

GRZEGORZ LEŚNIEROWSKI, JACEK KIJOWSKI

OTRZYMYWANIE LIZOZYMU Z BIAŁKA JAJA KURZEGO METODĄ BEZPOŚREDNIEJ ULTRAFILTRACJI

Streszczenie

Celem pracy było zastosowanie ultrafiltracji (UF) do bezpośredniego pozyskiwania lizozymu z białka jaja kurzego. Wykazano, że hydrolityczna aktywność właściwa i stopień oczyszczenia lizozymu oraz masa uzyskanego preparatu w istotny sposób zależała od rozcieńczenia surowca, kwasowości środowiska oraz jego siły jonowej. Czynnikiem determinującym aktywność enzymu i jego odzysk z białka jaja okazała się graniczna wielkość cząstek przepuszczanych przez membrany ("cut-off" membran). Wraz z jej wzrostem uzyskiwano zdecydowanie wyższe wartości tych parametrów. W najkorzystniejszych warunkach pozyskiwania enzymu otrzymano preparat o aktywności 12 400 U/mg i stopniu oczyszczenia $C=17$ (stosunek aktywności enzymu w preparacie do jego aktywności w surowcu) przy 20 procentowym odzysku lizozymu z białka jaja.

Wprowadzenie

Podstawowym źródłem pozyskiwania lizozymu (*N*-acetylo-muramylohydrolaza, E.C.3.2.1.17) jest białko jaja kurzego, które zawiera ok. 3,5%. W praktyce laboratoryjnej do pozyskiwania lizozymu z białka jaja kurzego wykorzystuje się wiele metod, jednak tylko niektóre z nich znalazły zastosowanie w praktyce przemysłowej. Klasyczna procedura otrzymywania lizozymu opracowana została przez Aldertona i Fevalda w 1946 roku i polega na bezpośredniej krystalizacji enzymu z białka jaja przy udziale chlorku sodowego [2]. Inne sposoby izolowania enzymu obejmują takie techniki, jak: kolumnowa chromatografia jonowymienna [1, 8], chromatografia powinowactwa jonowego [12] czy połączenie ultrafiltracji z chromatografią [3]. Coraz większe możliwości wykorzystania lizozymu, przede wszystkim w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [4, 5, 10], wpływają na intensyfikację prac dotyczących otrzymywania enzymu. Biorąc pod uwagę właściwości fizykochemiczne lizozymu, zwłaszcza jego niewielką masę cząsteczkową, zakładano, że do jego separowania z białka jaja

kurzego celowe jest wykorzystanie technik membranowych, a przede wszystkim ultrafiltracji (UF). Technikę UF stosuje się coraz częściej do zagęszczania białka jaja przed jego dalszym przetwarzaniem. Jednoczesne wykorzystanie jej do obu celów, tj. zagęszczania białka jaja i separacji lizozymu, może przynieść zakładom jajczarskim znaczne korzyści ekonomiczne.

Celem pracy była próba zastosowania ultrafiltracji do bezpośredniego pozyskiwania lizozymu z białka jaja kurzego.

Materiał i metody badań

Surowcem do badań było białko świeżych jaj kurzych pochodzących od kur niosek Astra S z fermy hodowlanej Oddziału Badawczego Drobiarstwa Instytutu Zootechniki w Zakrzewie k/Poznań.

Ultrafiltracja. Po przygotowaniu wstępnym surowca obejmującym wybijanie i rozdzielanie treści jaj oraz filtrację i wymieszanie białka jaja, prowadzono proces ultrafiltracji przy użyciu modułu ultrafiltracyjnego DDS 20-0,36 Lab firmy Union Filtration-Sanovo. Stosowano membrany polisulfonowe o granicznej przepuszczalności cząstek wynoszącej 20 kDa (GR61PP), 30 kDa (FS50PP), 50 kDa (GR51PP) oraz 100 kDa (GR40PP). Proces UF prowadzono:

- przy zmiennym stopniu rozcieńczenia białka jaja (ilość białka w stosunku do ilości wody wynosiła 1+1, 1+2, 1+3, 1+4, 1+5, 1+6, czyli udział wody dodanej stanowił 50%, 66,7%, 75%, 80%, 83,3% i 85,7% roztworu),
- przy pH białka jaja (8,0; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0) regulowanym roztworami NaOH i HCl,
- przy zmiennej sile jonowej roztworów białka jaja (0,085 M, 0,17 M, 0,34 M, 0,51 M, 0,68 M, 0,85 M) regulowanej chlorkiem sodowym,
- po sonikowaniu (działanie fal ultradźwiękowych) białka jaja,
- po odcukrzeniu białka jaja.

