

ŁUKASZ BOBAK, TERESA SKIBA, WIESŁAW KOPEĆ

ZASTOSOWANIE TECHNIK MEMBRANOWYCH DO POZYSKIWANIA NISKOCZĄSTECZKOWYCH PROTEIN BIAŁKA JAJA KURZEGO

Streszczenie

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania membranowych technik filtracyjnych do częściowego rozdzielenia niskocząsteczkowych protein białka jaja kurzego. Proteiny te wykazują aktywność biologiczną lizozymu – enzymu muramidazy o masie cząsteczkowej $143 \cdot 10^2$ Da oraz inhibitora proteinaz cysteinowych – cystatyny o masie cząsteczkowej $126 \cdot 10^2$ Da. Proces mikrofiltracji natywnego białka jaja oraz jego roztworów, sporządzonych z udziałem 0,15 M NaCl (w stosunku 1:1 i 1:4), przeprowadzono techniką cross-flow, przy użyciu filtra rurkowego wykonanego z polipropylenu o nominalnym rozmiarze porów 0,2–0,6 μm . W uzyskanych filtratach oznaczono aktywność lizozymu i cystatyny (jako zdolność do inhibowania proteinazy cysteinowej – papainy) i ustalono, że odzyskano od 60 do 80% aktywnych substancji niskocząsteczkowych. Zasadnicze znaczenie dla efektywności procesu miało zjawisko tworzenia warstwy białkowej na membranie (polaryzacja stężeniowa – fouling), powodujące spadek szybkości filtracji. Jednak warstwa ta przyczyniała się do poprawy wzbogacenia permeatów w niskocząsteczkowe substancje aktywne. Po przefiltrowaniu ponad 20–30% objętości przetwarzanego białka jaja uzyskano znaczący przyrost aktywności cystatyny względem roztworu wyjściowego.

Słowa kluczowe: filtracja membranowa, lizozym, cystatyna

Wprowadzenie

W procesach membranowych, stosowanych do rozdzielenia biopolimerów na podstawie różnic ich mas cząsteczkowych, najczęściej wykorzystywane są techniki mikrofiltracji (MF) i ultrafiltracji (UF). W procesach ultrafiltracji stosuje się membrany o przepuszczalności cząstek do 100 nm i ciśnienia do 1 MPa, natomiast w procesie mikrofiltracji membrany o wyższej przepuszczalności i niższe ciśnienia [6].

Techniki membranowe są wykorzystywane w przetwórstwie jajczarskim do usunięcia wody z białka jaja przed procesem suszenia, co jest dwukrotnie tańsze niż jej

odparowanie w wieżach suszarniczych [8]. Podjęto także próby zastosowania membran w procesach frakcjonowania białka jaja [1]. Zastosowanie membran do separacji protein niskocząsteczkowych białka jaja było przedmiotem szeregu badań skupiających się głównie na izolacji lizozymu – enzymu o aktywności muramidazy, ale również cystatyny – inhibitora proteinaz cysteinowych [1, 2, 3, 4].

Optymalizację procesu prowadzono głównie w zakresie: doboru przepuszczalności membran, tzw. punktu odcięcia molekularnego (cut off), warunków pH, siły jonowej, itp. W mniejszym stopniu analizowano warunki techniczne procesu, wyznaczające możliwość jego przebiegu w warunkach przemysłowych, szczególnie kwestię polaryzacji stężeniowej membran (fouling), decydującej o efektywności filtracji. Przyczyną foulingu jest tworzenie się, w bezpośrednim sąsiedztwie membrany, warstwy granicznej roztworu o wyższym stężeniu separowanych składników (białka) [6]. Zasadniczym efektem zjawiska foulingu jest spadek szybkości filtracji, aż do jej zaniku. Przeciwdziałać polaryzacji membran można poprzez: wprowadzenie dodatkowej ilości rozpuszczalnika do nadawy (roztworu zasilającego moduł filtracyjny), zastosowanie turbulentnego przepływu lub intensywnego mieszania nadawy [6].

