

RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, WOJCIECH BIAŁAS, TOMASZ JANKOWSKI

WYKORZYSTANIE DWUFAZOWEJ EKSTRAKЦИИ WODNEJ DO SEPARACJI LIZOZYMU Z BIAŁKA JAJA KURZEGO

Streszczenie

Wzrastające wymagania konsumentów sprawiają, że producenci żywności są coraz bardziej zainteresowani naturalnymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi, w miejsce powszechnie stosowanych chemicznych konserwantów. Spośród różnych, naturalnych substancji przeciwdrobnoustrojowych lizozym charakteryzuje się właściwościami hamującymi wzrost wielu bakterii chorobotwórczych, na przykład *Staphylococcus* i *Streptococcus*. W celu uzyskania handlowych preparatów lizozymu można stosować różne metody jego izolacji z białka jaja kurzego, choć nieliczne z nich wdrożono już do produkcji na skalę przemysłową. Należą do nich: wielokrotne wytrącanie za pomocą soli i krystalizacja, bezpośrednia ultrafiltracja i chromatografia jonowymienna. Ostatnio, w literaturze publikowane są informacje na temat badań nad ekstrakcją lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych układach dwufazowych (ATPS) typu glikol polietylenowy (PEG)/roztwór soli. W porównaniu z innymi technikami separacji i oczyszczania białek, zastosowanie wodnych układów dwufazowych charakteryzuje się: krótkim czasem procesu separacji, niskim zużyciem energii, przebiegiem ekstrakcji w warunkach, które nie denaturują białek oraz stosunkowo łatwą możliwością powiększenia skali procesu. Jednak w układzie dwufazowym składającym się z glikolu polietylenowego (PEG) i roztworu soli, lizozym preferencyjnie migruje do fazy górnej wzbogaconej w PEG, co z kolei utrudnia dalszy odzysk tego enzymu. Proces separacji lizozymu w wodnych układach dwufazowych można uprościć i uczynić bardziej wydajnym poprzez zastosowanie zamiast glikolu polietylenowego (PEG) polimeru termoseparującego, zbudowanego z reszt oksyetylenu i oksypropylenu (EOPO), który tworzy fazę górną w układach dwufazowych z formującymi fazę dolną roztworami soli. W takim układzie dwufazowym, polimer EOPO zostaje oddzielony od wodnego roztworu oczyszczonego lizozymu w procesie termoseparacji polimeru, który, podobnie jak roztwór soli pozostały po pierwszym etapie procesu ekstrakcji dwufazowej, może być następnie wielokrotnie wykorzystywany.

Słowa kluczowe: lizozym, oczyszczanie białek, ekstrakcja dwufazowa, termoseparujące polimery

Lizozym i jego właściwości

Lizozym (N-acetylo-muramylohydrolaza, EC.3.2.1.17) jest białkiem enzymatycznym, które odkrył w drugiej dekadzie XX wieku A. Fleming. W organizmie czło-

Dr inż. R. Dembczyński, dr inż. W. Białas, prof. dr hab. T. Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

wieka enzym ten występuje głównie w ziarnistościach granulocytów wielojądrowych, monocytów oraz makrofagów. Znajduje się także w większości płynów tkankowych, oprócz: potu i płynu mózgowo-rdzeniowego. Wyizolowano go również z niektórych roślin, bakterii i bakteriofagów [40]. Bogatym i stosunkowo łatwo dostępnym źródłem tego enzymu jest białko jaj ptaków, w którym stanowi on około 3,5 % suchej substancji [10].

Lizozym wykazuje aktywność hydrolazy katalizującej rozrywanie wiązań β -1,4-glikozydowych pomiędzy cząsteczkami kwasu N-acetylmuraminowego i N-glukozaminą, dzięki czemu powoduje lizę ścian komórkowych bakterii, w tym częstych patogenów żywności, jak *Staphylococcus* i *Streptococcus*, oraz, zgodnie z ostatnimi doniesieniami literaturowymi, również patogenów grzybowych, wśród których wymienić można między innymi *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* czy *Candida albicans* [40]. W organizmie człowieka stanowi ponadto jeden z mechanizmów nieswoistej, humoralnej odpowiedzi immunologicznej [15]. Przypuszcza się, że stymuluje głównie produkcję limfocytów T obecnych w tkankach limfoidalnych związanych z układem pokarmowym (ang. gut-associated lymphoid tissue - GALT).

Zastosowanie lizozymu w przemyśle spożywczym

Stosownie do standardów FAO/WHO lizozym jest substancją dozwoloną do stosowania w niektórych artykułach żywnościowych [6]. Ze względu na wspomniane właściwości bakteriobójcze oraz bakteriostatyczne znajduje on zastosowanie przede wszystkim jako dodatek do żywności o charakterze substancji konserwującej [18, 26]. Dotyczy to głównie produkcji twardej serów dojrzewających, w których enzym ogranicza wzrost *Clostridium tyrobutyricum*, mikroorganizmu wytwarzającego znaczne ilości gazów odpowiedzialnych za technologicznie niekorzystne zjawisko tzw. wzdęcia sera. Dodatek lizozymu do przetworów rybnych, mięsnych oraz z mleka powoduje ponadto zahamowanie wzrostu niebezpiecznej dla człowieka bakterii *Listeria monocytogenes*, stanowiącej jedną z głównych przyczyn zakażeń żywności. Mleko wzbogacone w lizozym jest również używane w karmieniu wcześniaków cierpiących na różnego rodzaju infekcje [42]. Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach, w dziedzinie chemii polimerów pozwolił także na opracowanie nowych, biodegradowalnych i w pełni bezpiecznych dla konsumenta opakowań zawierających w swoim składzie lizozym [23]. Tego rodzaju opakowania umożliwiają znaczne przedłużenie trwałości produktów spożywczych, bez potrzeby stosowania dodatkowych zabiegów w postaci obróbki termicznej, radiacyjnej czy wysokociśnieniowej [11]. Obserwuje się także coraz większe zainteresowanie lizozymem ze strony przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Postuluje się wykorzystanie tego białka w terapii różnego rodzaju chorób, jak: zapalenie gardła, ucha środkowego, węzłów chłonnych, związanych

