



Notat

Procesoptimeret udvinding af protein fra griselunger

Reduktion af farven af ekstraheret lungeprotein ved vask af væv

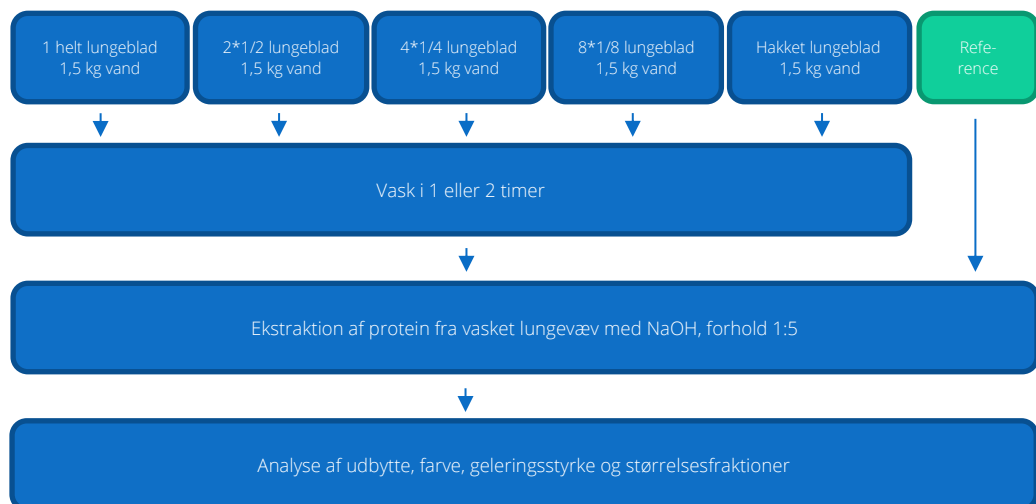
4. marts 2022
Proj.nr. 2009655
Version 1
LHHR/mt

Baggrund I projektet "Procesoptimeret udvinding af protein fra griselunger" skal det undersøges, hvorvidt det er muligt at reducere farven af det ekstraherede protein gennem en simpel skånsom proces.

Til det formål er det blevet foreslået, at vask af lungevævet før ekstraktion kan være med til at reducere farven af det ekstraherede protein. Gennem forsøg er det blevet undersøgt, hvor meget farven kan reduceres ved vask, og i hvor høj grad det påvirker funktionalitet og udbytte.

Formål Formålet med dette notat er at undersøge muligheden for at vaske lunger i vand, påsat en røremaskine, for derved at fjerne farven fra lungerne. Idéen blev bragt op til et porteføljemøde i proteingruppen.

Forsøgsdesign Forsøgsdesignet fremgår af figur 1:



Figur 1. Forsøgsdesign

Metoder

Vask Lungerne blev først delt i mindre stykker (undtagen 1-prøverne) og lagt i en skål indeholdende 1,5 liter vand. Skålen blev stillet i en røremaskine, og lungerne blev "vasket" i henholdsvis 1 og 2 timer. Som reference blev "Ekstraktion med NaOH" udført efterfølgende i laboratoriet.

Ekstraktion Alkalisk ekstraktion blev gennemført i forholdet 1:5. Baseret på tidligere ekstraktioner forventes pH 9,5 at opnås ved en 4% opløsning af 1,5% NaOH i vand, hvorfor dette forhold blev anvendt til forsøget.

100 g lungevæv blev afvejet i et bægerglas og tilsat 480 g vand og 20 g 1,5% NaOH.

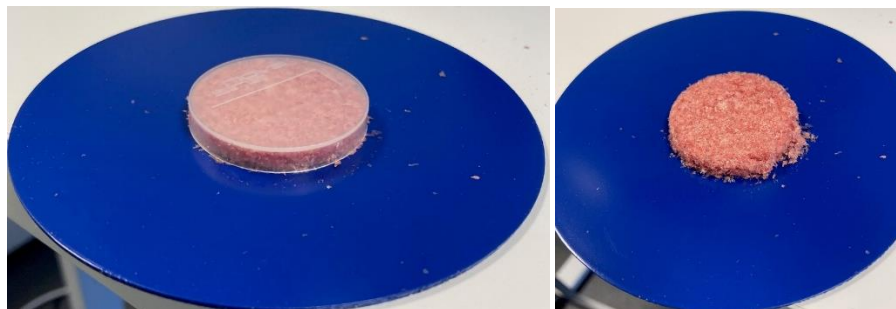
Bægerglas blev sat på magnetomrører i 60 min. Efter 5 min. blev pH målt og noteret. Opløsningen blev centrifugeret 1 time ved 4°C med 4500 rpm. Supernatant blev separeret fra bundfald og analyseret videre.

