

УДК 577.115

# Оптимизация условий выделения IgY из желтка куриных яиц

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

А. А. Красноштанова, А. Н. Юдина

## КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Юдина Алеся Николаевна  
Адрес: 125480, Москва,  
ул. Героев Панфиловцев, д. 20  
E-mail: a.n.yudina@yandex.ru

## ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

## ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Красноштанова, А. А., & Юдина, А. Н. (2022). Оптимизация условий выделения IgY из желтка куриных яиц. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (4), 74–84. <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.301>

ПОСТУПИЛА: 25.03.2022

ПРИНЯТА: 10.10.2022

ОПУБЛИКОВАНА: 14.10.2022

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.



## АННОТАЦИЯ

**Введение.** Иммуноглобулины Y (IgY), полученные в результате иммунизации сельскохозяйственной птицы против определенного патогена, обладают высокой активностью в отношении данного возбудителя. В настоящее время пассивная иммунизация с использованием IgY является весьма перспективной, благодаря отсутствию реакционной способности IgY в отношении Fc-рецепторов млекопитающих, низкой себестоимости и простоте выделения. Яичный желток является богатым источником IgY, общее содержание которого превышает 100 мг на одно куриное яйцо. Из-за существенных различий между сывороткой крови и яичным желтком, выделение иммуноглобулинов из последнего требует специфической очистки от липидной части желтка. Это достижимо посредством двукратной обработки, включающей процедуру отделения водорастворимой фракции (ВФ) от липидного матрикса при pH 4–5 и выделение IgY из ВФ.

**Цель.** Целью данной работы является оптимизация условий выделения IgY, которые позволили бы реализовать вариант глубокой переработки яичного желтка.

**Материалы и методы.** Для достижения данной цели в качестве объекта исследования были взяты куриные яйца, и использованы статистический (РЦКП), аналитический (биуретовый), физико-химические (ДСН-ПААГ, ультрафильтрация) методы.

**Результаты.** Были подобраны следующие условия выделения IgY: замораживание раствора желтка в смеси натрий-фосфатный буфер: подкисленная до pH 5,0 вода в соотношении 1:6 при температуре –20 °С и декантирование от липидных компонентов фильтрованием во время самопроизвольного оттаивания при комнатной температуре. Полученную водорастворимую фракцию далее подвергали преципитации хлоридом натрия в концентрации 10 масс. % и последующему концентрированию на мембране УАМ-10, что позволило достичь содержания основного вещества (IgY) не менее 95 % в расчете на сухое вещество.

**Выводы.** Установлены условия проведения селективного выделения IgY из яичного желтка путем проведения оптимизации процесса: кратность разведения желточной суспензии равная 6 и концентрация добавляемой соли NaCl к водорастворимой фракции 10 масс. %; в результате было получено уравнение регрессии  $Y = 8,1834X_1 + 5,5258X_2 + 0,6005X_1^2 + 0,2819X_2^2$ , обеспечивающее максимальную степень очистки целевого продукта от балластных белков и примесей, что позволяет получить IgY-содержащую фракцию с содержанием белка, варьирующимся в пределах 11,5–12,1 г/л и чистотой не менее 95 %.

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

IgY, яичный желток, комплексная переработка, преципитация, ультрафильтрация

# Optimization of Conditions for Isolation of IgY from the Yolk of Chicken Eggs

Mendeleev University of Chemical Technology

Alla A. Krasnoshtanova, Alesya N. Yudina

## CORRESPONDENCE:

**Mikhail A. Lavrukhin**  
20/3, Elektrozavodskaya st.,  
Moscow, 107023, Russian Federation  
E-mail: pesterevmisha@yandex.ru

## FOR CITATIONS:

Krasnoshtanova, A. A., & Yudina, A. N. (2022). Optimization of Conditions for Isolation of IgY from the Yolk of Chicken Eggs. *Storage and processing of Farm Products*, (4), 74–84.  
<https://doi.org/10.36107/spfp.2022.301>

RECEIVED: 25.03.2022

ACCEPTED: 10.10.2022

PUBLISHED: 14.10.2022

## DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.

## ABSTRACT

**Background.** Immunoglobulins Y (IgY), obtained as a result of immunization of poultry against a specific pathogen, are highly active against this pathogen. Currently, passive immunization using IgY is very promising due to the lack of reactivity of IgY with respect to mammalian Fc receptors, low cost and ease of isolation. Egg yolk is a rich source of IgY, the total content of which exceeds 100 mg per chicken egg. Due to the significant differences between blood serum and egg yolk, the isolation of immunoglobulins from the latter requires specific purification from the lipid part of the yolk. This is achievable through a two-fold treatment, including the procedure for separating the water-soluble fraction (WF) from the lipid matrix at pH 4-5 and isolating IgY from the WF.

**Purpose.** The purpose of this work is to optimize the conditions for the isolation of IgY, which would allow the implementation of a variant of deep processing of egg yolk.

**Materials and methods.** To achieve this goal, chicken eggs were taken as an object of study, and statistical (RCCP), analytical (biuret), physicochemical (SDS-PAGE, ultrafiltration) methods were used.