przede wszystkim z obecnością wyjątkowo niebezpiecznych bakterii zaliczanych do grupy gronkowców. Szczególnie interesujące wydają się być wyniki badań nad zastosowaniem preparatów farmaceutycznych zawierających lizozym oraz inne związki o właściwościach litycznych, produkowane przez owady określane mianem cekropin [3, 38]. Należy jednak zaznaczyć, że wyprodukowanie tego rodzaju preparatów przeznaczonych między innymi do zastosowań w warunkach klinicznych napotyka na pewne ograniczenia.

Największą aktywnością lityczną w stosunku do bakterii oraz wymienionych wyżej grzybów cechuje się lizozym typu c znajdujący się w komórkach ludzkich, bydłych oraz w białku jaj kurzych. W pierwszym przypadku brak jednak możliwości pozyskania tego enzymu w ilości, którą można by uznać za wystarczającą do zastosowań terapeutycznych, w drugim natomiast występuje poważne ryzyko zakażenia chorobami prionowymi, zaliczanymi do grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Zdecydowanie najkorzystniej przedstawia się zatem idea pozyskiwania lizozymu z białka jaja kurzego i jak dotąd ten surowiec jest najczęściej wykorzystywany przemysłowo.

Tradycyjne metody separacji lizozymu

Ze względu na rosnące zainteresowanie przemysłu lizozymem jako naturalnym konserwantem, poszukuje się prostych i wydajnych metod jego separacji z białka jaja kurzego. Preparaty lizozymu można wytwarzać różnymi metodami, z których tylko kilka opracowano do stosowania w skali przemysłowej. Należą do nich kilkukrotne wysalanie i krystalizacja, bezpośrednia ultrafiltracja i chromatografia jonowymienna [5].

W Polsce, jak dotychczas, tylko jeden zakład wytwarza preparaty lizozymu z białka jaja kurzego przy użyciu technologii stanowiącej przedmiot ośmiu zastrzeżeń patentowych [17]. Technologia ta polega na procesie adsorpcji prowadzonej na wymienniczu jonowym o pH zbliżonym do naturalnego pH białka. Proces ten przebiega przy utrzymaniu stosunku wagowego suchego wymiennicza jonowego do białka lub jego roztworu od 1 : 10 do 1 : 3. Po procesie adsorpcji lizozymu, pozostałe składniki białka jaja są wmywane wodą ze złoża wymiennicza jonowego. W dalszej kolejności następuje desorpcja lizozymu ze złoża roztworami soli (NaCl) o stężeniu od 0,2 do 2,0 mol/dm³. W tym procesie, separowany enzym przechodzi do roztworu soli, który jest następnie zagęszczany metodą ultrafiltracji membranowej do uzyskania od 10 do 50 % wyjściowej objętości. Nadmiar soli usuwa się z użyciem dializy. Wartość liczbowa pH w zagęszczonym roztworze jest następnie ustalana na poziomie 3,5 do 7,0.

Istotną wadą tej technologii jest przede wszystkim duża liczba operacji jednostkowych wymaganych do przeprowadzenia pełnego cyklu produkcyjnego, co może niekorzystnie wpływać na końcową wydajność oraz aktywność wytwarzanego preparatu. Należy zauważyć, że wykorzystanie w procesie oczyszczania lizozymu wymienia-