W celu wydzielenia składnika niskocząsteczkowego z mieszaniny np. białek wykorzystuje się diafiltrację, polegającą na ciągłym uzupełnianiu retentatu rozpuszczalnikiem w miarę uzyskiwania filtratu (permeatu) wzbogaconego w izolowany składnik. Można również zwiększać stężenie określonego składnika w permeacie przez filtrację rozcieńczonej nadawy.

Filtracja białka jaja bez rozcieńczenia, w celu jego frakcjonowania i rozdzielenia białek, może być przeprowadzona z użyciem membran mikrofiltracyjnych, gdyż m.in. ze względu na dużą lepkość strukturalną białka membrany ultrafiltracyjne szybko ulegają polaryzacji.

W badaniach, w których zastosowano technikę mikrofiltracji, do rozdzielenia roztworów białka, rozcieńczonych w stosunku od 1:1 do 1:8, użyto membrany o porowatości od 0,2 do 0,6 μm , odzyskując w permeacie od 20 do blisko 40% aktywnego lizozymu [1, 4]. Czystość preparatów była zależna od przepuszczalności membran. Zastosowanie membrany o punkcie odcięcia ok. $300 \cdot 10^3 \text{ Da}$ znacząco (około 4–5 krotnie) zwiększyło aktywność właściwą lizozymu wyrażoną na jednostkę masy białka. Zastosowanie membran o jeszcze mniejszej przepuszczalności wydatnie zwiększa czystość preparatów, ale straty białka są duże. Użycie membrany mikrofiltracyjnej pozwala natomiast zdecydowanie zwiększyć ilość uzyskiwanych substancji biologicznych, przy małej czystości uzyskiwanych preparatów białka. Działanie to jest celowe wówczas, gdy preparaty, np. do celów farmaceutycznych, będą nadal oczyszczane innymi technikami.

Celem przeprowadzonych badań była próba zastosowania i optymalizacji warunków procesu mikrofiltracji do odzysku aktywnych biologicznie substancji niskoczą-

steczkowych białka jaja w formie preparatów o małym stopniu oczyszczenia. Założono prowadzenie procesu przy niskim stopniu rozcieńczenia białka jaja z ewentualnym zastosowaniem dodatkowej diafiltracji.

Material i metody badań

Surowcem do badań było białko świeżych jaj kurzych od niosek rasy Tetra SL żywionych standardowo. Przed przeprowadzeniem właściwego procesu białko poddawano wstępnej filtracji przez lejek Schotta o średnicy otworów 1 mm w celu uzyskania homogennego materiału. Następnie białko nierozcieńczone lub rozcieńczone 0,15 M roztworem NaCl poddawano procesowi mikrofiltracji krzyżowej (cross-flow) niskociśnieniowej ($50 \cdot 10^3$ Pa), z wykorzystaniem rurkowego polipropylenowego modułu filtracyjnego o nominalnej średnicy porów 0,2–0,6 μm zintegrowanego z pompą perystaltyczną typu BIO FLOW 2000 Mk II™. Zastosowany typ pompy perystaltycznej wyposażonej w regulator natężenia przepływu i ciśnienia podawanej nadawy pozwolił na kontrolowanie parametrów procesu. Jednorazowo poddawano filtracji 1 dm³ białka lub jego roztworów o pH = 8,8.

Podczas prowadzenia procesu monitorowano spadek ilości strumienia filtratu w czasie oraz zbierano frakcje stanowiące 10% objętości nadawy (surowca wyjściowego).