**Results.** The following conditions for IgY isolation were selected: freezing of the yolk solution in a mixture of sodium phosphate buffer: water acidified to pH 5.0 in a ratio of 1:6 at a temperature of –20 °C and decanting from lipid components by filtration during spontaneous thawing at room temperature. The resulting water-soluble fraction was then subjected to precipitation with sodium chloride at a concentration of 10 wt. % and subsequent concentration on the UAM-10 membrane, which made it possible to achieve the content of the main substance (IgY) of at least 95 % on a dry matter basis.

**Conclusions.** The conditions for the selective isolation of IgY from egg yolk by optimizing the process were established: the dilution ratio of the yolk suspension is 6 and the concentration of the added NaCl salt to the water-soluble fraction is 10 wt. %; as a result, a regression equation  $Y = 8,1834X_1 + 5,5258X_2 + 0,6005X_1^2 + 0,2819X_2^2$ , was obtained, which provides the maximum degree of purification of the target product from ballast proteins and impurities, which makes it possible to obtain an IgY-containing fraction with a protein content, varying in the range of 11.5–12.1 g / l and a purity of at least 95 %.

## KEYWORDS

IgY, egg yolk, complex processing, precipitation, ultrafiltration



## ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулины (Igs) — гликопротеины, вырабатываемые организмом в ответ на чужеродный антиген и способные целенаправленно атаковать мишени. Наиболее доступным источником антител является кровь млекопитающих. Полученные из крови млекопитающих антитела (IgG) успешно использовались в иммунотерапии и иммунных анализах на протяжении долгих лет (Abbas et al., 2019). Однако их повышенное содержание в крови млекопитающих вовлекает их в ненужное взаимодействие, приводящее к возникновению иммунных опосредованных патологий или к отсутствию иммунного ответа организма, что препятствует их применению в определенных методах иммунного анализа (Thirumalai et al., 2019). Кроме того, нерентабельность производства и трудность достижения высокого и стабильного титра антител препятствуют их использованию в терапевтических целях (Nie et al., 2019; Müller et al., 2015). Более того, процедура выделения антител включает в себя стадии, причиняющие боль животным. Именно поэтому использование крови млекопитающих в качестве источника для получения иммуноглобулинов следует подвергнуть сомнению (Zajac, 2018).

IgY-технология является инновационным методом получения антител для терапии и профилактики (Каплин & Каплина, 2016а; Каплин & Каплина, 2016б). Данный подход основан на процессах производства и извлечения специфических IgY антител из яичного желтка. Преимущества IgYs по сравнению с IgGs заключаются в их экономически эффективном извлечении, минимизации вреда и страданий животных, а также снижении их реактивности с факторами млекопитающих (Spillner et al., 2012; Megha & Mohanan, 2021; Karamzadeh-Dehaghani et al., 2021). В составе молекулы IgY имеются 2 легкие (L) и 2 тяжелые (H) цепи, формирующие за счет переплетения дисульфидных связей мономерное звено (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>). Их молекулярные массы равны 26 кДа и 67 кДа соответственно (Pereira et al., 2019). Известно, что переменную часть H-цепи кодирует область молекулы ДНК, имеющей следующие генные сегменты: переменный (V), соединительный (J) и сегмент разнообразия (D), перестройка которых не способна внести вклад в развитие иммуногенетического разнообразия IgY, что характерно для явления гиперконверсии генов (Parma et al., 2011; Mwale et al., 2020). В отличие от IgG, IgY име-

ет 4 константных домена CH1–CH4, что утяжеляет молекулярный вес IgY (~170–180 кДа) по сравнению с IgG (~150 кДа) (Polanowski et al., 2012). Молекула IgY обладает меньшей гибкостью за счет пролиновых и глициновых аминокислотных остатков, локализованных между доменами CH1–CH2 и CH2–CH3, и именно поэтому куриные антитела менее подвержены протеолитической деградации и фрагментации (Каплин & Каплина, 2016а). Достаточно высокое содержание IgY в желтке позволяет получить из одного яйца 50–100 мг общего IgY и до 10 масс. % от этой величины — специфического IgY, что соответствует количеству IgG, полученного из сыворотки 50–100 мышей (Журавлева и соавт., 2015). Процесс иммунизации куриц, используя определенный антиген, позволяет получить специфические антитела, содержащиеся в желтке (Diraviyam et al., 2019). В качестве антигена могут выступать вирусы, бактерии, белки, искусственные генно-инженерные конструкции, грибки, простейшие. Формирование высокого титра иммуноглобулинов зависит от возраста и породы животного, типа и концентрации вводимого антигена, кратности его введения (Chalghoumi et al., 2009). Яичный желток в отличие от крови млекопитающих представляет собой эмульсию на основе жиров и протеинов и поэтому требует более тщательной обработки перед стадией извлечения IgY. Таким образом, процесс выделения желточных антител построен на первоначальном отделении водорастворимой белковой фракции (ВФ) от липидных компонентов желтка и непосредственном выделении IgYs из ВФ (Grando et al., 2017). Для того, чтобы разделить белковую и липидную фракцию, необходимо провести предварительное осаждение липидных агрегатов, которое согласно литературным данным осуществляется с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000), сульфата декстрана, альгината, каприловой кислоты и других органических растворителей или путем замораживания-оттаивания разбавленной желточной суспензии. Далее IgY-фракцию осаждают из неочищенного белкового экстракта посредством высаливания сульфатом аммония или хлоридом натрия, а после подвергают очистке хроматографией (эксклюзионной, ионообменной, тиофильной, аффинной) или повторно применяют преципитацию иммуноглобулинов (Amro et al., 2017). В зависимости от используемого способа очистки степень чистоты конечного препарата иммуноглобулинов Y варьирует в диапазоне 85–98% в расчете на сухой вес (Esmailnejad et al., 2019).

