в нативних умовах для нейтральних і кислих протеїнів в пластинках поліакриламідного гелю (ПАГ) (Yukalo et al., 2009). Гелі фіксували і фарбували загальноприйнятими методами. Кількісну обробку електрофоретичних зображень imread (Yukalo et al., 2007).

Результати та їх обговорення

При виборі декстранового гелю враховували молекулярні маси протеїнів, а також особливості їх просторової структури і фізико-хімічних властивостей. Серед протеїнів сироватки молока до попередників біоактивних пептидів відносяться β -лактоглобулін ($M = 18363$ Да); α -лактальбумін ($M = 14178$ Да); альбумін сироватки крові ($M = 66399$ Да); лактоферин ($M = 76110$) і за даними окремих авторів імуноглобуліни (M від 150000 до 500000 Да) (Farrell et al., 2004; Iukalo et al., 2013). Всі вказані фракції відносяться до глобулярних протеїнів, розчинні при фізіологічних значеннях температури і рН. Важливою властивістю β -лактоглобуліну є його здатність утворювати в певних умовах димери та октамери (Fox et al., 2015). Необхідно відзначити, що велику кількість природних біоактивних пептидів містить низькомолекулярна протеозо-пептонна фракція. Тому її виділення теж бажано передбачити під час ексклюзивної хроматографії протеїнів сироватки молока.

Гель, який міг би забезпечити фракціонування молекул протеїнів з таким діапазоном молекулярних мас відсутній (Osterman, 1985). Проте, якщо поставити за мету виділення, окрім гомогенних фракцій, ще двох

груп протеїнів (імуноглобуліни) і пептидів (протеозо-пептонна фракція) – то можна вибирати з трьох видів гелю. Це сефадекс G-75 (діапазон фракціонування 3000–70000 Да), сефадекс G-100 (4000-150000 Да) і сефадекс G-150 (5000-300000 Да). При цьому у всіх випадках можна сподіватись на виділення фракцій β -LG, α -LA, BSA і LF. Група імуноглобулінів може вийти з об'ємом елюенту близьким до вільного об'єму колонки, а група пептидів ППФ вийде з об'ємом близьким до повного об'єму колонки.

Результати ексклюзивної хроматографії сироватки молока на сефадексі G-75 показані на рис. 1.1. На хроматограмі видно лише два піки. Перший асиметричний пік перед аналізом протеїнового складу ми розділили на три сектори (I, II, III). Об'єднані фракції кожного сектора, а також другого хроматографічного піку (сектор IV) аналізували диск-електрофорезом на пластинках ПАГ. Результати електрофорезу показані на електрофореграмі (рис. 1.2.). Контрольний взірець

сироватки містить основні протеїни відповідно до діючої класифікації (Farrell et al., 2004). У всіх відібраних секторах (окрім сектору IV) видно суміш протеїнів. У секторі I і II представлені всі основні протеїни сироватки, а секторі III – суміш низькомолекулярних імуноглобулінів та фракцій β -LG і α -LA. Всі низькомолекулярні компоненти протеозо-пептонної фракції розміщені в другому хроматографічному піку (сектор IV). Загалом отримані результати свідчать про низьку ефективність сефадексу G-75 при фракціонуванні протеїнів сироватки молока.

На рис. 2 і 3 представлені результати ексклюзивної хроматографії сироватки молока на сефадексах G-100 і G-150 відповідно. Отримані подібні хроматографічні профілі, які складаються з трьох піків. Другий пік в обох випадках асиметричний і тому ми його розділили при відборі зразків для електрофоретичного аналізу на два сектори (II і III).