Dobór warunków procesu filtracji, szczególnie w zakresie stopnia rozcieńczenia białka jaja oraz przeprowadzenia procesu diafiltracji, opracowano w badaniach wstępnych. Założono, że proces prowadzony będzie bądź do ustania filtracji (strumień permeatu = 0) wynikającego z polaryzacji membran lub do odfiltrowania całej ilości danego roztworu NaCl. W związku z powyższym realizowano trzy niezależne warianty doświadczenia:

- Filtracja białka jaja (pH=8,8) do uzyskania 30% permeatu (w stosunku do wyjściowej ilości surowca) oraz diafiltracja po dodaniu 30% 0,15 M roztworu NaCl prowadzona do uzyskania 30% permeatu;
- Filtracja białka jaja rozcieńczonego 0,15 M roztworem NaCl w stosunku 1:1 do uzyskania 50% permeatu (w stosunku do wyjściowej ilości surowca) oraz diafiltracja po dodaniu 50% 0,15 M roztworu NaCl prowadzona do uzyskania 50% permeatu,
- Filtracja białka jaja rozcieńczonego 0,15 M roztworem NaCl w stosunku 1:4 do uzyskania 80% permeatu (w stosunku do wyjściowej ilości surowca). W surowcu wyjściowym i uzyskiwanych frakcjach filtratów oznaczano stężenie białka, aktywność lizozymu oraz cystatyny.

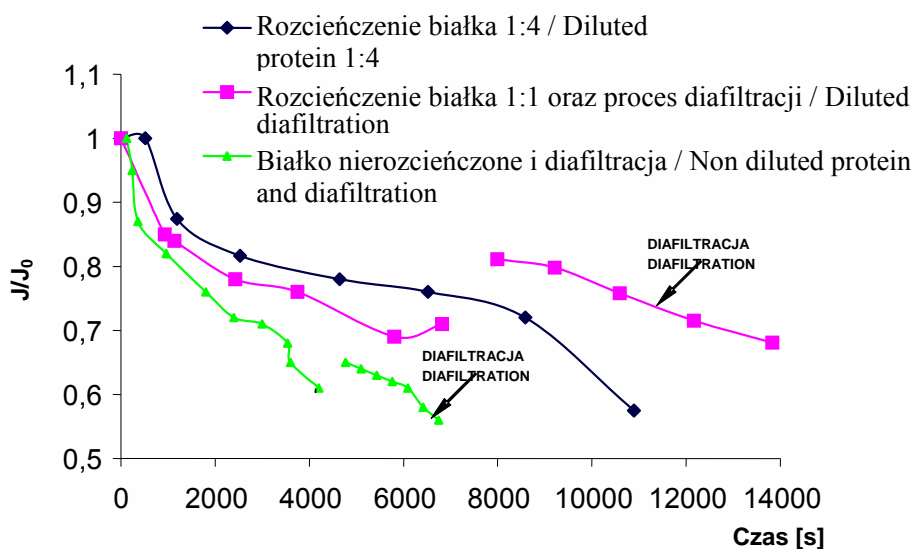
Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie metodą biuretową przy długości fali $\lambda = 540$ nm.

Aktywność lizozymu oznaczano metodą spektrofotometryczną – turbidymetryczną poprzez pomiar dynamiki zmiany zmętnienia zawiesiny bakterii *Micrococcus lysodeicticus*. Oznaczenie prowadzono w stałej temp 25°C przy długości fali $\lambda = 450$ nm, określając spadek absorbancji w ciągu 6 min [5].

Aktywność cystatyny oznaczano jako zdolność inhibowania aktywności papainy wobec syntetycznego substratu BANA [7]. Jednostka aktywności inhibicyjnej odpowiada 1 jednostce aktywności enzymatycznej papainy, czyli ilości enzymu, który hydrolizuje 1,0 mM substratu w ciągu 1 min, w standardowych warunkach (37°C).

Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono przebieg procesu filtracji pełnego białka jaja i jego rozтворów, wyrażony względnym spadkiem szybkości, w stosunku do wartości wyjściowej, strumienia filtratu J_0 . W wyniku filtracji nierozcieńczonego białka jaja po uzyskaniu permeatu w ilości około 30% wyjściowej nadawy, nastąpiła silna polaryzacja stężeniowa membrany, a natężenie strumienia filtratu osiągało wartość 0 (spadek oznaczono pionową kreską na rys. 1).