В настоящее время в данной области активно ведутся разработки способов получения специфических IgY против SARS-CoV-2 для диагностики, профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции. Гипериммунный IgY против консервативного нуклеокапсидного белка (NP) SARS-CoV-2 (N-IgY) в титре 1:50 000 продемонстрировал сильную способность связывания с NP, что заложило основу для применения N-IgY, нацеленного на NP (Lyu et al., 2021; Somasundaram et al., 2020; Lu et al., 2020).

Именно поэтому разработка наилучшего метода выделения IgY из желтка куриных яиц, пригодного для их промышленного получения, является необходимой для обеспечения высокой чистоты получаемой иммуноглобулиновой фракции. Цель данной работы заключается в проведении исследований по оптимизации условий извлечения антител из яичного желтка для разработки простой схемы его выделения, которую можно было бы масштабировать для промышленного использования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объекты

Экспериментальная работа проводилась над модельными объектами, в качестве которых были выбраны куриные яйца, обладающие соответствующими техническими требованиями ГОСТа 31654–2012<sup>1</sup>: влажность — 84%, содержание жира в желтке — 32,6%, сырого протеина в белке — 10,6%, в желтке — 16,6%, фосфолипидов в желтке — 29,6%.

### Материалы

- фосфатный солевой буфер, pH 7,4;
- соляная кислота, 0,2 н;
- хлорид натрия;
- фильтровальная бумага;
- ацетатцеллюлозная мембрана
- вода дистиллированная.

### Оборудование

- конические колбы на 250 мл;
- воронка лабораторная;
- pH-метр; Aquasearcher AB41PH-F, Ohaus, 2020 г.;
- весы лабораторные Scout SJX621/E, Ohaus, 2016 г.;
- спектрофотометр Shimadzu UV-1800, 2016 г.;
- ультрафильтрационная ячейка Stirred Cell, 2018 г.;
- камера для вертикального электрофореза, Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad, 2019 г.

### Инструменты

Статистическую обработку полученных данных осуществляли в программе MS Excel.

### Методы

Содержание белка в растворах определяли биуретовым методом; молекулярную массу цепей, входящих в состав IgY — методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ).

#### Методика проведения ультрафильтрации

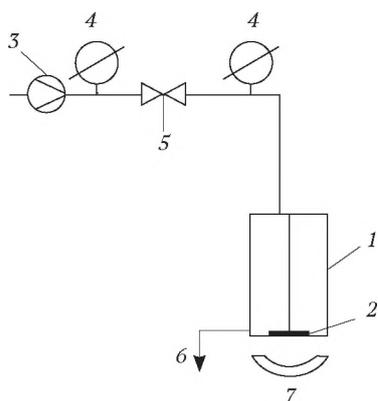
Ультрафильтрацию белковых растворов проводили на плоских ацетатцеллюлозных мембранах с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (УАМ-10). В пермеате определяли содержание сухих веществ<sup>2</sup>.

В мембранную ячейку 1 на фторопластовую подложку 7 помещают мембрану 8 и уплотняют резиновым кольцом 6 (см. Рисунок 1). После этого, отрегулировав положение магнитной мешалки 7, концентрируемый раствор заливают в ячейку через штуцер 10. Компрессором 3 и вентилем 5 создают давление в ячейке не более 2 атм. Пермеат, проходящий через мембрану, по каналу 6 поступает в отдельную ёмкость.

При проведении процесса концентрирования для каждого типа мембраны снимали инте-

<sup>1</sup> ГОСТ 31654–2012. (2012). *Межгосударственный стандарт. Яйца куриные пищевые. Технические условия*. М.: Стандартинформ.

<sup>2</sup> Кусакина, М. Г., Суворов, В. И., & Чудинова, Л. А. (2012). *Большой практикум «Биохимия»*. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет.



**Рисунок 1**

Схема лабораторной установки для проведения фильтрации  
 1 – ячейка; 2 – магнитная мешалка; 3 – компрессор; 4 – манометр; 5 – вентиль; 6 – линия пермеата; 7 – привод мешалки

гральную селективность, которую рассчитывали по формуле (1):

$$\varphi = \left(1 - \frac{X_{п}}{X_{исх}}\right) \cdot 100\%, \quad (1)$$

где  $\varphi$  – интегральная селективность, %;  $X_{п}$  – содержание белковых веществ в пермеате, ед./мл;  $X_{исх}$  – содержание белковых веществ в исходном растворе, ед./мл.