czy jonowych o dużej wydajności jest związane z wysokimi nakładami inwestycyjnymi. Okres prawidłowego funkcjonowania złoża jest przy tym zależny od sposobu przygotowania surowca. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez Guérin-Dubiard i wsp. [10], zastosowanie tradycyjnych wymienników jonowych pracujących w systemie upakowanego złoża wiąże się bowiem z koniecznością usunięcia z białka jaja podawanego oczyszczaniu owomucyny, glikoproteiny stanowiącej, podobnie jak lizozym, około 3,5 % wyjściowej masy surowca. Białko to, ze względu na skłonność do tworzenia struktur żelowych wytrąca się w kolumnie, co w rezultacie może prowadzić do jej zapychania i dużego spadku wydajności separacji. Usuwanie owomucyny jest zabiegiem wieloetapowym. W pierwszej kolejności ustala się pH białka jaja na poziomie 6,0, po czym poddaje się mieszaniną przez 24 h w celu wytrącenia owomucyny w postaci osadu, który następnie separuje się za pomocą wirowania lub filtracji. Etap ten można pominąć tylko wówczas, gdy stosuje się wymiennicze jonowe pracujące w systemie ekspansji złoża (ang. *expanded bed chromatography*, EBA), w którym surowiec przed przystąpieniem do oczyszczania podaje się jedynie dwu- lub trzykrotnemu rozcieńczeniu. Pomimo wielu zalet, system ten znajduje jak dotąd zastosowanie w produkcji substancji wykorzystywanych przez przemysł farmaceutyczny, w którym końcowa czystość jest kluczowym elementem decydującym o przydatności danego produktu. Wynika to przede wszystkim z wysokich kosztów zakupu odpowiednich wypełnień. Zakłada się, że wykorzystanie EBA jest zasadne wówczas, gdy separowana substancja jest bardzo droga, a jej zawartość w surowcu niewielka. Na całkowity koszt procesu mają także wpływ znaczne ilości wody oraz roztworów buforowych stosowanych podczas regeneracji i płukania złoża. Warto dodać, że proces desorpcji enzymu związanego z nośnikiem odbywa się poprzez elucję za pomocą roztworów o wysokim stężeniu chlorku sodu. W rezultacie stwarza to konieczność wykonania zabiegu odsalania uzyskanego eluatu za pomocą dializy, co również znacznie wydłuża proces i prowadzi do wzrostu kosztów wskutek zwiększonego zapotrzebowania na wodę. Uzyskany w wyniku tego zabiegu preparat poddaje się następnie procesowi zagęszczania na membranach ultrafiltracyjnych, których użyteczność, zgodnie z tym, co podkreślają autorzy omawianej technologii, wynika przede wszystkim z wysokiej selektywności, stosunkowo niskich nakładów inwestycyjnych wymaganych do uruchomienia instalacji oraz energetycznie korzystnych warunków prowadzenia procesu. Technika ta nie wymaga stosowania podwyższonej temperatury, separacja odbywa się bowiem z pominięciem przejść fazowych, charakterystycznych dla destylacji czy krystalizacji. Z przemysłowego punktu widzenia bardzo istotną zaletą tej metody jest również łatwość powiększania skali oraz możliwość integracji instalacji filtracyjnych z innymi urządzeniami pracującymi w danym ciągu technologicznym. Odpowiednia konstrukcja aparatury umożliwi również pracę w systemie ciągłym [30, 41]. Istotną niedogodnością, jaka pojawia się w przypadku stosowania ultrafiltracji w warunkach przemysłowych, jest

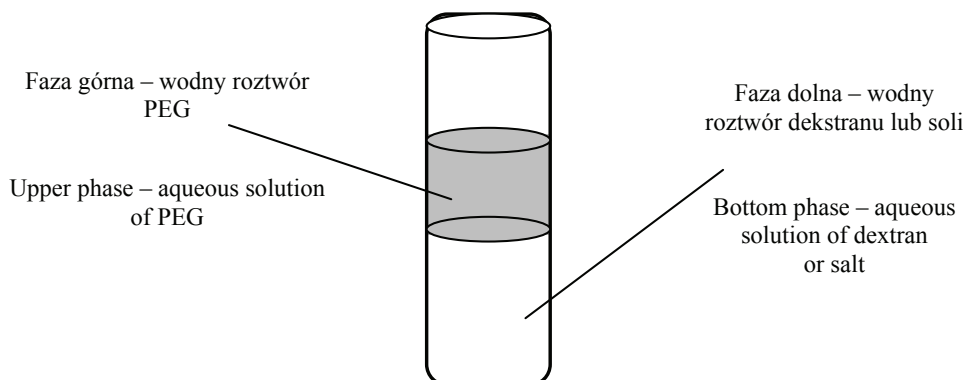
jednak postępujący w czasie spadek jej wydajności. Wielkość ta wyrażona jako strumień objętości filtratu jest bowiem ujemnie skorelowana z szybkością tzw. foulingu oraz tworzenia się warstwy polaryzacyjnej osadu (placka filtracyjnego) na powierzchni przegrody filtracyjnej. Jednocześnie warstwa ta tworzy się tym szybciej, im mniejsza jest szybkość przepływu stycznego nadawy nad membraną i wyższe ciśnienie transmembranowe oraz stężenie białek w zawiesinie [39]. Należy zatem przyjąć, że czas prowadzenia procesu bez przestojów przeznaczonych na regenerację membran jest funkcją stężenia białka w filtrowanym medium. Zgodnie z założeniem omawianej technologii ultrafiltracja ma na celu koncentrację produktu. Można przypuszczać, że w miarę wzrostu stężenia białka we frakcji docelowej zawierającej lizozym (retentat), wydajność procesu separacji będzie gwałtownie maleć, osiągając w chwili całkowitego zapchania stosowanych modułów ultrafiltracyjnych wielkość bliską zeru. Wobec tego prowadzenie produkcji w systemie ciągłym, będzie wymagało takiej konstrukcji układu separacyjnego, która pozwoli na jednoczesną regenerację membran i zagęszczanie produktu. Koszty stosowania procesów membranowych będą tym samym zależne od częstotliwości regeneracji modułów filtracyjnych, co skutkuje wzrostem zużycia wody oraz powstawaniem silnie zasadowego ścieku uciążliwego dla środowiska naturalnego, zawierającego znaczne ilości detergentów. W literaturze przedmiotu można również spotkać doniesienia na temat zastosowania ultrafiltracji do bezpośredniej separacji lizozymu z surowego białka jaja. Według opracowania Leśnierowskiego i Kijowskiego [18] metoda ta jest jednak mało skuteczna. Przy membranach o punkcie odcięcia (*ang. cut-off*) równym $30 \cdot 10^3$ Da odzysk enzymu oraz jego aktywność są zdecydowanie zbyt niskie, wynoszą bowiem odpowiednio 6,23 % oraz 7 408 U/mg. Wzrost wielkości porów w membranie, wyrażony w postaci wspomnianego punktu odcięcia z 30 do $100 \cdot 10^3$ Da, umożliwia zwiększenie stopnia odzysku do około 20 %, przy aktywności specyficznej wynoszącej 12 tys. U/mg. Uzyskany preparat zawiera znaczne ilości innych białek, co czyniło go całkowicie nieprzydatnym do celów komercyjnych, w tym również do zastosowań terapeutycznych.