Rys. 1. Względny spadek szybkości filtracji [J/J_0] w stosunku do wyjściowego strumienia filtratu J_0 .

Fig. 1. A relative decrease in the filtration rate compared with the initial permeate flux (J/J_0).

W celu dalszego odzyskania substancji aktywnych, również z warstwy białkowej wydzielonej na membranie, wprowadzono do koncentratu 30% 0,15 M roztworu NaCl i proces prowadzono do uzyskania objętości permeatu w ilości odpowiadającej dodatkowemu roztworowi. Po rozcieńczeniu białka jaja w stosunku 1:1 dynamika spadku war-

tości filtracji była mniejsza niż w przypadku białka nierozcieńczonego. Chociaż nastąpiło zmniejszenie strumienia filtratu do wartości ok. 0,7 (w porównaniu ze strumieniem wyjściowym), proces filtracji został doprowadzony do końca, co umożliwiło wydzielenie permeatu w ilości równoważnej do roztworu NaCl użytego do rozcieńczenia białka (50%). Zastosowanie procesu diafiltracji pozwoliło na zwiększenie wielkości względnej strumienia filtratu powyżej 0,8, ale cały proces był około 2-krotnie dłuższy niż w przypadku białka nierozcieńczonego (rys. 1). Najmniejszy spadek w procesie filtracji występował po rozcieńczeniu białka w stosunku 1:4 (prowadzący do uzyskania 80% permeatu). Tym niemniej spadek prędkości względnej strumienia był zbliżony do wartości łącznej filtracji i diafiltracji białka nierozcieńczonego, a czas procesu był około 50% dłuższy (rys. 1).

Zastosowanie membrany mikrofiltracyjnej umożliwia uzyskanie dużych szybkości filtracji, ale wpływa na zwiększenie ilości białek przechodzących do permeatu. W wyniku łącznego procesu filtracji i diafiltracji białka niepoddanego wstępnemu rozcieńczaniu do permeatu przeszło ok. 15% wyjściowej ilości protein (tab. 1). Po rozcieńczeniu białka w stosunku 1:1 i ponownym procesie jego diafiltracji (łączna ilość wprowadzonego roztworu NaCl odpowiadająca dwukrotnej objętości białka) ilość białka oznaczona w permeatach odpowiadała ok. 20% jego wyjściowej zawartości. Natomiast przy rozcieńczeniu 1:4 odfiltrowano aż ok. 40% wyjściowej ilości protein (tab. 1).