### Процедура исследования

Над объектами исследования была проведена процедура выделения IgY и дальнейшая оптимизация параметров процесса. Методику выделения IgY из яичного желтка проводили в соответствии с ра-

**Таблица 1**

Параметры ультрафильтрационных мембран

Марка мембраны	10П	100П	500П
<b>Минимальная селективность, %</b>			
по миоглобину (12 700Д)	98,5		95,0
по альбумину (67 000Д)		97,0	
по $\gamma$ -глобулину (150 000Д)		98,5	
Рабочий диапазон pH	3÷8 (от 2 до 12 для регенерированной целлюлозы)		
Рабочая температура, °С	5÷50		
Рабочее давление, МПа	0,15	0,15	0,15
Минимальная производительность по дистиллированной воде, $дм^3/м^2 \cdot ч$	15	6	186

нее разработанной схемой выделения (Юдина & Красноштанова, 2020): предварительно очищенную от яичного белка желточную массу смешали с эквивалентным объемом фосфатного буфера (pH 7,4), после чего суспензию разбавили 6-ю объемами подкисленной до pH 5,0 воды; полученную суспензию заморозили при температуре  $-20^{\circ}C$ ; отделение от липидных компонентов желтка осуществляли с помощью фильтрования при самопроизвольном оттаивании при комнатной температуре; к фильтрату, содержащему IgY, добавили NaCl в количестве 10 масс % и сконцентрировали на мембране УАМ-10 до содержания основного вещества не менее 95 % в расчете на сухой вес.

Схема получения IgY-содержащей фракции представлена на Рисунке 2.



**Рисунок 2**

Блок-схема процесса выделения IgY из яичного желтка

Определение оптимальных параметров проведения процесса выделения IgY из яичного желтка с обеспечением максимальной степени очистки целевого продукта от балластных белков и примесей проводили с помощью ротатабельного композиционного планирования. Таким образом, оптимальность режима проведения технологии обуславливается следующими факторами: 1) кратность разведения ( $X_1$ ); 2) концентрация добавляемой соли, выраженная в % масс. ( $X_2$ ). Факторы и уровни их варьирования приведены в Таблице 2. В качестве центра плана взяты предварительно апробированные 6-кратное разведение и 10% масс. концентрация добавляемого хлорида натрия. В общей сложности было проведено 13 экспериментов, при этом число экспериментов в центре композиционного плана составило 5.

**Таблица 2**  
Факторы и уровни их варьирования

Факторы		Уровни варьирования		
		-1	0	+1
Кратность разведения	$X_1$	5	7	9
Концентрация NaCl, масс. %	$X_2$	5	10	15

Так, к аликвоте желточной суспензии, смешанной с фосфатным буфером (рН 7,4), добавляли объемы подкисленной до рН 5,0 воды в 4, 6 и 8 раз превышающих объем аликвоты и замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . По окончании процедуры самопроизвольного оттаивания при комнатной температуре получили водорастворимые фракции, к которым добавили преципитант (NaCl) в концентрациях 5, 10 и 15% от массы раствора. Концентрирование каждого раствора проводили в 2 раза с помощью метода ультрафильтрации на полых ацетатцеллюлозных мембранах с отсечкой по молекулярным массам в 10 кДа. Далее сконцентрированные растворы подвергались очистке методом диафильтрации. По полученным значениям интегральной селективности проводили построение поверхности отклика для установления оптимальных параметров извлечения IgY из желтка яиц сельскохозяйственной птицы. IgY-содержащий ретант, отвечающий установленным условиям процедуры дополнительно исследовали на степень чистоты методом ДСН-ПААГ.

## Анализ данных

Планирование экспериментов для получения уравнения регрессии второго порядка осуществляли с помощью ротатабельного центрального композиционного плана (РЦКП), поскольку данный тип планирования позволяет минимизировать ошибки в определении значения параметра  $Y$ , вызванные неадекватностью представления результатов исследования процесса имитационной моделью в виде полинома второго порядка. Это возможно благодаря выбору удаленных от центра плана «звездных точек» на осях координат, что позволяет дополнить информацию, равнозначную во всех направлениях, и придать непрерывность информационной поверхности.

Планирование и обработку экспериментов проводили в соответствии с учебным пособием (Ахназарова & Кафаров, 1985). Для приведения модели в соответствие с экспериментальными данными был использован множественный регрессионный анализ, представленный в виде полинома второй степени (2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2, \quad (2)$$

где  $Y$  — измеряемый параметр,  $\beta_0$  — регрессионный коэффициент,  $\beta_1$  — регрессионный коэффициент для  $X_1$ ,  $\beta_2$  — регрессионный коэффициент для  $X_2$ ,  $X_1$  — кратность разведения,  $X_2$  — концентрация NaCl, выраженная в масс. %. Уравнение выражает взаимосвязь между прогнозируемым откликом и независимыми переменными. Адекватность полученной модели оценивали с помощью критерия Фишера. Значимость коэффициентов уравнения регрессии оценивали по критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый метод извлечения IgY из яичного желтка требует доработки с целью получения иммуноглобулиновой фракции высокой степени очистки. Поэтому следующим шагом в исследовательской работе является оптимизация вышеописанного процесса, результаты которого отражены в графиках и таблицах.