Otrzymaną w wyniku ultrafiltracji frakcję przesącza (PL) zagęszczano i odsalano techniką ultrafiltracji stosując membrany o „cut-off” 2 kDa, a następnie suszono liofilizacyjnie wraz z próbkami białka naturalnego (EW) i białka pozostałego po wyizolowaniu lizozymu zwanego koncentratem (REW).

Sonikowanie. Sonikowanie białka jaja prowadzono przy użyciu generatora fal ultradźwiękowych typu UM-20 firmy UNITRA-UNIMA.

Odcukrzanie. Odcukrzanie prowadzono metodą enzymatyczną przy użyciu oksydazy glukozowej i katalazy w postaci preparatu o handlowej nazwie NOVOFERM™. Skuteczność odcukrzenia białka jaja określano kolorymetrycznie przy użyciu zestawu testującego DEXTROSTIX™ firmy Bayer.

Aktywność lizozymu. W uzyskanych próbach oznaczano hydrolityczną aktywność lizozymu metodą spektrofotometryczną [7], zawartość białka ogólnego (metodą Kjeldahla przy użyciu aparatu Kjeltec firmy Tecator), chlorku sodowego (metodą Mohra) [9], wody (metodą suszarkową przy użyciu wagosuszarki MA 30 firmy Sartorius), badano skład aminokwasowy preparatów (przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasów AAA-T-339 firmy Mikrotechna). Określono stopień odzysku lizozymu z białka jaja kurzego oraz stopień oczyszczenia enzymu C (stosunek aktywności właściwej enzymu w otrzymanym preparacie do początkowej aktywności enzymu w surowcu, przed jego izolacją).

Elektroforeza. Analizę elektroforetyczną (SDS-PAGE) badanych prób prowadzono w aparacie SE-600 firmy Hoefer Scientific Instruments wg metody Laemmli [6]. Do prób preparatów białkowych i standardu o stężeniu $1,0 \text{ mg/cm}^3$ dodawano 0,002% błękitu bromofenolowego i 10% fikolu. Do rozdzielania białek stosowano żel rozdzielający i zagęszczający o stężeniu odpowiednio 12,5 i 5% akrylamidu. Wielkość prób do analizy wynosiła 20 μl . Elektroforeza prowadzona była przy natężeniu prądu 60 mA w czasie migracji prób poprzez żel zagęszczający, a następnie 120 mA po osiągnięciu żelu rozdzielającego. Po dotarciu czoła substancji rozdzielanej i mieszaniny wzorców do końca żelu, rozdzielanie uznawano za zakończone. Otrzymany żel płukano w 10% roztworze kwasu octowego, a następnie barwiono 20 godzin w roztworze barwiącym (0,1% Comasie Brilliant Blue R-250, 40% metanol, 10% kwas octowy). Żel odbarwiano w roztworze o składzie 40% metanol i 10% kwas octowy do momentu uzyskania przezroczystego tła. Gotowe żele skanowano przy użyciu skanera ScanMagic 4800P firmy Mustek i programu komputerowego *iPhoto Plus 4*.

Statystyka. Uzyskane wyniki poddano obróbce statystycznej, w pierwszej kolejności dokonano eliminacji błędów grubych, a następnie określono istotność różnic średnich arytmetycznych wyników uzyskanych dla badanych grup doświadczalnych, przeprowadzono weryfikację statystyczną testem Duncana oraz oceniono istotność wpływu badanego czynnika na parametry jakościowe badanych prób przeprowadzono metodą jednokierunkowej analizy wariancji. Ocenę współzależności analizowanych parametrów prowadzono obliczając współczynniki korelacji oraz oceniając ich istotność. Obliczenia statystyczne prowadzono przy wykorzystaniu programu komputerowego SPSS PC+.