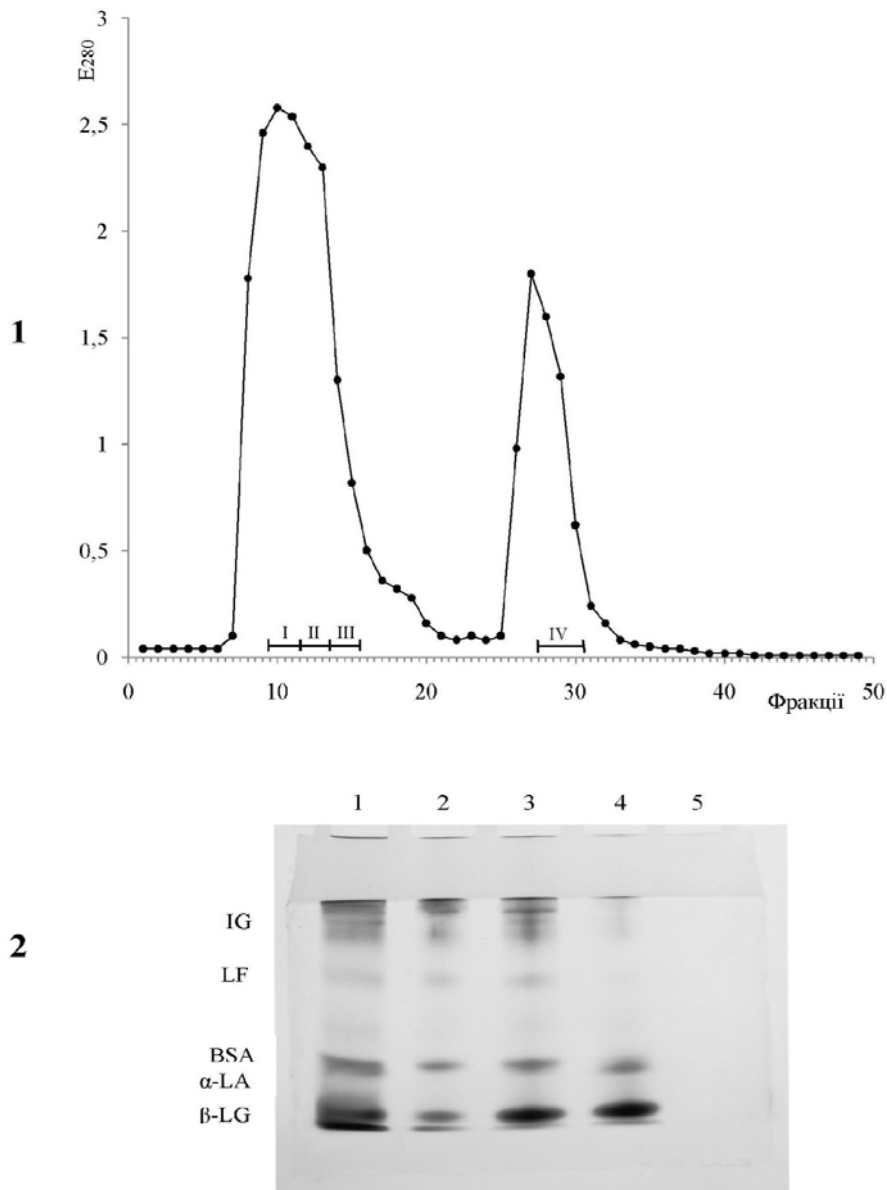


Рис. 1. Хроматограма (1) протеїнів сироватки молока отримана ексклюзивною хроматографією на сефадексі G-75. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки (2.1) та її окремих фракцій сектору I (2.2), сектору III (2.4) та сектору IV (2.5)

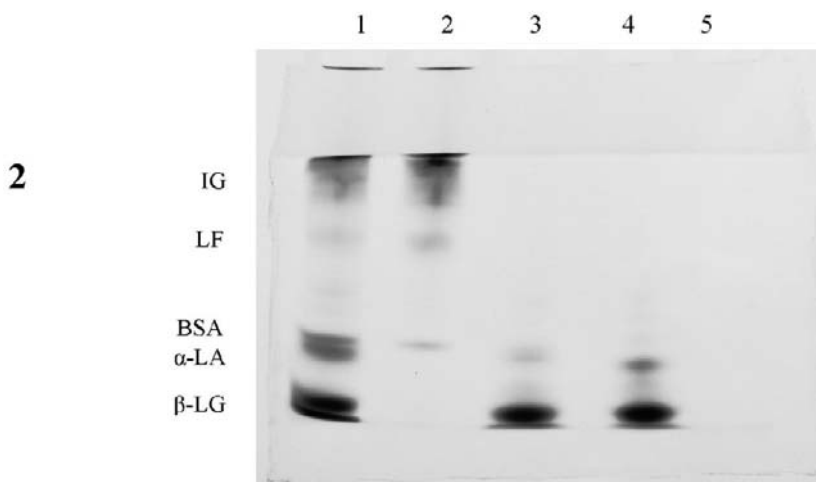
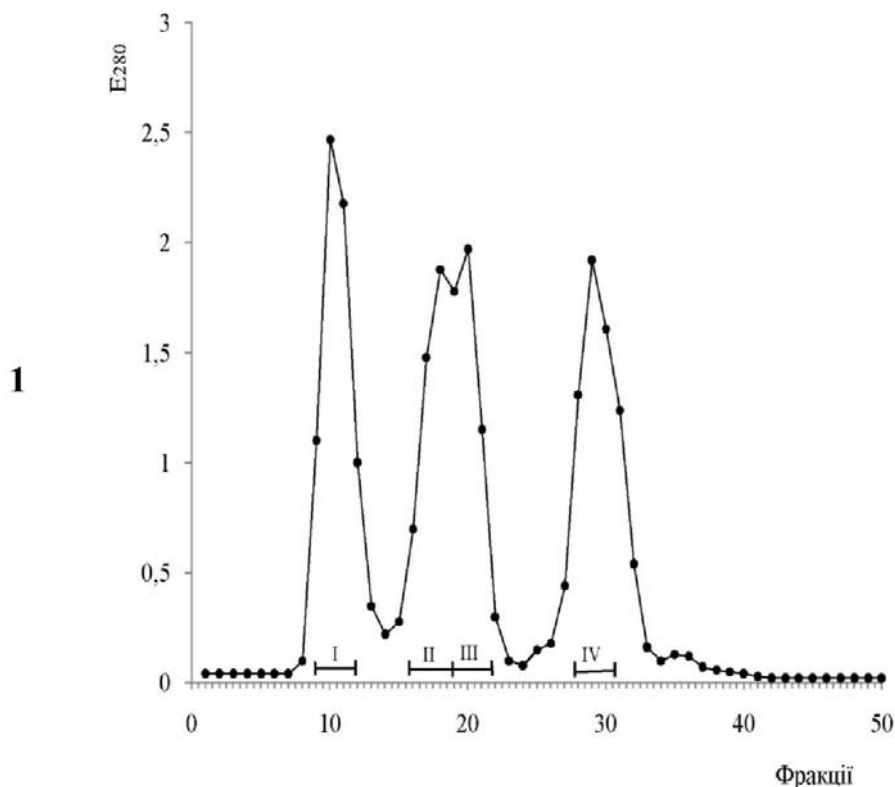