Kjeldahl Udbyttet af det ekstraherede protein blev beregnet på baggrund af proteinindholdet i råvare og ekstrakt. Proteinindholdet blev beregnet baseret på nitrogenindholdet, der blev bestemt ved Kjeldahlanalyse på Kjeltec 8420. Proteinindholdet blev beregnet ved 6,25*%N.

Frysetørring Udbyttet "Frysetørring" blev udført med Freeze Dryer Alpha 1-2L LD_{plus} (Christ Freeze Dryers) ved main drying i 13 t ved 0,200 mbar og final drying i 15 t ved 0,011 mbar og en hylde temperatur på 20°C.

Gelering Gelering blev bestemt reometrisk ved et rheometer forsynet med et Peltier cirkulationsmodul til at styre temperaturen blev rheologi undersøgt. På baggrund af dynamisk oscillering blev det viskoelastiske respons på retentatet målt. Shear modulus (G_0) blev målt med en pladegeometri på 40 mm i diameter. En pladeforskydning på 1% blev anvendt med en oscilleringsfrekvens på 1 Hz og et mellemrum mellem pladerne på 300 μ m. Analyserne blev foretaget fra 20 til 80°C ved en temperaturstigning på 2°C i minuttet. Geleringstemperaturen kunne herved bestemmes som knækket på kurven i forhold til dens baseline, og gelstyrken blev bestemt som toppunktet, når $G(0)$ over T-kurven blev plottet.

Farvemåling Der blev foretaget videometermålinger på frysetørrede og spraytørrede produkter. De frysetørrede/spraytørrede produkter blev presset i form i et låg til et a_w -bæger. Herefter blev den pressede prøve vendt ud på den blå plade, og billedet blev taget, jf. figur 2.



Figur 2. Tv: presset prøve i låg til a_w -bæger. Th: prøve uden låg til a_w -bæger, klar til måling.

Størrelseskarakterisering

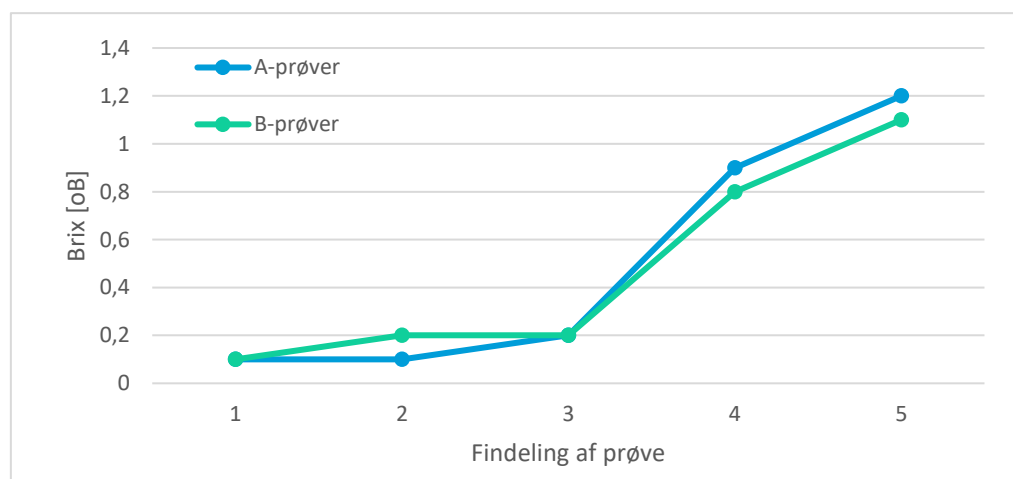
Størrelseskarakterisering blev gennemført ved size exclusion kromatografi på Bioinert 1260 HPLC fra Agilent. Analysen blev gennemført på en AdvanceBio SEC 130Å 2,7 µm (Agilent) med tilhørende forkolone, med en 50 mM fosfat buffer som mobilfase og et flow på 1 mL/min. Som standard blev anvendt AdvanceBio SEC 130Å Protein standard (Agilent). Detektion blev opnået ved 220 nm med en 1260 Infinity II DAD WR detektor (Agilent).