Dyskusja wyników

W przemyśle jajczarskim procesy membranowe, a przede wszystkim ultrafiltracja (UF), wykorzystywane były dotąd do zagęszczania białka jaja bądź całej treści jaj przed ich dalszym przetwarzaniem. W niniejszej pracy techniki membranowe próbowano użyć do bezpośredniej separacji lizozymu z białka jaja kurzego. Zasada metody oparta jest na rozdzielaniu frakcji białkowych znajdujących się w roztworze przy wy-

korzystaniu różnicy ich mas cząsteczkowych. Lizozym o masie 14,3 kDa jest jednym z najmniejszych białek występujących w części białkowej jaja kurzego. Tworzy on związki kompleksowe prawie ze wszystkimi białkami tam obecnymi. Ponadto już w 1964 roku Sophianopoulos i Holde [11] wykazali, że w zależności od stężenia enzymu, pH i siły jonowej roztworu, a także innych czynników środowiskowych łączy się on w dimery i wyższe polimery. Trwałość tych połączeń stabilizowana jest obecnością w białku jaja sacharydów. Sprawia to, że separacja lizozymu techniką UF jest trudna, tym bardziej, że podczas procesu separacji enzymu tworzą się warunki sprzyjające jego asocjacji (podwyższone ciśnienie, wysokie pH). W niniejszej pracy w celu ułatwienia separacji enzymu tą techniką, surowiec wstępnie przygotowywano przez jego rozcieńczenie, odcukrzenie i sonikowanie, a podczas ultrafiltracji zmieniano pH, siłę jonową roztworu oraz stosowano membrany o „cut-off” od 20 do 100 kDa.

Tabela 1

Wpływ warunków przygotowania białka jaja na właściwości lizozymu otrzymanego metodą bezpośredniej ultrafiltracji.

Effect of initial preparation of egg white on properties of lysozyme obtained by direct ultrafiltration method.

Badany parametr Parameter	Wartość Value	Aktywność Activity (U/mg)	Stopień oczyszczenia Degree of enzyme purification	Lizozym odzyskany Recovery of enzyme (%)
Rozcieńczenie (woda+białko jaja)	1+1	1548 ^a	2,45 ^a	1,22 ^a
	1+2	3011 ^b	4,38 ^b	1,83 ^b
	1+3	3240 ^c	4,78 ^{bc}	2,03 ^c
	1+4	3391 ^d	4,97 ^c	2,03 ^c
	1+5	3346 ^d	5,03 ^c	2,05 ^c
	1+6	3399 ^d	5,09 ^c	2,06 ^c
Wartość pH	8,0	1501 ^e	1,85 ^d	1,39 ^d
	9,0	2846 ^f	3,88 ^e	1,89 ^d
	9,5	3405 ^h	4,73 ^g	2,08 ^{dc}
	10,0	3558 ⁱ	4,80 ^h	2,25 ^e
	10,5	3299 ^g	4,78 ^h	2,20 ^e
	11,0	3207 ^g	4,23 ^f	2,11 ^e
Siła jonowa (M)	0,085	3034 ^k	4,59 ^j	2,34 ^f
	0,17	3400 ^l	5,24 ^j	2,75 ^g
	0,34	4492 ^m	6,05 ^k	3,64 ^h
	0,51	5865 ⁿ	7,59 ^l	4,25 ⁱ
	0,68	7006 ^o	8,93 ^m	5,30 ^j
	0,85	7408 ^p	9,75 ⁿ	6,23 ^k

a-p – liczby w kolumnach oznaczone różnymi literami w obrębie jednego parametru są istotnie różne, $\alpha \leq 0,05$.

a-p – mean values in columns denoted by varying letters differ significantly, $\alpha \leq 0,05$.

Tak otrzymane preparaty enzymatyczne poddano badaniom analitycznym, a uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1.