Рис. 2. Хроматограма (1) протеїнів сироватки молока отримана ексклюзивною хроматографією на сефадексі G-100. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки (2.1.) та об'єднаних фракцій сектору I (2.2); сектору II (2.3); сектору III (2.4) та сектору IV (2.5)

Відібрані об'єднані фракції кожного сектору діалізували проти електрофоретичного буферу і аналізували диск-електрофорезом в ПАГ. До складу першого хроматографічного піку входять високомолекулярні протеїни-імуноглобуліни, лактоферин і альбумін сироватки. Сектори другого хроматографічного піку містять у різних співвідношеннях β -LG і α -LA. У четвертому секторі (третій хроматографічний пік) розміщені низькомолекулярні компоненти протеозо-пептонної фракції. Вони не фіксуються у ПАГ і електрофоретична доріжка 5 на електрофореграмах

(рис. 2.2 і рис. 3.2) не заповнена. В результаті фракціонування протеїнів сироватки молока на сефадексах G-100 і G-150 не отримано ні однієї гомогенної фракції, але суміші перших трьох секторів є перспективними для виділення індивідуальних протеїнів. Так, з першого сектора не складно відділити імуноглобуліни, а вміст другого і третього секторів можна розділити на дві фракції β -LG і α -LA. Цього можна досягнути повторною ексклюзивною хроматографією з поділом хроматографічних піків на сектори.