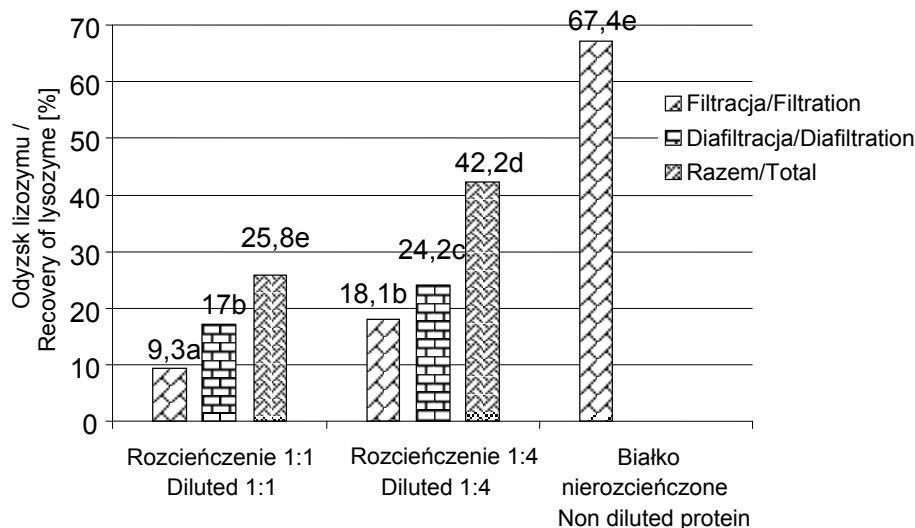
Przy zastosowaniu technik ultrafiltracyjnych ilości białka odzyskanego w permeatach wynoszą ok. 10% [1], co jest zbliżone do wyników własnych uzyskanych w badaniach białka nierozcieńczonego i poddanego diafiltracji. Zastosowanie membran ultrafiltracyjnych o przepuszczalności $100 \cdot 10^3$ – $300 \cdot 10^3$ Da prowadzi do kilkukrotnego lub nawet wyższego wzrostu aktywności specyficznej lizozymu [1, 4]. W badaniach własnych, pomimo wysokiego stopnia odzyskania aktywnego lizozymu w permeatach, sięgającego od 27 do 67%, jego aktywność właściwa jest tylko co najwyżej 2- do 3-krotnie wyższa niż w surowcu wyjściowym (rys. 2), o czym decyduje wysoka przepuszczalność membrany. Nie odnotowano zasadniczego wpływu stopnia rozcieńczenia białka na tę zależność. Należy jednak podkreślić, że oznaczone aktywności lizozymu w uzyskanych diafiltratach były wyższe niż w pierwotnym procesie filtracji (tab. 1). Wydaje się, że zastosowane w badaniach własnych warunki nie sprzyjają rozkładowi kompleksów lizozymu z innymi białkami bądź też należy zastosować zwiększenie prędkości liniowej retentatu, co może prowadzić do zrywania warstwy białkowej i umożliwiać transport lizozymu przez membranę. Należy jednak podkreślić, że w przypadku filtracji białka nierozcieńczonego oraz rozcieńczonego w stosunku 1:1, i następujących po nich diafiltracji, otrzymane filtry mogą być bezpośrednio wykorzystane do wydzielania z nich lizozymu metodą chromatografii jonowymiennej, a straty białka sięgają tylko 15–20%.

Tabela 1

Charakterystyka procesu filtracji w zależności od stopnia rozcieńczenia białka jaj.
 Profile of the filtration process depending on the egg white dilution ratio.

Białko nierozcieńczone / Non-diluted protein			Białko rozcieńczone / Diluted protein 1:1				Białko rozcieńczone / Diluted protein 1:4				
Frakcja filtratu Fraction of filtrate [%]	Stężenie białka Protein content [mg/cm ³]	Lizozym – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of lysozyme	Cystatyna – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of cystatin	Frakcja filtratu Fraction of filtrate [%]	Stężenie białka Protein content [mg/cm ³]	Lizozym – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of lysozyme	Cystatyna – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of cystatin	Frakcja filtratu Fraction of filtrate [%]	Stężenie białka Protein content [mg/cm ³]	Lizozym – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of lysozyme	Cystatyna – przyrost aktywności właściwej Increase in the specific activity of cystatin
10	13,2	0,97	1,14	10	6,8	0,88	1,67	10	13,2	1,06	1,62
20	25,5	1,43	1,92	20	9,2	1,27	1,65	20	12,5	1,49	1,92
30	32,0	1,63	2,37	30	11,6	1,98	1,94	30	11,9	1,50	2,70
				40	12,0	2,41	2,62	40	10,1	1,95	2,09
				50	13,6	2,26	2,59	50	9,1	1,97	1,93
								60	10,5	1,91	1,92
								70	7,3	1,96	1,76
								80	6,2	1,89	1,79
Sredni przyrost aktywności właściwej Average increase in the specific activity	14,8 ^a	1,74 ^A	2,75 ^a		21,0 ^b	2,01 ^B	2,73 ^a		39,2 ^c	1,72 ^A	1,97 ^b

A, B – te same litery w indeksach dwóch wartości średnich oznaczają brak różnicy statystycznie istotnej przy p = 0,05;
 A, B – the same letters in indices of two mean values denote no statistically significant difference at p = 0.05.



a, b – te same litery w indeksach dwóch wartości średnich oznaczają brak różnicy statystycznie istotnej przy $p = 0,05$