Aktywność właściwa lizozymu

Rozcieńczenie surowca. Aktywność otrzymanego lizozymu wzrastała wraz ze wzrostem stopnia rozcieńczenia surowca. Wyraźne zwiększenie aktywności obserwowano przy rozcieńczaniu białka jaja w stosunku 1+3. Osiągnęła ona wówczas poziom 3240 U/mg. Dalsze dodawanie wody do układu powodowało wolniejszy wzrost aktywności i ostatecznie osiągnięto wartość 3399 U/mg białka przy rozcieńczeniu 1+6. Jednak w tym przypadku czas trwania procesu zwiększył się sześciokrotnie w porównaniu do rozcieńczenia 1+3. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje i opierając się na wynikach analizy statystycznej (Tab. 1) w kolejnym etapie doświadczenia stosowano 75% dodatek wody w stosunku do masy surowca (rozcieńczenie 1+3).

Kwasowość środowiska. W zależności od wartości pH stosowanego podczas procesu separacji aktywność enzymu zmieniała się wartość od 1501 U/mg przy pH 8,0 do 3207 U/mg przy pH 11,0, osiągając maksimum wynoszące 3558 U/mg przy pH równym 10,0. W miarę zbliżania się wartości pH do punktu izoelektrycznego lizozymu obserwowano wyraźną tendencję do wzrostu aktywności preparatu, a następnie jej niewielkie obniżenie przy dalszym wzroście pH białka jaja (Tab. 1). Doświadczenie wykazało więc, że prowadzenie procesu w warunkach pH bliskich wartości punktu izoelektrycznego lizozymu ułatwia izolowanie enzymu. Związane jest to najmniejszą trwałością jego kompleksów w takim środowisku. Maksimum aktywności otrzymanego preparatu (3558 U/mg) uzyskano przy pH równym 10,0. Przy takiej jego wartości prowadzono dalsze doświadczenia.

Siła jonowa. W przypadku zwiększania siły jonowej roztworu wzrost aktywności właściwej lizozymu był najbardziej znaczący (Tab. 1). Z białka jaja kurzego, w którym stężenie dodanego chlorku sodu wynosiło 0,085 M uzyskano preparat enzymatyczny o aktywności równej 3034 U/mg, natomiast przy dziesięciokrotnie większej sile jonowej roztworu aktywność lizozymu wzrosła aż do 7408 U/mg. Nie prowadzono badań w wyższym zakresie stężeń, gdyż w takich warunkach występowało wytrącanie znacznych ilości enzymu na membranach filtracyjnych i ich zapychanie (stężenie soli i pH środowiska odpowiadające krystalizacji lizozymu spotęgowane dodatkowo przyłożonym ciśnieniem), co w konsekwencji doprowadziłoby do zatrzymania procesu ultrafiltracji. W dalszych doświadczeniach stosowano więc roztwór białka jaja, którego siła jonowa wynosiła 0,85 M.

Przeprowadzona analiza statystyczna tej części badań podkreślała wysoce istotną zależność aktywności właściwej otrzymanych preparatów lizozymu od stopnia rozcieńczenia surowca, wartości zastosowanego pH oraz siły jonowej. Podobne zależności otrzymano dla stopnia oczyszczenia enzymu C, który ściśle skorelowany jest z aktyw-

nością właściwą lizozymu. Podobnie osiągał on maksymalne wartości w tych samych przedziałach rozcieńczenia surowca, jego pH i siły jonowej (Tab. 1).

Tabela 2

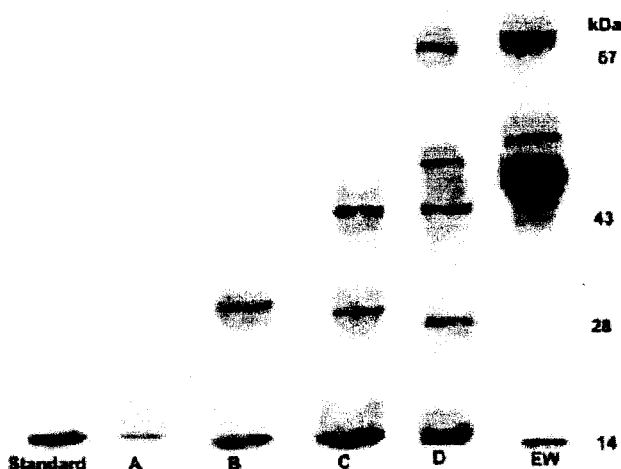
Wpływ odcukrzania, sonikowania białka jaja oraz rodzaju membran (o różnych „cut-off”) na właściwości lizozymu otrzymanego metodą bezpośredniej ultrafiltracji.