**Таблица 3**

Влияние кратности разбавления желточной массы и концентрации хлорида натрия на эффективность ультрафильтрации

Кратность разведения	Концентрация добавляемой соли (NaCl), %	Концентрация белка после концентрирования, г/л	Интегральная селективность φ, %
3	10	10,1	64
4	5	11,5	68
4	15	9,8	64
6	3	8,7	57
6	10	12,0	72
6	10	11,5	70
6	10	12,1	72
6	10	11,8	71
6	10	11,6	71
6	17	9,5	56
8	5	8,4	62
8	15	9,1	65
11	10	8,0	56

В таблице 3 представлена информация о расчетных значениях содержания белка в растворах после УФ и интегральной селективности по белку.

По приведенным данным о селективности (Y) по белку можно судить об эффективности его очистки от примесных компонентов. Из проведенного опыта следует, что наилучшему разведению желточной массы, при котором наблюдается самое высокое значение показателя φ, соответствует 6, а концентрация добавляемого реагента (NaCl) — 10 масс.%. Восьмикратное разведение оказалось неудачным из-за наличия сильного опалесцирующего эффекта в водорастворимой фракции, что свидетельствует о неполном разделении белковой и липидной фракций, а четырехкратное — нецелесообразно ввиду низких показателей по значениям интегральной селективности.

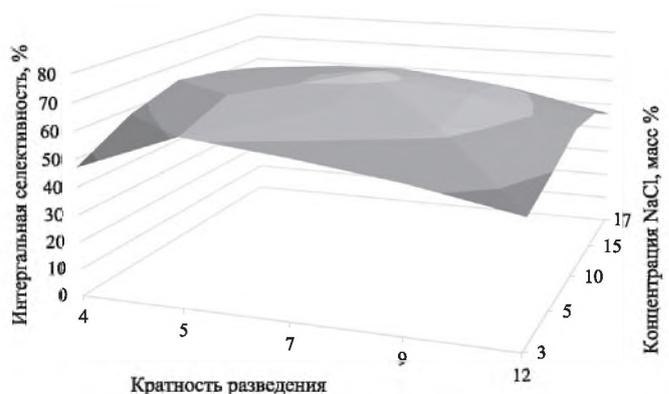
По результатам эксперимента была проведена математическая обработка экспериментальных данных методом РЦКП. Было получено следующее уравнение регрессии (3):

$$Y = 8,1834X_1 + 5,5258X_2 + 0,6005X_1^2 + 0,2819X_2^2. \quad (3)$$

Для проверки адекватности полученных уравнений рассчитывали значение интегральной селективности конечной фракции IgY и на основании полученных данных, определив значение критерия Фишера, заключили, что уравнение регрессии адекватно эксперименту.

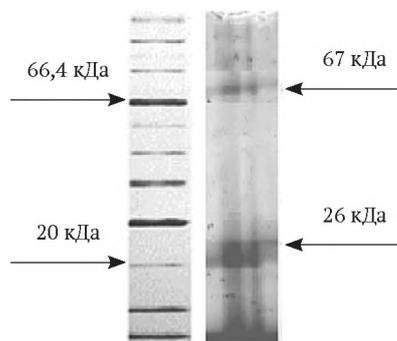
По полученному уравнению регрессии (3) была построена поверхность отклика, представленная на Рисунке 3.

Исходя из приведенного графика можно сделать вывод о том, что оптимальными условиями для проведения процесса извлечения IgY из яичного желтка, позволяющими достичь значение показателя интегральной селективности не ниже 70%, является кратность разведения желточной суспензии равная 6 и концентрация добавляемой соли NaCl к водорастворимой фракции — 10 масс %, что соотносится с ранее полученными результатами (Юдина & Красноштанова, 2019). Таким образом, метод РЦКП как инструмент математического моделирования позволил определить наиболее точные параметры процесса, а именно кратность разведения суспензии, равную 6, что опровергает результаты, ранее полученные Hodek et. al., которые использовали кратность разведения равную 8. Сокращение объема перерабатываемой желточной массы при промышленном производстве является существенным преимуществом, поскольку позволяет снизить энергозатраты на перекачивание, нагрев и охлаждение технологических потоков. Стоит также отметить, что представленный метод позволяет



**Рисунок 3**

Поверхность отклика выходного параметра (интегральная селективность, %) при проведении оптимизации процесса выделения IgY из желтка куриных яиц

**Рисунок 4**

Электрофореграмма IgY-содержащего ретанта, полученного в результате шестикратного разбавления желточной суспензии и специфической преципитации солями NaCl в концентрации 10 масс %

получить IgY-содержащую фракцию с содержанием белка, варьирующимся в пределах 11,5–12,1 г/л.