Przedstawione powyżej problemy wskazują, że separacja lizozymu z białka jaja kurzego jest procesem złożonym, w którym bardzo istotną rolę odgrywają poszczególne operacje jednostkowe. O istotności zagadnień związanych z wyborem odpowiedniej metody separacji może świadczyć fakt, że szacowane koszty związane z izolacją i oczyszczaniem stanowią około 60 - 80 % nakładów ponoszonych na produkcję preparatu, przy czym wielkość ta nie uwzględnia kosztów zakupu surowców [9, 19, 25]. Uzasadnione wydaje się być zatem ciągle poszukiwanie nowych bądź udoskonalanie już istniejących metod.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie możliwości jednej z nowych metod – ekstrakcji lizozymu w wodnych układach dwufazowych, w porównaniu z tradycyjnymi, już stosowanymi w praktyce.

Separacja lizozymu w wodnych układach dwufazowych

Wodne układy dwufazowe (ATPS) tworzone są najczęściej z niemieszających się ze sobą wodnych roztworów dwóch polimerów (np. glikol polietylenowy (PEG)/dekstran) lub roztworu polimeru i soli (np. PEG/fosforany lub siarczany), (rys. 1). W wodnych układach dwufazowych typu PEG/dekstran stężenie polimerów w obu fazach wynosi zazwyczaj 10 - 20 %. W układach składających się z PEG i soli, wodny roztwór glikolu polietylenowego (faza górna) ma zwykle stężenie 20 - 30 %, natomiast fosforany lub siarczany w fazie dolnej stężenie 10 - 15 % [27]. Z uwagi na to, że zawartość wody w ATPS wynosi zazwyczaj 80 - 95 %, układy te nie powodują denaturacji białek [18].



Rys. 1. Schemat tradycyjnych wodnych układów dwufazowych.

Fig. 1. The scheme of traditional aqueous two-phase systems.

Zachowanie się separowanych cząsteczek w ATPS podlega takim samym prawom, jak w ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Obowiązuje więc tutaj zasada selektywnego rozpuszczania się separowanej substancji w fazach tworzących układ, wynikająca z jej różnego powinowactwa do określonej z faz, co wyraża się współczynnikiem podziału substancji pomiędzy fazy. W odniesieniu do białek, wielkość ta jest zależna od właściwości ekstrahowanego białka (hydrofobowość, ładunek elektryczny, kształt i masa cząsteczkowa), a także od rodzaju układu [2]. Zaletą wodnych układów dwufazowych jest duża łatwość modyfikacji współczynnika podziału separowanej substancji przez zmianę warunków separacji. Wielkość współczynnika podziału zależy m.in. od rodzaju polimeru zastosowanego do separacji, jego masy cząsteczkowej, pH i obecności soli w układzie. W przeciwieństwie do innych metod oczyszczania (np. chromatografii), skala separacji białek w wodnych układach dwufazowych łatwo się powiększa od objętości stosowanych w laboratorium do wielkości przemysłowych. Na przykład stwierdzono, że wydajność odzysku białek i wielkości współczynników

podziału były identyczne w układach o objętości 10 ml i 1200 litrów [31, 34]. Wodna ekstrakcja dwufazowa nie wymaga także inwestycji w bardzo kosztowną i skomplikowaną aparaturę. Proces oczyszczania białek tą metodą jest bardzo prosty i wygodny, dzięki czemu można uzyskać duże oszczędności nakładów pracy i zużytej energii. Pomimo tych niewątpliwych zalet, wodne układy dwufazowe nie są powszechnie stosowane w praktyce przemysłowej. Głównymi przyczynami są: brak wystarczających informacji na temat potencjalnych możliwości tej metody oraz niedostateczne zrozumienie mechanizmów związanych z formowaniem wodnych układów dwufazowych i podziałem separowanej substancji pomiędzy poszczególne fazy [31].

Podstawowy koszt ekstrakcji omawianą metodą stanowią odczynniki. W związku z tym, układy zawierające bardzo kosztowny dekstran (np. układ PEG/dekstran) stosowane są w procesach oczyszczania jedynie w skali laboratoryjnej [13, 20]. Dekstran próbuje się zastępować innymi, tańszymi polimerami, np. modyfikowaną skrobią i jej syntetycznymi pochodnymi [28, 37]. W literaturze przedmiotu podkreśla się jednak, że z powodu najniższych kosztów odczynników tworzących wodny układ dwufazowy, najkorzystniej jest stosować w dużej skali układy typu PEG/sól [1]. Najczęściej stosuje się ATPS typu PEG/fosforany [31]. Układ ten wykorzystano do separacji m.in. glukoamylazy, α -laktoalbuminy czy albuminy surowicy bydłowej [24, 32, 22]. Rzadziej są stosowane wodne układy dwufazowe typu PEG/siarczany czy PEG/cytryniany [12, 21].