Properties of lysozyme separated by direct ultrafiltration with removing of sugar, sonication and using membranes of different cut-offs.

Badany parametr Parameter	Aktywność Activity (U/mg)	Stopień oczyszczenia Degree of enzyme purification	Lizozym odzyskany Recovery of enzyme (%)
Odcukrzanie	7208 ^a	9,79 ^a	6,85 ^b
Sonikowanie	7185 ^a	9,76 ^a	6,94 ^b
Brak odcukrzania i sonikowania (próba kontrolna)	7264 ^a	9,87 ^a	6,72 ^a
„Cut-off” membran: 20 kDa	2589 ^b	3,50 ^b	1,15 ^c
30 kDa	7244 ^c	7,97 ^c	6,28 ^d
50 kDa	9470 ^d	13,28 ^d	9,85 ^e
100 kDa	12357 ^c	16,95 ^e	19,75 ^f

a-e – patrz tabela 1.

a-e – see Table 1.



Rys. 1. Analiza elektroforetyczna preparatów lizozymu otrzymanych metodą UF w porównaniu z naturalnym białkiem jaja (EW) oraz standardowym lizozymem A–20 kDa, B–30 kDa, C–50kDa, D–100kDa.

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of lysozyme preparations obtained by ultrafiltration in comparison with native egg white (EW) and standard lysozyme: A–20kDa, B–30kDa, C–50kDa, D–100kDa.

Odcukrzanie i sonikowanie. Próba uwolnienia lizozymu z sacharydowych związków kompleksowych przez usunięcie cukru z białka jaja nie przyniosła spodziewanych efektów. Aktywność właściwa lizozymu w otrzymanych preparatach enzymatycznych nie wykazała różnic istotnych statystycznie w stosunku do wyników uzyskanych dla preparatu pochodzącego z próby kontrolnej. Z odcukrzonego białka jaja kurzego otrzymano preparat, w którym aktywność właściwa lizozymu wyniosła 7208 U/mg, natomiast aktywność lizozymu uzyskanego z białka kontrolnego wykazywała wartość 7264 U/mg. Stopień oczyszczenia enzymu również utrzymywał się na podobnym poziomie dla obu rodzajów preparatów i jego średnie wartości wyniosły odpowiednio 9,79 i 9,87 (Tab. 2). Badania preparatów pochodzących z białka jaja, które przed procesem ultrafiltracji poddano sonikowaniu również nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Wartości aktywności lizozymu w preparatach nie różniły się od próby kontrolnej (wartość średnia aktywności właściwej lizozymu wyniosła 7185 U/mg). Stopień oczyszczenia enzymu był natomiast o 0,1 niższy niż dla próby kontrolnej (Tab. 2).

„Cut-off” membran. Czynnikiem determinującym poziom aktywności lizozymu w otrzymanych preparatach enzymatycznych okazała się wielkość przepuszczanych cząstek przez membrany („cut-off” membran). Wraz z jej wzrostem uzyskiwano zdecydowanie wyższą aktywność lizozymu w kolejno otrzymywanych preparatach (Tab. 2). W próbach uzyskanych przy użyciu membran o „cut-off” do 20 kDa aktywność wynosiła 2589 U/mg natomiast 12357 U/mg przy użyciu membran o „cut-off” do 100 kDa (Tab. 2). Otrzymane wyniki badań, nie wykluczając obecności w preparacie połączeń enzymu z innymi białkami, wskazywały na możliwość występowania oligomerycznych form lizozymu w momencie jego separacji. Obserwowany wzrost aktywności sugerował separowanie lizozymu w postaci monomeru w momencie użycia membran o „cut-off” do 20 kDa, monomeru i dimeru, kiedy używano membran o przepuszczalności do 30 kDa, oraz monomeru, dimeru i wyższych oligomerów przy użyciu membran o przepuszczalności do 50 i 100 kDa. Częściowe potwierdzenie powyższych obserwacji dostarczyła analiza rozdziałów elektroforetycznych białek zawartych w preparatach (Rys. 1). Na wszystkich elektroforegramach pierwsze pasmo białkowe pojawiało się na wysokości standardowego monomeru lizozymu próby kontrolnej (14,3 kDa), było więc interpretowane jako monomeryczna postać lizozymu. Dla membran o „cut-off” 30, 50 i 100 kDa pojawiły się kolejne pasma odpowiadające najprawdopodobniej dimerowi (28 kDa) i trimerowi (43 kDa) lizozymu. W przypadku membran o „cut-off” 100 kDa widzimy kolejne pasma, które mogły odpowiadać zarówno zanieczyszczeniom preparatu innymi białkami (owoalbuminą-45 kDa i konalbuminą-75 kDa), jak i wyższym oligomerom lizozymu. Jednoznaczna interpretacja wyników była więc trudna. W celu próby wyjaśnienia problemu przeprowadzono analizę składu aminokwasowego preparatów enzymatycznych i standardowego lizozymu oraz dodatkowo wyniki porównano z danymi literaturowymi dla lizozymu i białka jaja kurzego. Działania te potwierdziły