Полученную в оптимальных условиях IgY-содержащую фракцию исследовали на степень чистоты с ДСН-ПААГ. Полученные результаты представлены на Рисунке 4.

Из рисунка следует, что две полосы, соответствуют молекулярным массам легкой (26 кДа) и тяжелой (67 кДа) цепям иммуноглобулина класса Y. Таким образом, полученные данные согласуются с данными работ по исследованию молекулярно-массового состава иммуноглобулина IgY, выполненных авторами Hartmann, Wilhelmson, Hodek, Trefil, Simunek, Hudecek, Stiborova (Hartmann & Wilhelmson, 2001), использующих аналогичную методику по извлечению IgY из яичного желтка.

## ВЫВОДЫ

Цель данного исследования заключалась в оптимизации условий извлечения антител из яичного желтка для разработки более простой по сравнению с известными схемы его выделения, которую можно было бы масштабировать для промышленного использования.

В результате исследования процесса извлечения IgY из яичного желтка удалось установить оптимальные условия процесса, позволяющие получить

IgY-содержащую фракцию. При кратности разведения желточной суспензии, равной 6, и концентрации хлорида натрия 10 масс %, добавляемого к фильтрату, полученному после процесса самопроизвольного оттаивания замороженной суспензии при комнатной температуре, далее подвергаемой очистке методом ультра- и диафильтрации, возможно получить ретант с содержанием IgY не ниже 11,5 г/л, что соответствует 95 % основного вещества в расчете на абсолютно сухую массу.

Таким образом, в ходе проведения метода математического планирования были подобраны оптимальные условия извлечения иммуноглобулинов Y из яичного желтка, а применение мембранных технологий в качестве способа его очистки от балластных белков и низкомолекулярных примесей обеспечило высокую степень чистоты целевого продукта (IgY). Представленная схема выделения иммуноглобулинов класса Y включает относительно простые технологические операции с применением дешевых, доступных и малотоксичных реагентов, что способно увеличить экономическую эффективность стадий и снизить затраты себестоимости, а также реализовать производство со сниженной экологической нагрузкой. Полученная субстанция сможет найти применение в пищевой промышленности и фармацевтике. Дальнейшие исследования будут направлены на подбор условий получения сухой субстанции иммуноглобулина Y, а также на оценку ее биологической активности и получение стабилизированных форм препарата.

## АВТОРСКИЙ ВКЛАД

**Красноштанова А. А.:** концептуализация, разработка методологии исследования, работа с программным обеспечением, курирование данных, научное руководство исследованием, написание-рецензирование и редактирование рукописи.

**Юдина А. Н.:** написание — подготовка черновика рукописи, визуализация, проведение исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ахназарова, С. Л., & Кафаров, В. В. (1985). *Методы оптимизации эксперимента в химической технологии*. М.: Высшая школа.
- Журавлева, М. В., Фирсова, И. В., & Воробьев, А. А. (2015). Клиническая эффективность метода плазмолифтинг и препарата «траумель с» в лечении заболеваний пародонта на примере собак с хроническим генерализованным пародонтитом. *Современные проблемы науки и образования*, (5), 351.
- Каплин, В. С., & Каплина, О. Н. (2016а). IGY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммуноterapiи. *Международные обзоры: Клиническая практика и здоровье*, (4), 59–75.
- Каплин, В. С., & Каплина, О. Н. (2016б). IGY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц. *Биотехнология*, 33(2), 29–40. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-2-29-40>
- Юдина, А. Н., & Красноштанова, А. А. (2019). Выбор оптимальной схемы выделения иммуноглобулинов из желтка яиц сельскохозяйственной птицы. В *Современное материаловедение: Труды XIX Ежегодной молодежной конференции с международным участием* (с. 247–249). М.: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук.
- Юдина, А. Н., & Красноштанова, А. А. (2020). Способ селективного выделения и очистки иммуноглобулинов (IgY) из желтка яиц сельскохозяйственной птицы. *Успехи в химии и химической технологии*, (11), 21–23.
- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., & Azhar, E. (2019). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(1), 264–275. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- Amro, W. A., Al-Qaisi, W., & Al-Razem, F. (2017). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., & Théwis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 295–308.
- Diraviyam, T., Ambi, S.V., Vieira-Pires, R.S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>
- Esmailnejad, A., Abdi-Hachesoo, B., Hosseini, N., Elhamsadat, K., & Shakoori, M. (2019). Storage stability of anti-salmonella typhimurium immunoglobulin Y in immunized quail eggs stored at 4°C. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 89(12), 1318–1321. <https://doi.org/10.56093/ijans.v89i12.96622>
- Grando, T. H., Baldissera, M. D., de Sá, M. F., do Carmo, G. M., Porto, B., Aguirre, G., Azevedo, M. I., de Jesus, F., Santurio, J. M., Sagrillo, M. R., Stefani, L. M., & Monteiro, S. G. (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of Immunological Methods*, 449, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>
- Hartmann, C., & Wilhelmson, M. (2001). The hen's egg yolk: A source of biologically active substances. *World's Poultry Science Journal*, 57(1), 13–28. <https://doi.org/10.1079/WPS20010003>
- Karamzadeh-Dehaghani, A., Towhidi, A., Zhandi, M., Mojgani, N., & Fouladi-Nashta, A. (2021). Combined effect of probiotics and specific immunoglobulin Y directed against *Escherichia coli* on growth performance, diarrhea incidence, and immune system in calves. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 15(2), 100–124. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100124>
- Lu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Huang, J., Yao, M., Huang, G., Ge, Y., Zhang, P., Huang, H., Wang, Y., Li, H., & Wang, W. (2020). Generation of Chicken IgY against SARS-CoV-2 Spike Protein and Epitope Mapping. *Journal of Immunology Research*, 2020, Article 9465398. <https://doi.org/10.1155/2020/9465398>
- Lyu, J., Bao, L., Shen, X., Yan, C., Zhang, C., Wei, W., Yang, Y., Li, J., Dong, J., Xiao, L., Zhou, X., & Li, Y. (2021). The preparation of N-IgY targeting SARS-CoV-2 and its immunomodulation to IFN- $\gamma$  production in vitro. *International Immunopharmacology*, 96, 107797–107797. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107797>
- Megha, K. B., & Mohanan, P. V. (2021). Role of immunoglobulin and antibodies in disease management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.073>
- Müller, S., Schubert, A., Zajac, J., Dyck, T., & Oelkrug, C. (2015). IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal*, 14, Article 109. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0067-3>
- Mwale, P. F., Lee, C. H., Lin, L. T., Leu, S. J., Huang, Y. J., Chiang, L. C., Mao, Y. C., & Yang, Y. Y. (2020). Expression, purification, and characterization of anti-Zika virus envelope protein: Polyclonal and chicken-derived single chain variable fragment antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), Article 492. <https://doi.org/10.3390/ijms21020492>
- Nie, W., Zhao, C., Guo, X., Sun, L., Meng, T., Liu, Y., Song, X., Xu, K., Wang, J., & Li, J. (2019). Preparation and identification of chicken egg yolk immunoglobulins against human enterovirus 71 for diagnosis of hand-foot-and-mouth disease. *Analytical Biochemistry*, 573, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.029>
- Parma, Y. R., Chacana, P. A., Rogé, A., Kahl, A., Cangelosi, A., Geoghegan, P., Lucchesi, P. M., & Fernández-Miyakawa, M. E. (2011). Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon: Official Journal of the Inter-*