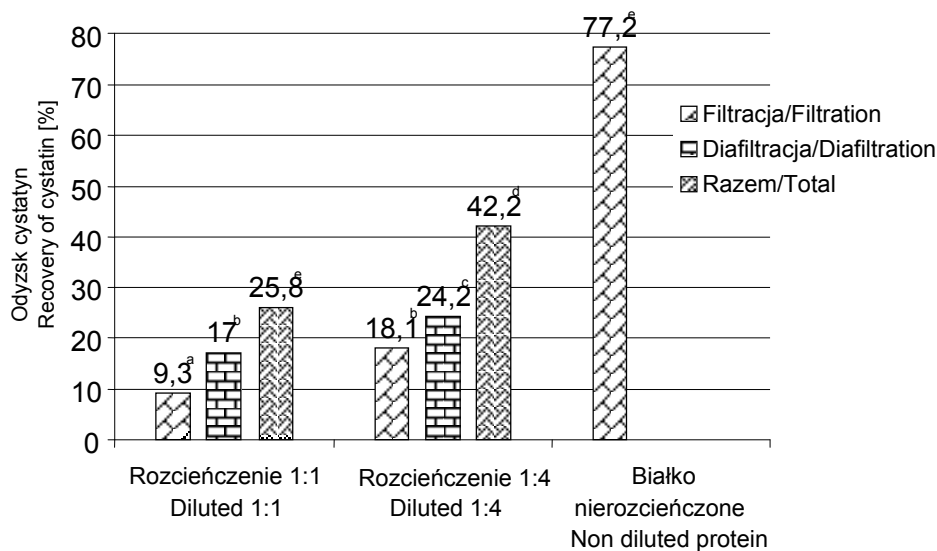
a, b – the same letters in indices of two mean values denote no statistically significant difference at $p = 0.05$

Rys. 2. Odzysk aktywnego lizozymu w filtratach [% aktywnego lizozymu w surowcu wyjściowym].

Fig. 2. Recovery of active lysozyme in permeates [% of active lysozyme in a raw material].

Znacznie korzystniej mikrofiltracja wpłynęła na stopień odzysku aktywnej cystatyny. Przy rozcieńczeniu białka w stosunku 1:4 odzysk inhibitora w filtratach sięgał blisko 80%, chociaż wzrost aktywności właściwej był tylko około 2-krotny (tab. 1, rys. 3). Korzystnie stopień odzysku cystatyny kształtował się również w wyniku filtracji białka nierozcieńczonego i rozcieńczonego w stosunku 1:1, szczególne znaczenie miał proces diafiltracji dodatkowej, prowadząc do uzyskania w permeatach aż od 29 do 36% aktywnej cystatyny. Zwraca uwagę wysoka aktywność cystatyny w permeacie uzyskanym przy filtracji białka nierozcieńczonego. Przyrost aktywności jest 3–4-krotny, co jest wartością zbliżoną do wyników uzyskiwanych przy użyciu membrany o mniejszej porowatości, do wstępnej obróbki roztworów zawierających cystatynę [3].

W trakcie procesu filtracji roztworów białka jaja odnotowano znaczący przyrost aktywności właściwej cystatyny po odfiltrowaniu około 20–30% objętości roztworów białka, co wskazuje, że występują wówczas najkorzystniejsze warunki do selektywnego wydzielania inhibitora z białka jaja.



a, b – te same litery w indeksach dwóch średnich oznaczają brak różnicy statystycznej istotnej przy $p=0,05$

a, b – the same letters in indices of two mean values denote no statistically significant difference at $p = 0.05$

Rys. 3. Odzysk aktywnej cystatyny w filtratach.

Fig. 3. Recovery of active cystatin in permeates.