złożony charakter otrzymanych preparatów enzymatycznych (Tab. 3). Zawartość większości aminokwasów w badanych próbach zbliżona była do ich ilości w standardowym lizozymie. Jedynie zawartość kwasu asparaginowego i glutaminowego oraz argininy wskazywała na obecność w nich innych białek części białkowej jaja kurzego. Wyniki wskazują więc na możliwość zanieczyszczenia preparatów innymi białkami, ale jednocześnie nie można wykluczyć hipotezy o powstawaniu asocjatów lizozymu podczas jego separacji techniką UF. Analogicznie do aktywności właściwej lizozymu, również

Tabela 3

Skład aminokwasowy otrzymanych preparatów enzymatycznych, standardu lizozymu oraz naturalnego białka jaja.

Amino acid composition of enzymatic preparations, standard of lysozyme and native egg white.

Nazwa aminokwasu Amino acid	Zawartość aminokwasu w próbce (%) / % of total amino acid				
	PL ₅₀	PL ₁₀₀	Standard	Standard*	EW*
Kwas asparaginowy	10,95	10,47	15,57	17,07	10,22
Treonina	4,32	4,17	4,74	5,69	4,50
Seryna	5,95	5,94	5,51	8,13	9,00
Kwas glutaminowy	11,96	12,27	5,14	4,07	12,72
Prolina	3,55	3,51	1,90	4,63	3,67
Cysteina	6,29	6,46	6,56	6,50	2,68
Glicyna	6,68	6,34	7,14	9,76	5,62
Alanina	5,62	5,40	6,11	5,76	9,08
Walina	5,59	5,66	3,90	4,88	6,80
Metionina	4,14	3,97	2,31	1,63	3,23
Izoleucyna	4,39	4,24	3,98	4,88	4,42
Leucyna	7,71	7,01	6,09	6,50	8,16
Tyrozyna	4,10	3,89	3,46	2,44	2,69
Fenylalanina	5,26	4,82	3,39	2,44	4,53
Histydyna	2,63	2,46	2,09	0,81	1,78
Lizyna	4,26	5,69	5,54	4,88	6,72
Arginina	5,21	5,63	10,51	8,94	4,10

* Za Ahvenainenem i in. (1979)

PL₅₀ – lizozym otrzymany przy użyciu membran o “cut-off” 50 kDa

PL₁₀₀ – lizozym otrzymany przy użyciu membran o “cut-off” 100 kDa

EW – białko jaja kurzego

*Ahvenainenem et al. (1979)

PL₅₀ – lysozyme obtained with membranes with “cut-off” of 50 kDa

PL₁₀₀ – lysozyme obtained with membranes with “cut-off” of 100 kDa

EW – native egg white

wartość stopnia oczyszczenia enzymu wzrastała wraz ze zwiększaniem zakresu przepuszczalności membran (Tab. 2). Przy „cut-off” do 20 kDa jego wartość była bardzo niska i wyniosła zaledwie 3,5. W miarę zwiększania przepuszczalności do 30 kDa współczynnik wzrósł ponad dwukrotnie (7,97), w przedziale 30-50 kDa uległ kolejnemu podwojeniu (13,28), by ostatecznie osiągnąć wartość 16,95 przy przepuszczalności membran do 100kDa.