Ratajczak i wsp. [29] zastosowali układ typu PEG/fosforany do separacji lizozymu z białka jaja kurzego. W trakcie ekstrakcji lizozym został zagęszczony 15-krotnie, a aktywność otrzymanego preparatu lizozymu wynosiła blisko 15 000 U/mg i była nieco wyższa od aktywności preparatu uzyskanego w trakcie ultrafiltracji na membranach o punkcie odcięcia $100 \cdot 10^3$ Da. Z kolei, Su i Chiang [35] do izolacji lizozymu z rozcieńczonego białka jaja kurzego wykorzystali układ typu PEG/siarczany. Wydajność procesu ekstrakcji wyniosła 70 %, a uzyskany preparat wykazywał aktywność 39 500 U/mg.

Lizozym zawiera stosunkowo dużo tryptofanu, dlatego podczas ekstrakcji w układach typu PEG/sól migruje on selektywnie do bardziej hydrofobowej fazy glikolu polietylenowego [20]. Po separacji, zagęszczony preparat lizozymu zawiera znaczną ilość glikolu polietylenowego, który można usunąć dopiero w kolejnych etapach oczyszczania za pomocą technik chromatograficznych lub membranowych. Zwiększa się jednak wtedy całkowity koszt procesu. Z tego powodu, ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych typu PEG/sól jest często stosowana jako wstępna metoda zagęszczania i oczyszczania białek [16].

Obiecującym sposobem przezwyciężenia tych niedogodności może być zastosowanie do separacji lizozymu wodnych układów dwufazowych zawierających termoseparujące polimery. W ciągu ostatnich lat obserwuje się duży wzrost liczby prac badaw-

czych, w których wykorzystano termoseparujące polimery do izolacji białek w wodnych układach dwufazowych [31]. Najczęściej stosowano termoseparujące kopolimery oksyetylenu (EO) i oksypropylenu (PO). Wodne roztwory tych polimerów, po podgrzaniu powyżej tzw. temperatury mętnienia, rozdzielają się na dwie fazy: wodę i zagęszczony polimer. Na przykład, temperatura mętnienia popularnego EO50PO50, który zawiera 50 % oksyetylenu i 50 % oksypropylenu, wynosi ok. 50 °C. Można więc wykonać indukowaną termicznie separację lizozymu bez ryzyka utraty jego aktywności, ponieważ enzym ten jest termostabilny, nawet w znacznie wyższej temperaturze. Temperatura mętnienia tego rodzaju polimerów podlega jednak pewnym modyfikacjom. Zgodnie z danymi literaturowymi, jej wielkość jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości reszt oksypropylenowych oraz stężenia niektórych soli rozpuszczonych w układzie dwufazowym [27].

W badaniach modelowych obserwowano migrację czystego lizozymu lub w mieszaninie z albuminą surowicy bydłowej w wodnych układach dwufazowych złożonych z EOPO o różnej zawartości oksyetylenu i oksypropylenu w cząsteczce oraz dekstranu lub modyfikowanej skrobi [14, 27, 36]. Ekstrakcja odbywała się w dwóch etapach. W pierwszym etapie, w tzw. pierwotnym układzie dwufazowym, lizozym selektywnie migrował do górnej fazy bogatej w EOPO. W drugim etapie oddzielano EOPO od dolnej fazy bogatej w dekstran lub skrobię, a następnie podwyższano temperaturę roztworu EOPO. W wyniku indukowanej termicznie separacji uzyskiwano wtórny układ dwufazowy złożony z wodnego roztworu lizozymu w górnej fazie i stężonego EOPO w dolnej (rys. 2). W cytowanych pracach szczegółowo opisano warunki formowania układów dwufazowych typu termoseparujący polimer - inny polimer. Stwierdzono m.in., że białka, które w trakcie separacji w pierwotnym układzie dwufazowym migrowały do fazy bogatej w termoseparujący polimer, po termoseparacji przechodziły w całości do fazy wodnej. Po termoseparacji, zagęszczony polimer nie zawierał więc żadnych białek i mógł być wielokrotnie użyty do wytworzenia pierwotnego układu dwufazowego [14].