Wnioski

1. Mikrofiltracja nierozcieńczonego białka jaja prowadzi do szybkiej polaryzacji membrany, co umożliwia uzyskanie tylko 30% permeatu.
2. Diafiltracja następująca po procesie wstępnej filtracji, polegająca na wprowadzeniu do roztworów białka jaja (białko pełne i rozcieńczone w stosunku 1:1) dodatkowej porcji rozpuszczalnika, w istotnym stopniu zwiększa ilość odzyskanych substancji aktywnych.
3. Mikrofiltracja membranowa roztworów białka jaja prowadzi do odzyskania w permeacie od około 25 do 70% aktywnego lizozymu i od około 40 do 80% aktywnej cystatyny. Technika ta może być wykorzystana jako wstępny etap oczyszczania substancji biologicznie aktywnych.
4. Stopień oczyszczenia preparatów lizozymu i cystatyny w uzyskanych filtratach jest niski i nie przekracza 2–3 razy aktywności właściwej w surowcu, maleje on ze wzrostem stopnia rozcieńczenia białka jaja.

Literatura

- [1] Chiang B.H., Su C.K., Tsai G.J., Tsai G.T.: Egg white lysozyme purification by ultrafiltration on an affinity chromatography. *J. Food Sci.*, 1993, **58**, 303-306.
- [2] Kopeć W., Trziszka T., Chrzanowska J.: The method of direct isolation of lysozyme from egg white using chromatography and ultrafiltration. *Proc. XX World's Poultry Cong. WPSA, New Dehli, India 2000*, **3**, pp. 37-41.
- [3] Kopeć W., Korzeniowska M., Trziszka T.: An attempt to industrial process of simultaneous isolation of lysozyme and cystatin from egg white. *Proceed. 11th Europ. Poultry Conf WPSA, Bremen, 2002*, pp. 1-8. Abstract: *Arch. Geflügelk.*, 2002, **66**, 55-56.
- [4] Leśniewski G., Kijowski J.: Otrzymywanie lizozymu z białka jaja kurzego metodą bezpośredniej ultrafiltracji. *Zywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **2 (23)**, 59-69.
- [5] Li-Chan E., Nakai S., Sim J., Bragg D.D., Lo K.V.: Lysozyme separation from egg white by cation exchange chromatography. *J. Food Sci.*, 1986, **54**, 1032-1036.
- [6] Rautenbach R.: *Procesy membranowe*. WNT. Warszawa 1996.
- [7] Siewiński M.: Method of purification of thiol proteinase inhibitors from human urine. *Cancer Biochem. Biophys.* 1991, **12**, 33-44.
- [8] Trziszka T.: *Jajczarstwo*. Wyd. AR. Wrocław 2000.

THE APPLICATION OF MEMBRANE TECHNIQUES TO RECOVER PROTEINS OF LOW MOLECULAR WEIGHT FROM HEN'S EGG WHITE

Summary

The objective of the study was to verify the possibility of using membrane filtration techniques for partial separation of biologically active proteins from an egg white. Such proteins show a biological activity of both the lysozyme, i.e. a muramidase enzyme of a molecular weight being $143 \cdot 10^2$ Da, and the cysteine proteinase inhibitor, i.e. a cystatin having a molecular weight of $126 \cdot 10^2$ Da. The microfiltration process of a native egg white and its solutions, prepared using a 0.15 M NaCl (the ratios were 1:1 and 1:4) was performed using a *crossflow* technique; tubular filters of polypropylene were used, their porosity being 0.2–0.6 μm . In the filtrates produced, the activity of lysozyme and cystatin was determined (regarded as the ability to inhibit cysteine proteinase – papaine), and it was stated that amounts of active, low weight substances recovered ranged from 60% to 80%. The fouling phenomenon had a key effect on the entire process efficiency; it was the creation of a new protein layer on the membrane. The new layer on the membrane generated a decrease in the filtration rate. On the other hand, owing to the said new layer on the membrane, there was an improvement in enriching permeates with low weight active substances. As soon as more than 20–30% of the egg white processed have been filtrated, an essential increase in the activity of cystatin was stated compared to the initial solution.

Key words: membrane filtration, lysozyme, cystatin 