- national Society on Toxinology*, 58(4), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.009>
- Pereira, E., van Tilburg, M. F., Florean, E., & Guedes, M. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, 73, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
- Polanowski, A., Zabłocka, A., Sosnowska, A., Janusz, M., & Trziszka, T. (2012). Immunomodulatory activity accompanying chicken egg yolk immunoglobulin Y. *Poultry Science*, 91(12), 3091–3096. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02546>
- Somasundaram, R., Choraria, A., & Antonysamy, M. (2020). An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review. *International Immunopharmacology*, 85, Article 106654. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106654>
- Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., & du Plessis, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 40(2), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>
- Thirumalai, D., Visaga Ambi, S., Vieira-Pires, R. S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>
- Zajac, J. D. (2018). *IgY antibodies against bacterial infection*. [Doctoral Dissertation, Leipzig University]. Leipzig, Germany.

## REFERENCES

- Akhazarova, S. L., & Kafarov, V. V. (1985). *Metody optimizatsii eksperimenta v khimicheskoi tekhnologii* [Methods of experiment optimization in chemical technology]. Moscow: Vysshaya shkola.
- Zhuravleva, M. V., Firsova, I. V., & Vorob'ev, A. A. (2015). Klinicheskaya effektivnost' metoda plazmoliftinga i preparata «traumel' s» v lechenii zabolevaniya parodonta na primere sobak s khronicheskim generalizovannym parodontitom [Clinical efficacy of the plasmolifting method and the drug "traumel c" in the treatment of periodontal diseases on the example of dogs with chronic generalized periodontitis]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern Problems of Science and Education], (5), 351.
- Kaplin, V. S., & Kaplina, O. N. (2016a). IGY-tehnologii v meditsine. Zheltochnye antitela ptits v immunoterapii [IGY-technologies in medicine. Yolk antibodies of birds in immunotherapy]. *Mezhdunarodnye obzory: Klinicheskaya praktika i zdorov'e* [International Reviews: Clinical Practice and Health], (4), 59–75.
- Kaplin, V. S., & Kaplina, O. N. (2016b). IGY-tehnologii v meditsine. Zheltochnye antitela ptits [IGY-technologies in medicine. Yolk antibodies of birds]. *Biotekhnologiya* [Biotechnology], 33(2), 29–40. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-2-29-40>
- Yudina, A. N., & Krasnoshtanova, A. A. (2019). Vybor optimal'noi skhemy vydeleniya immunoglobulinov iz zheltka yaits sel'skokhozyaistvennoi ptitsy [Selection of the optimal scheme for the isolation of immunoglobulins from the yolk of poultry eggs]. In *Sovremennoe materialovedenie: Trudy XIX Ezhegodnoi molodezhnoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem* [Modern Materials Science: Proceedings of the 19th Annual Youth Conference with International Participation] (pp. 247–249). Moscow: Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethoe uchrezhdenie nauki institut biokhimicheskoi fiziki im. N. M. Emanuelya Rossiiskoi akademii nauk.
- Yudina, A. N., & Krasnoshtanova, A. A. (2020). Sposob selektivnogo vydeleniya i ochistki immunoglobulinov (IgY) iz zheltka yaits sel'skokhozyaistvennoi ptitsy [A method for selective isolation and purification of immunoglobulins (IgY) from the yolk of poultry eggs]. *Uspekhi v khimii i khimicheskoi tekhnologii* [Advances in Chemistry and Chemical Technology], (11), 21–23.
- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., & Azhar, E. (2019). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(1), 264–275. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- Amro, W. A., Al-Qaisi, W., & Al-Razem, F. (2017). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., & Théwis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 295–308.
- Diraviyam, T., Ambi, S.V., Vieira-Pires, R.S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>
- Esmailnejad, A., Abdi-Hachesoo, B., Hosseini, N., Elhamsadat, K., & Shakoory, M. (2019). Storage stability of anti-salmonella typhimurium immunoglobulin Y in immunized quail eggs stored at 4°C. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 89(12), 1318–1321. <https://doi.org/10.56093/ijans.v89i12.96622>
- Grando, T. H., Baldissera, M. D., de Sá, M. F., do Carmo, G. M., Porto, B., Aguirre, G., Azevedo, M. I., de Jesus, F., Santurio, J. M., Sagrillo, M. R., Stefani, L. M., & Monteiro, S. G.