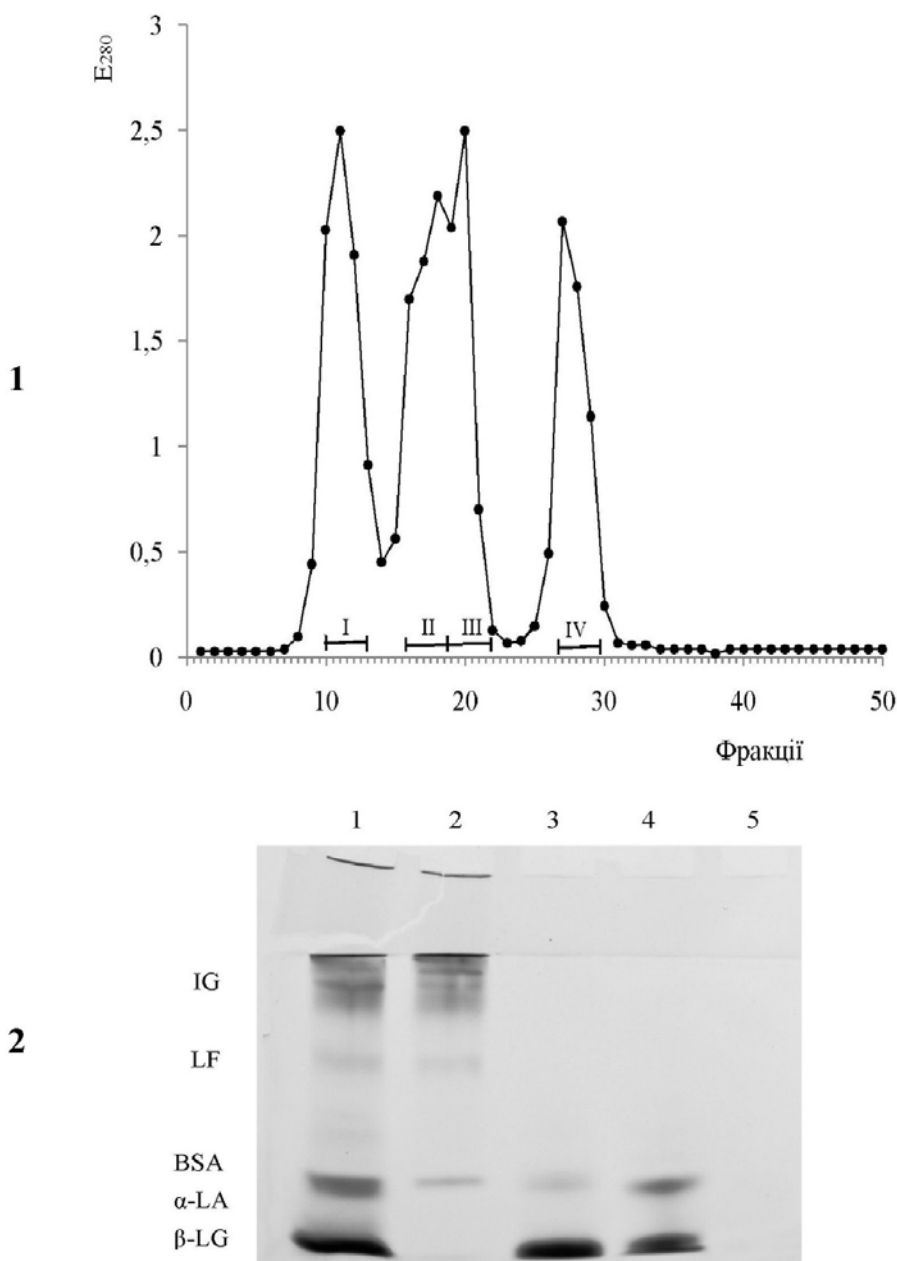


Рис. 3. Хроматограма (1) протеїнів сироватки молока отримана ексклюзивною хроматографією на сефадексі G-150. Електрофореграма (2) загального протеїну сироватки молока (2.1.) та об'єднаних фракцій сектору I (2.2); сектору II (2.3); сектору III (2.4) та сектору IV (2.5).

Висновки

Отримані результати свідчать про доцільність використання ексклюзивної хроматографії на декстранових гелях для виділення гомогенних протеїнів сироватки молока в нативних умовах. Найбільш перспективними для отримання імуноглобулінів, β -лактоглобуліну, α -лактальбуміну і протеозопептонної фракції за даними електрофоретичного аналізу виявились сефадекси G-100 і G-150.

References

- Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P., & O'Mahony, J. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2
- McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (2013). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th Edition. doi: 10.1007/978-1-4614-4714-6
- Iukalo, A.V., Datsyshyn, K.Ye., & Yukalo, V.G. (2013). Bioaktyvni peptydy proteiniv syrovatky moloka koriv (*Bos taurus*). *Biotekhnolohiia Akta*. 6, 49–61 (in Ukrainian).
- Konrad, G. (2008). A new method for isolation of native α -lactalbumin from sweet whey. *International Dairy Journal*. 18(1), 47–54. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.06.004
- Lozano, J. (2008). An improved method for isolation of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*. 18(1), 55–63. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.05.003
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar,

- C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., & Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 87(6), 1641–1674. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6
- Yukalo, A., Yukalo, V., & Shynkaryk, M. (2009). Electrophoresis separation of the Milk Protein. *Proceedings of the International Conference on Bio and Food Electrotechnologies*, 227–231.
- Yukalo, V.G., Yavorsky, B.I., Storozh, L.A., & Solovodzinska, I.Y. (2007). Kilkisnyi elektroforetychnyi analiz bilkiv kazeinovoho kompleksu. *Biolohiia tvaryn*. 9(1–2), 295–298 (in Ukrainian).
- Yukalo, V.G., & Datsyshyn, K.Ye. (2017). Selection of conditions for preparative electrophoresis of milk whey proteins in native conditions. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 19(80), 13–17 doi: 10.15421/nvlvet8003
- Osterman, L.A. (1985). *Khromatografiya belkov i nukleinovykh kislot*. M.: Nauka (in Russian).