Andelen af de opnåede proteinfraktioner blev beregnet ved forholdet mellem fraktionens areal og kromatogramets totale areal.

Resultater

Vask

Figur 3 viser, at hakning af lunger i mindre stykker hæver mængden af protein afgivet til vaskevandet. Resultaterne viser, at der ikke er stor forskel mellem A- og B-prøverne. Det lader altså ikke til, at en øget vasketid har stor påvirkning på udskillelsen af protein. Findeling af lungevæv har derimod betydning for brix-værdien af vaskevandet. Særligt sker en stigning i brix fra findeling 3 (1/4 lungeblade) til findeling 4 (1/8 lungeblade) og ydermere til findeling 5 (hakkede lungeblade).



Figur 3. Brix af vaskevandet. A-prøver er vasket i 1 time og B-prøver i 2. Prøvenummer refererer til findeling af lunge ved vask, gående fra helt lungeblad (1) til hakkede lungeblad (5).

Ekstraktion

Af tabel 1 fremgår ekstraktionsudbytter, dels beregnet på baggrund af proteinindholdet i den vaskede råvare, dels på baggrund af referenceråvaren.

Ekstraktionsudbyttet i relation til den vaskede råvare har tendens til at falde ved øget findelingsgrad. Dette stemmer overens med, at der under vask fjernes en del af det protein, som ellers vil ekstraheres. Udregnes ekstraktionsudbytterne på baggrund af proteinindholdet i referenceråvaren, dvs. ikke vasket lungevæv, er udbyttet væsentlig lavere, og igen ses også her en tendens til et lavere udbytte ved øget findelingsgrad af vævet under vask.

Tabel 1. Ekstraktionsudbytte.

| | % protein i råvare | % protein i supernatant | % udbytte i relation til vasket råvare | % udbytte i forhold til referenceråvaren |
|------|--------------------|-------------------------|--|--|
| Ref. | 16,6 | 1,8 | 55 | 55 |
| 1A | 12,3 | 1,2 | 48,8 | 36,1 |
| 1B | 12,2 | 1,2 | 49,2 | 36,1 |
| 2A | 10,7 | 1 | 46,7 | 30,1 |
| 2B | 11,9 | 1,1 | 46,2 | 33,1 |
| 3A | 13,1 | 1,2 | 45,8 | 36,1 |
| 3B | 13,7 | 1,3 | 47,4 | 39,2 |
| 4A | 12,3 | 1 | 40,7 | 30,1 |
| 4B | 11,8 | 1 | 42,4 | 30,1 |
| 5A | 8,6 | 0,7 | 40,7 | 21,1 |
| 5B | 9,6 | 0,7 | 36,5 | 21,1 |

Funktionalitet Funktionaliteten blev vurderet baseret på geleringsstyrken for prøverne 1A, 1B, 3A, 3B, 5A og 5B samt reference. Grundet udstyrsproblemer blev ikke alle prøver analyseret. Geleringsstyrke og geleringstemperatur fremgår af tabel 2.

Tabel 2. Geleringsstyrke og geleringstemperatur for ekstraheret frysetørret lungeprotein (n=3)