- (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of Immunological Methods*, 449, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>
- Hartmann, C., & Wilhelmson, M. (2001). The hen's egg yolk: A source of biologically active substances. *World's Poultry Science Journal*, 57(1), 13–28. <https://doi.org/10.1079/WPS20010003>
- Karamzadeh-Dehaghani, A., Towhidi, A., Zhandi, M., Mojgani, N., & Fouladi-Nashta, A. (2021). Combined effect of probiotics and specific immunoglobulin Y directed against *Escherichia coli* on growth performance, diarrhea incidence, and immune system in calves. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 15(2), 100–124. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100124>
- Lu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Huang, J., Yao, M., Huang, G., Ge, Y., Zhang, P., Huang, H., Wang, Y., Li, H., & Wang, W. (2020). Generation of Chicken IgY against SARS-CoV-2 Spike Protein and Epitope Mapping. *Journal of Immunology Research*, 2020, Article 9465398. <https://doi.org/10.1155/2020/9465398>
- Lyu, J., Bao, L., Shen, X., Yan, C., Zhang, C., Wei, W., Yang, Y., Li, J., Dong, J., Xiao, L., Zhou, X., & Li, Y. (2021). The preparation of N-IgY targeting SARS-CoV-2 and its immunomodulation to IFN- $\gamma$  production in vitro. *International Immunopharmacology*, 96, 107797–107797. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107797>
- Megha, K. B., & Mohanan, P. V. (2021). Role of immunoglobulin and antibodies in disease management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.073>
- Müller, S., Schubert, A., Zajac, J., Dyck, T., & Oelkrug, C. (2015). IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal*, 14, Article 109. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0067-3>
- Mwale, P. F., Lee, C. H., Lin, L. T., Leu, S. J., Huang, Y. J., Chiang, L. C., Mao, Y. C., & Yang, Y. Y. (2020). Expression, purification, and characterization of anti-Zika virus envelope protein: Polyclonal and chicken-derived single chain variable fragment antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), Article 492. <https://doi.org/10.3390/ijms21020492>
- Nie, W., Zhao, C., Guo, X., Sun, L., Meng, T., Liu, Y., Song, X., Xu, K., Wang, J., & Li, J. (2019). Preparation and identification of chicken egg yolk immunoglobulins against human enterovirus 71 for diagnosis of hand-foot-and-mouth disease. *Analytical Biochemistry*, 573, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.029>
- Parma, Y. R., Chacana, P. A., Rogé, A., Kahl, A., Cangelosi, A., Geoghegan, P., Lucchesi, P. M., & Fernández-Miyakawa, M. E. (2011). Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 58(4), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.009>
- Pereira, E., van Tilburg, M. F., Florean, E., & Guedes, M. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, 73, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
- Polanowski, A., Zabłocka, A., Sosnowska, A., Janusz, M., & Trziszka, T. (2012). Immunomodulatory activity accompanying chicken egg yolk immunoglobulin Y. *Poultry Science*, 91(12), 3091–3096. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02546>
- Somasundaram, R., Choraria, A., & Antonysamy, M. (2020). An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review. *International Immunopharmacology*, 85, Article 106654. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106654>
- Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., & du Plessis, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 40(2), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>
- Thirumalai, D., Visaga Ambi, S., Vieira-Pires, R. S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>
- Zajac, J. D. (2018). *IgY antibodies against bacterial infection*. [Doctoral Dissertation, Leipzig University]. Leipzig, Germany.