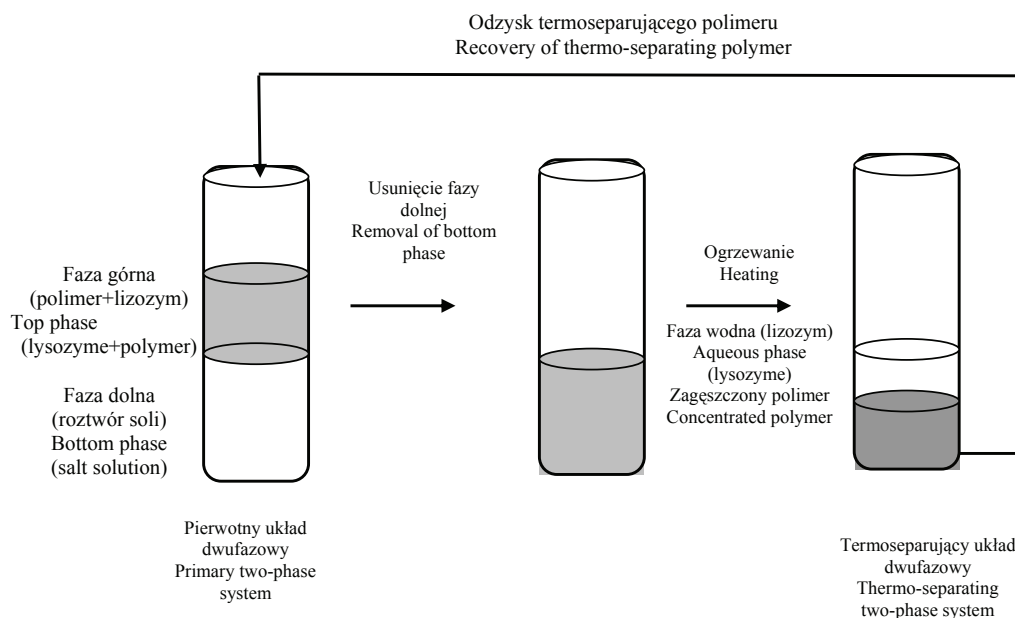
Separacja lizozymu jest więc skuteczna, jeśli współczynniki podziału tej substancji w pierwotnym układzie dwufazowym są bardzo wysokie. Oznacza to jego selektywną migrację do górnej fazy zawierającej EOPO. Tymczasem Johansson i wsp. [14] w układzie złożonym z dekstranu T500 oraz EO50PO50 lub EO30PO30 uzyskali współczynniki podziału lizozymu niewiele wyższe od jedności, co oznaczało prawie równomierny rozkład jego stężeń w obu fazach. Współczynniki podziału zwiększały się, gdy do omówionych układów wprowadzano różne sole (NaCl, NaI, NaClO₄). Najlepsze rezultaty uzyskano przy stosowaniu układów zawierających NaClO₄, w których współczynnik podziału osiągał 10. Svensson i wsp. [36] uzyskali podobne wyniki, gdy do pierwotnego układu dwufazowego o pH 3,1 dodano NaClO₄. Dolną fazę także tworzył dekstran T500, natomiast termoseparującym polimerem w górnej fazie był Pluro-

nic, kopolimer zbudowany z naprzemiennie ułożonych trzech bloków: poli-EO, poli-PO i ponownie poli-EO. Z kolei, dodatek do układu innych substancji (fosforan sodu, octan sodu, kwas glutaminowy, alanina) okazał się niecelowy, ponieważ współczynnik podziału lizozymu obniżał się poniżej jedności. W górnej fazie zawierającej Pluronic obserwowano więc niższe stężenie izolowanego enzymu w porównaniu z dolną fazą dekstranu. Można przypuszczać, że wydajność izolacji była niewielka, gdyż jedynie lizozym obecny w górnej fazie mógł być przeniesiony do fazy wodnej w trakcie indukowanej termicznie separacji polimeru. Podobną zależność w układzie EO50PO50-skrobia hydroksypropylova obserwowali Persson i wsp. [27]. W pierwotnym układzie z dodatkiem NaClO_4 , wyższe stężenie lizozymu występowało w fazie zawierającej termoseparujący polimer (współczynnik podziału około 6). Gdy jednak NaClO_4 zastąpiono innym związkiem (NaCl), lub do separacji zastosowano układ dwufazowy nie zawierający żadnych soli, lizozym migrował selektywnie do fazy dolnej zawierającej modyfikowaną skrobię. W żadnej z omawianych prac autorzy nie podali jednak, jaka była wydajność odzysku lizozymu w badanych próbach. Trudno więc ocenić, jaka jest praktyczna przydatność tego typu układów do ekstrakcji lizozymu ze złożonej mieszaniny białek w większej skali.

Białas i wsp. [4] zbadali separację lizozymu w dwufazowym układzie ekstrakcyjnym EOPO/fosforany w warunkach modelowych. Autorzy zastosowali statystyczną metodę płaszczyzny odpowiedzi w celu optymalizacji parametrów separacji, gdzie czynnikami optymalizowanymi były: stężenie EOPO, fosforanów oraz NaCl , a także pH roztworu fosforanów. Określono wpływ tych czynników na współczynnik podziału oraz wydajność odzysku lizozymu w układzie pierwotnym oraz po termoseparacji EOPO w fazie górnej układu pierwotnego.

Opracowane wcześniej optymalne warunki separacji lizozymu w układzie dwufazowym EOPO/fosforany [4], zostały wykorzystane do izolacji lizozymu z białka jaja kurzego [7, 8]. Aktywność właściwa uzyskanych preparatów lizozymu wynosiła 35 000 - 40 000 U/mg białka, zaś maksymalna wydajność odzysku białka nawet 90 %. Dodatkowo zwiększono skalę procesu ekstrakcji lizozymu w ten sposób, że objętość wprowadzanego do układu dwufazowego białka jaja kurzego wynosiła do 1/3 całkowitej objętości układu dwufazowego. Ogromną zaletą zastosowanego układu EOPO/fosforany była możliwość wielokrotnego wykorzystania zarówno polimeru EOPO (odzyskanego w trakcie termoseparacji), jak i fosforanów. Zwiększająca się w trakcie kolejnych ekstrakcji ogólna zawartość białka w ponownie wykorzystywanym roztworze fosforanów, wynikająca z gromadzenia się w nim innych białek jaja, nie była czynnikiem wpływającym negatywnie na proces ekstrakcji lizozymu. Wykorzystanie termoseparujących polimerów oraz tanich soli w miejsce często stosowanego, lecz kosztownego dekstranu, może więc w przyszłości umożliwić zastosowanie eks-

trakcji w wodnych układach dwufazowych do separacji i oczyszczania lizozymu oraz innych białek na skalę przemysłową.



Rys. 2. Schemat metody ekstrakcji lizozymu w wodnym układzie dwufazowym zawierającym termoseparujący polimer.