Stopień odzyskania lizozymu

Jednym z najistotniejszych kryteriów oceny praktycznej przydatności badanej metody, obok aktywności enzymatycznej otrzymanego preparatu, jest jej efektywność, mierzona ilością odzyskanego lizozymu z białka jaja. Przy zastosowanych parametrach prowadzenia procesu separacji okazało się, że mimo licznych zabiegów w celu osłabienia wzajemnych interakcji, oddziaływania lizozymu z pozostałymi białkami pozostawały w dalszym ciągu bardzo silne. Zjawisko to znacznie utrudniało izolowanie enzymu. Efektem była niewielka ilość otrzymanego preparatu zarówno wtedy gdy rozcieńczano surowiec, jak i wtedy gdy stosowano różne wartości pH (Tab. 1). W najkorzystniejszych warunkach rozcieńczenia i kwasowości, tj. po dodaniu 75% wody oraz przy pH 10,0, odzyskano około dwa procent enzymu zawartego w naturalnym białku jaja. Natomiast wyraźny wzrost efektywności odzysku, choć nadal pozostający na niskim poziomie, obserwowano w przypadku zwiększania siły jonowej. Przy maksymalnym stężeniu soli ($0,85 \text{ mola/dm}^3$) odzyskiwano niewiele ponad 6% ogólnej ilości lizozymu znajdującego się w naturalnym białku jaja (EW). Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotną zależność ilości odzyskanego enzymu od siły jonowej roztworu. Z przyczyn omówionych w poprzednim punkcie (możliwość wytrącania się lizozymu na membranach przy określonym stężeniu soli) nie prowadzono badań powyżej górnej granicy stosowanego zakresu stężenia soli.

Przeprowadzone badania dotyczące wpływu siły jonowej roztworu białka jaja kurzego na skuteczność separacji z niego lizozymu techniką UF wykazały więc, że parametr ten odgrywał bardzo ważną rolę i należy go zawsze uwzględniać przy projektowaniu i programowaniu badań dotyczących tego problemu. W najkorzystniejszych warunkach prowadzenia procesu omawianego etapu badań, tj. przy rozcieńczeniu 1+3, pH 10,0 i przy sile jonowej wynoszącej 0,85 M, ilość odzyskanego lizozymu wyniosła 6,23%, jego aktywność – 7408 U/mg, a stopień oczyszczenia wzrósł do poziomu 9,75. Nie obserwowano natomiast wyraźnego wpływu odcukrzania i sonikowania surowca na ilość uzyskanego preparatu (Tab. 2). Z białka odcukrzonego przed ultrafiltracją odzyskano 6,85% lizozymu, z białka poddanego sonikowaniu – 6,94%, a z naturalnego białka jaj przy zachowaniu podobnych warunków separacji enzymu osiągnięto 6,72% skuteczność procesu. Brak widocznego wzrostu odzysku lizozymu wskazywał więc na dalsze utrzymywanie się enzymu w formie makrocząsteczek, które zatrzymywane były

przez membrany. Dopiero zastosowanie membran o większej przepuszczalności cząstek, podobnie jak w przypadku aktywności, zdecydowanie wpłynęło na poziom uzyskanych wyników (Tab. 2). Efektywność izolowania enzymu wzrosła z 1,2% przy „cut-off” 20 kDa do ok. 20% przy zastosowaniu membran o „cut-off” 100 kDa. Jednak w tym przypadku, jak już wcześniej sygnalizowano, nie wykluczono zanieczyszczenia preparatu innymi białkami. Uznano więc, że zastosowanie membran o jeszcze wyższym „cut-off” miałyby się z celem, gdyż czystość chemiczna otrzymanego preparatu byłaby zbyt niska. Mimo więc, że aktywność otrzymanego preparatu była wysoka, ilość odzyskanego białka, zwłaszcza w porównaniu do klasycznej metody krystalizacji enzymu (odzysk 60–80%), czy chromatograficznych metod jego pozyskiwania (odzysk 80–90%) pozostawała nadal na stosunkowo niskim poziomie. Wydaje się jednak, że zakłady jajczarskie posiadające i wykorzystujące linie ultrafiltracyjne do zagęszczania białka jaja przed jego dalszym przetwarzaniem mogłyby z powodzeniem, przy niewielkich zmianach technologicznych, pozyskiwać także lizozym. W takim przypadku, nawet przy niskim poziomie separowania enzymu (15–20%), jego pozyskiwanie metodą UF mogłoby mieć uzasadnienie ekonomiczne.