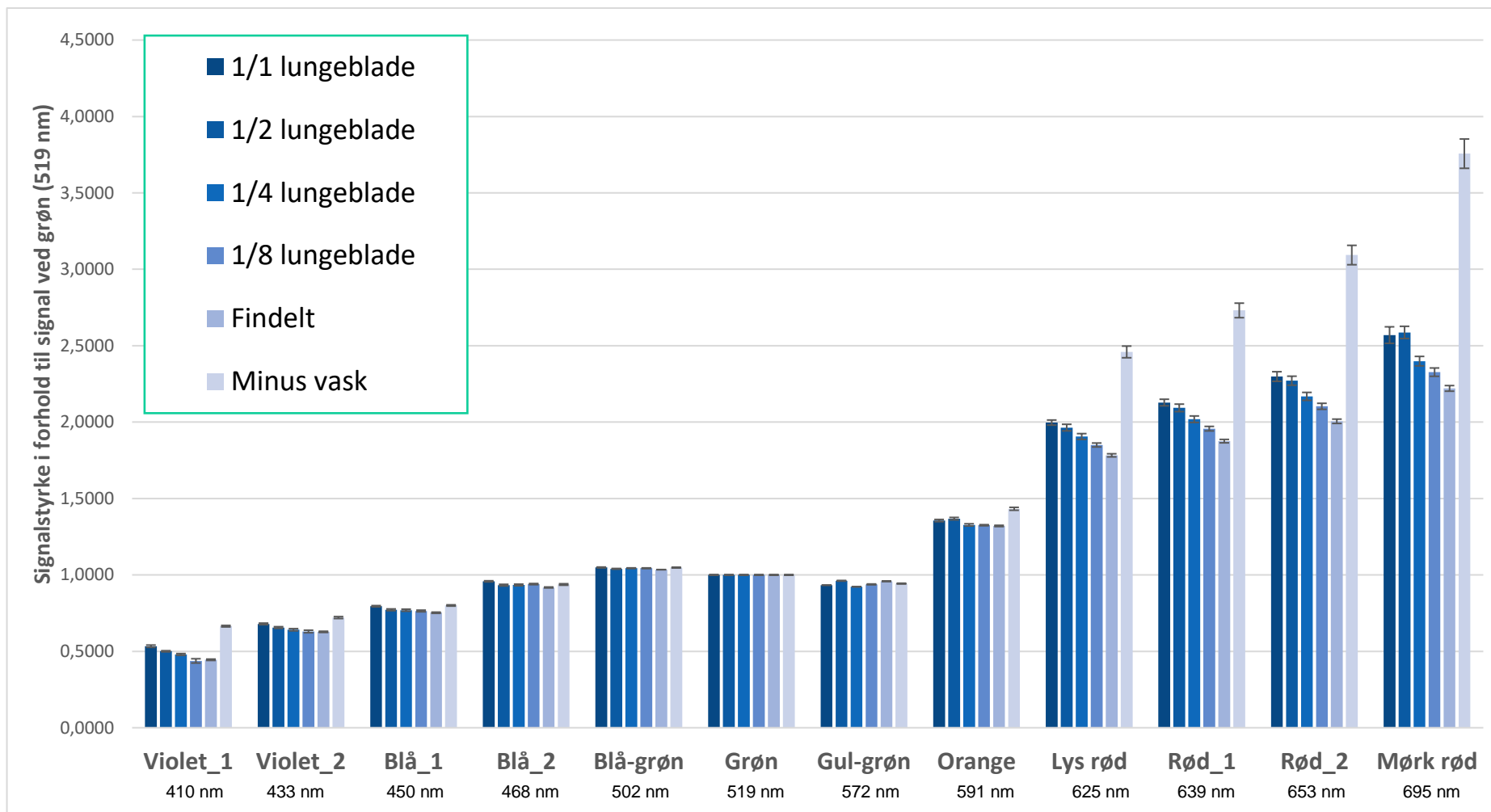
| | Geleringsstyrke [Pa] | Geleringstemperatur [°C] |
|------|----------------------|--------------------------|
| Ref. | 37663 ± 9407 | 48,6 ± 0,2 |
| 1A | 35857 ± 9923 | 46,1 ± 3,4 |
| 1B | 22947 ± 6457 | 47,8 ± 4,4 |
| 3A | 25173 ± 7353 | 50,6 ± 2,6 |
| 3B | 25875 ± 975 | 48,6 ± 1,0 |
| 5A | 42420 ± 2710 | 46,5 ± 2,3 |
| 5B | 44447 ± 363 | 48,5 ± 1,9 |

Resultaterne indikerer, at geleringstemperaturen ikke påvirkes af den foreliggende vask af lungevævet. Geleringsstyrken blev fundet højest for protein ekstraheret fra vasket findelt lungevæv. Der er dog ikke en stigende tendens i geleringsstyrken fra 1-prøverne til 3-prøverne.

Geleringsstyrken for referenceprøven er lav sammenlignet med tidligere resultater, hvor den ved lignende metode blev fundet til 42000-55000 Pa.