Fig. 2. Diagram of extraction method of lysozyme in aqueous two-phase system containing thermo-separating polymer.

Podsumowanie

Z punktu widzenia skuteczności separacji, łatwości powiększania skali procesu i biokompatybilności, dwufazowa ekstrakcja wodna jest prostą i wydajną metodą do separacji białek z układów złożonych. Ekstrakcja w dwufazowych roztworach wodnych jest w wielu przypadkach alternatywą dla istniejących technologii, szczególnie na początkowym etapie wielkoskalowej izolacji białek. Przy właściwej optymalizacji umożliwia jednoczesne separowanie, zagęszczanie i oczyszczanie, zmniejszając w ten sposób liczbę operacji jednostkowych i poprawiając wydajność i ekonomikę procesu. Niezależnie od tego, jej powszechne zastosowanie zależy od lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów rządzących zachowaniem się separowanych substancji w układzie dwufazowym oraz empirycznego ustalenia warunków operacyjnych.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2009 jako projekt badawczy (projekt Nr N312 057 32/2844).

Literatura

- [1] Asenjo J.A., Chaudhuri J.W.: Innovative separation methods in bioprocessing. In: Separation processes in the food and biotechnology industries - ed. by A.S. Grandison, M.J. Lewis. Woodhead Publ. Ltd., Cambridge 1996, pp. 179-206.
- [2] Asenjo J.A., Turner R.E., Mistry S.L., Kaul A.: Separation and purification of recombinant proteins from *E. coli* using aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. A*, 1994, **668**, 129-137.
- [3] Baldridge G.D., Kurtti T.J., Munderloh U.G.: Susceptibility of *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia peacockii* to cerropin A, ceratotoxin A and lysozyme. *Curr. Microbiol.*, 2005, **51**, 233-238.
- [4] Białas W., Dembczyński R., Regulski K., Jankowski T.: Optymalizacja warunków separacji lizozymu w układzie dwufazowym EOPO/fosforany. *Mat. III Krajowego Kongresu Biotechnologii nt. „Biotechnologia – człowiek i środowisko, Poznań 2007*, s. 167.
- [5] Chang H.-M., Yang C.-C., Chang Y.-C.: Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 161-164.
- [6] Codex General Standard for Food Additives, 2007, <http://www.codexalimentarius.net>
- [7] Dembczyński R., Białas W., Regulski K., Jankowski T.: Wielokrotne wykorzystanie składników układu dwufazowego EOPO/fosforany w procesie ekstrakcji lizozymu z białka jaja kurzego. *Mat. III Krajowego Kongresu Biotechnologii nt. „Biotechnologia – człowiek i środowisko”*, Poznań 2007, s. 166.
- [8] Dembczyński R., Białas W., Regulski K., Jankowski T.: Wykorzystanie termoseparujących polimerów do ekstrakcji białka z układów złożonych na przykładzie lizozymu. *Mat. I Sympozjum Inżynierii Żywności, Warszawa 2008*, s. 120.
- [9] Dyr J.E., Suttner J.: Separation used for purification of recombinant proteins. *J. Chromatogr. B*, 1997, **699**, 383-401.
- [10] Guérin-Dubiard C., Pasco M., Hietanen A., Quiros del Bosque A., Nau F., Croguennec T.: Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2005, **1090**, 58-67.
- [11] Han J.H.: Antimicrobial food packaging. *Food Technol.*, 2000, **54**, 56-65.
- [12] Harris D.P., Andrews, A.T., Wright G., Pyle D.L., Asenjo J.A.: The application of aqueous two-phase systems to the purification of pharmaceutical proteins from transgenic sheep milk. *Bioseparation*, 1997, **7**, 31-37.
- [13] Johansson G., Reczey K.: Concentration and purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. *J. Chromatogr. B*, 1998, **711**, 161-172.
- [14] Johansson H.-O., Lundth G., Karlstrom G., Tjerneld F.: Effects of ions on partitioning of serum albumin and lysosyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1290**, 289-298.
- [15] Jolle's P., Jolle's J.: What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.*, 1984, **63**, 165-189.
- [16] Kepka C., Collet E., Roos F., Tjerneld F., Veide A.: Two-step recovery process for tryptophan tagged cutinase: Interfacing aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2005, **1075**, 33-41.
- [17] Kopeć W., Chrzanowska J., Karkoszka K., Lorenc J., Polanowski A., Szalak T., Trziszka T.: Sposób otrzymywania preparatu soli lizozymu. *BUP*, 2000, 15 (693).
- [18] Leśniewski G., Kijowski J.: Otrzymywanie lizozymu z białka jaja kurzego metodą bezpośredniej ultrafiltracji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **2 (23)**, 60-69.
- [19] Lienqueo M.E. and Asenjo J.A.: Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. *Comput. Chem. Engng.*, 2000, **24**, 2339-2350.