Wnioski

1. Rozcieńczanie białka jaja przed ultrafiltracyjnym izolowaniem z niego lizozymu wpływało na wzrost odzysku i aktywność otrzymanego preparatu. Za najkorzystniejsze uznano rozcieńczenie, w którym woda stanowiła 75% roztworu.
2. Badając wpływ kwasowości środowiska w którym prowadzono separację stwierdzono, że lizozym uzyskuje maksymalną aktywność przy pH 10,0.
3. Najbardziej znaczący wzrost aktywności lizozymu obserwowano, gdy zwiększono siłę jonową roztworu do wartości 0,85M.
4. Nie obserwowano wpływu odcukrzania i sonikowania białka jaja na wzrost aktywności i stopień odzysku enzymu.
5. Czynnikiem determinującym odzysk enzymu z białka jaja i jego aktywność okazała się wielkość cząstek przepuszczanych przez membrany („cut-off” membran). Najwyższy efekt uzyskano przy „cut-off” 100 kDa, dla którego odzyskano prawie 20% lizozymu zawartego w białku jaja o aktywności ponad 12 tys. U/mg.

Praca finansowana ze środków KBN – IG 5P06G01410.

LITERATURA

- [1] Ahvenainen R., Heikonen M., Kreula M., Linko M., Linko P.: Separation of lysozyme from egg white. *Food Process Engineering*, 2, 1979, 301.

- [2] Alderton G., Fevold H.L.: Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **164**, 1946, 1.
- [3] Chiang B.H., Su C.K., Tsai G.J., Tsao G.T.: Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. *J. Food Sci.*, **58** (2), 1993, 303.
- [4] Kiczka W.: Od monomeru do dimeru lizozymu. *Życie Weterynaryjne*, **4A**, 1994, 131.
- [5] Kijowski J., Leśniewski G.: Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności, w diagnostyce medycznej i farmakologii. *Biotechnologia*, **2** (29), 1995, 130.
- [6] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 1970, 680.
- [7] Leśniewski G., Kijowski J.: Metody badania aktywności enzymatycznej oraz oznaczanie ilościowe lizozymu z białka jaja kurzego. *Przemysł Spożywczy*, **12**, 1995, 476.
- [8] Li-Chan E., Nakai S., Sim S., Bragg D.D., Lo K.V.: Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. *J. Food Sci.*, **54**, 1986, 1032.
- [9] Polska Norma: PN-73/A-82112 Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości soli kuchennej, 1973.
- [10] Proctor V.A., Cunningham F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **26** (4), 1988, 359.
- [11] Sophianopoulos A.J., Van Holde K.E.: Physical study of muramidase (lysozyme). *J. Biol. Chemistry*, **239**, 1964, 2516.
- [12] Weaver G.L., Kroger M., Katz F.: Deaminated chitin affinity chromatography: a method for isolation, purification and concentration of lysozyme. *J. Food Sci.*, **42**, 1977, 1084.

SEPARATION OF LYSOZYME FROM CHICKEN EGG WHITE BY DIRECT ULTRAFILTRATION METHOD

S u m m a r y

The aim of this work was to use ultrafiltration (UF) to isolate lysozyme directly from chicken egg white. It was concluded that the specific activity of lysozyme, degree of its purification and enzyme recovery depended significantly on the dilution of egg white solution, its pH and ionic strength. A significant rise in lysozyme activity and efficiency of the enzyme separation was observed after the isolation was carried out with the use of membranes with increasing cut-off. Under the best separation conditions the enzyme activity was 12.400 U/mg, coefficient of purification degree (the ratio of enzyme specific activity in the preparation, to the initial enzyme activity in raw material before isolation) received level 17 and the recovery of lysozyme was about 20%. ❖