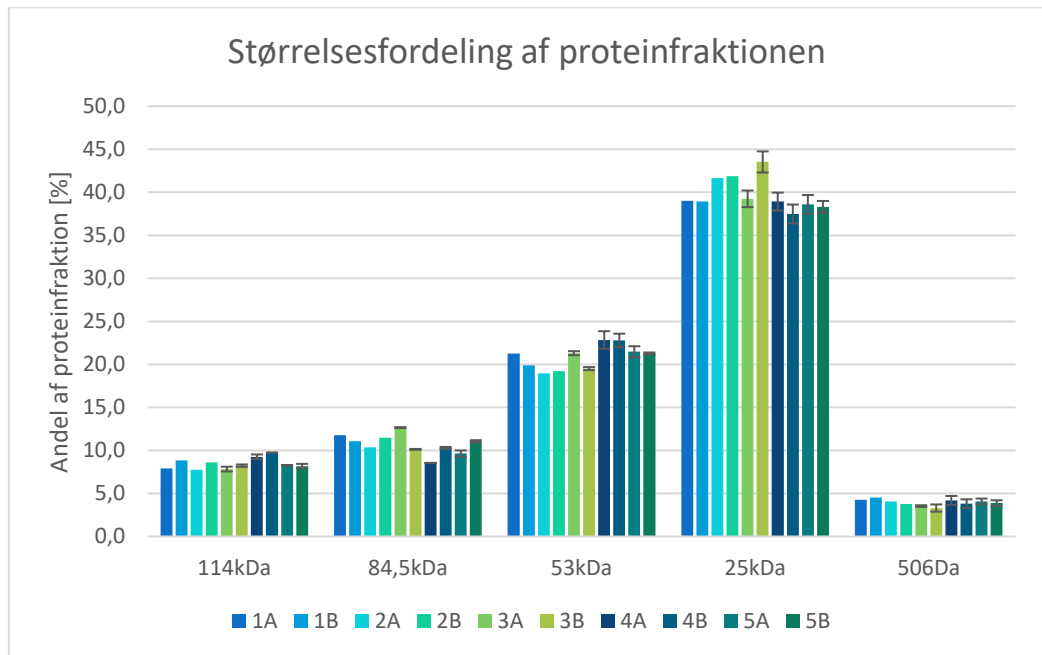
Forskellen mellem tidligere analyser og analysen foretaget i dette forsøg er, at prøverne tidligere ikke har været frysetørret før analyse, hvilket de blev i dette forsøg. Frysetørningsprocessen kan have påvirket proteinet uønsket, idet processen endnu ikke er fuldt optimeret til at sikre, at der ikke sker nogen proteindenaturering.

Farvemålinger Resultaterne fra videometeret fremgår af figur 4. Signalstyrken for de enkelte farver er angivet i forhold til prøvens signalstyrke ved bølgelængden for grøn. Farvemålingerne viste, at der var en effekt på styrken af signalet ved de bølgelængder, som optager røde nuancer. Der blev fundet en reduktion i farven ved øget findeling. En øget vaske-tid blev ikke fundet til at resultere i en øget reduktion (resultater ikke vist). Af figur 5 fremgår de standardiserede billeder, der blev taget i forbindelse med analysen. Over hver prøve er et billede af referencen.



Figur 4. Videometermålinger af ekstraheret lungeprotein fra vasket lungevæv.

Ekstraheret protein fra vasket lungevæv blev karakteriseret ved size exclusion kromatografi, figur 5. Der blev ikke fundet forskel mellem de forskellige fraktioner, hvilket indikerer, at reduktionen i farve ikke afspejles i en bestemt størrelsesfraktion.



Figur 5. Størrelsesfordeling af proteinfraktioner for ekstraheret protein af vasket lungevæv.

Konklusion

Resultaterne indikerer, at vask af lungevæv forinden ekstraktion kan reducere farven af det ekstraherede lungeprotein uden at kompromittere funktionaliteten. Proteinudbyttet påvirkes negativt, hvilket også var forventet, idet protein udvaskes i den indledende fase. HPLC-resultater indikerer, at der ikke er en særlig proteinstørrelse, som bidrager med farven, hvilket betyder, at det ikke formodes, at farven kan fjernes efter ekstraktion med membranfiltrering.

Baseret på den visuelle vurdering er det fundet tilstrækkeligt at vaske de hele lungeblade. Det vil minimere håndteringen ved opskalering af processen samt minimere udbyttetabet ved farvereduktion.