- [20] Lu M., Tjerneld F.: Interaction between tryptophan residues and hydrophobically modified dextran. Effect on partitioning of peptides and proteins in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. A*, 1997, **766**, 99-108.
- [21] Marcos J.C., Fonseca L.P., Ramalho M.T. and Cabral J.M.S.: Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase ratio in poly(ethyleneglycol)-sodium citrate aqueous two phase systems. *J. Chromatogr. B*, 1998, **711**, 295-299.
- [22] Mattiason B.: Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology. *Trends in Biotechnol.*, 1983, **1** (1), 16-21.
- [23] Mecitoğlu C., Yemencioğlu A., Arslanoğlu A., Elmaci Z.S., Korel F., Çetin A.E.: Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Res. Int.*, 2006, **39**, 12-21.
- [24] Minami N.M., Kilikian B.V.: Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. *J. Chromatogr. B*, 1998, **711**, 309-312.
- [25] Owen R.O., Chase H.A.: Direct purification of lysozyme using continuous counter-current expanded bed adsorption. *J. Chromatogr. A*, 1997, **757**, 41-49.
- [26] Panfil-Kuncewicz H.: Charakterystyka lizozymu i możliwości jego zastosowania w przemyśle spożywczym. *Żyw. Człow. Metab.*, 1988, **15**, 218-222.
- [27] Persson J., Kaul A., Tjerneld F.: Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. *J. Chromatogr. B*, 2000, **743**, 115-126.
- [28] Pietruszka N., Galaev I.Y., Kumar A., Brzozowski Z.K., Mattiasson B.: New polymers forming aqueous two-phase polymer systems. *Biotechnol. Prog.*, 2000, **16**, 408-415.
- [29] Ratajczak P., Białas W., Dembczyński R., Grajek W., Jankowski T.: Ekstrakcja dwufazowa lizozymu z białka jaja kurzego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40), 40-52.
- [30] Ripperger S., Altmann J.: Crossflow microfiltration – state of the art. *Sep. Purif. Technol.*, 2002, **26**, 19-31.
- [31] Rito-Palomares M.: Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *J. Chromatogr. B*, 2004, **743**, 3-11.
- [32] Rito-Palomares M., Dale C., Lyddiat A.: Generic application of an aqueous two phase process for protein recovery from animal blood. *Process. Biochem.*, 2000, **35**, 655-673.
- [33] Rito-Palomares M., Hernandez M.: Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, 1998, **711**, 81-90.
- [34] Selber K., Tjerneld F., Collen A., Hyytia T., Setälä., Bailey M., Fagerstrom R., Kann J., van der Laan J., Penttilä M., Kula M.-R.: Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process. Biochem.*, 2004, **39**, 889-896.
- [35] Su C.-K., Chiang B.H.: Partitioning and purification of lysosyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process. Biochem.*, 2006, **41**, 257-263.
- [36] Svensson M., Berggren K., Veide A., Tjerneld F.: Aqueous two-phase systems containing self-associating block copolymers. Partitioning of hydrophilic and hydrophobic biomolecules. *J. Chromatogr. A*, 1999, **839**, 71-83.
- [37] Venancio A., Almeida C., Teixeira J.A.: Enzyme purification with aqueous two-phase systems: comparison between systems composed of pure polymers and systems composed of crude polymers. *J. Chromatogr. B*, 1996, **680**, 131-136.
- [38] Veronesi P.A., Rodriguez P.E.A.: Use of modified lysozyme C to prepare medicinal compositions for the treatment of some serious diseases. United States Patent: 7,012,062, March 14, 2006.
- [39] Wakeman R.J., Williams C.J.: Additional techniques to improve microfiltration. *Sep. Purif. Technol.*, 2002, **26**, 3-18.

- [40] Wang S., Bung T., Chen T., Lin D., Wu J., Rao P., Ye X.: First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **327**, 820-827.
- [41] Yuen C.C., Santosh A., Gupta K., Ray A.K.: Multi-objective optimization of membrane separation modules using genetic algorithm. *J. Membr. Sci.*, 2000, **176**, 177-196.
- [42] Zimecki M., Artym J.: Właściwości terapeutyczne białek i peptydów z siary i mleka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005, **59**, 309-323.

APPLICATION OF AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION TO SEPARATE LYSOZYME FROM HEN EGG WHITE

S u m m a r y

The increasing demands of consumers cause the manufacturers of food to be more and more interested in replacing commonly used chemical preservatives with natural antimicrobial substances. Among various natural antimicrobial substances, the lysozyme is characterized by properties inhibiting the growth of many pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus* and *Streptococcus*. Different methods can be applied to separate lysozyme from hen egg white in order to obtain its commercial preparations; however, only a few have been already implemented in the industrial-scale production. They are: repeated salt precipitation and crystallization, direct ultrafiltration and ion-exchange chromatography. Recently, in the expert literature, information has been published referring to researches into the lysozyme extraction from hen egg white using aqueous two-phase systems (ATPS) such as polyethylene glycol (PEG)/salt solution. As compared to other separation and purification techniques of egg white, the application of aqueous two-phase systems is characterized by the following: short time of separation process, low energy consumption, the extraction process progresses under the conditions causing no denaturation of proteins, and a possibility to relatively easily scale-up the entire process. However, in the system composed of polyethylene glycol (PEG) and salt solution, the lysozyme preferentially migrates to the PEG-rich top-phase, and, therefore, it is difficult to subsequently recover this enzyme. The process of separating lysozyme in ATPSs can be simplified and made more efficient if a thermo-separating polymer is used instead of polyethylene glycol (PEG). The thermo-separating polymer is composed of ethylene oxide-propylene oxide (EOPO) forming the top phase in the two-phase systems with salt solutions forming the bottom phase. In this two-phase system, the EOPO polymer is separated from the aqueous solution of the purified lysozyme during a thermo-separation process of the polymer, which can be repeatedly applied just as the salt solution left after the first stage of the two-phase extraction.

Key words: lysozyme, purification of proteins, two-phase extraction, thermo-separating polymers 