

Magdalena LECH, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA

e-mail: magdalena.lech@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprosesowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wrocław

Wykorzystanie filtracji membranowej w separacji białek pochodzących z serwatki koziej oraz ich hydrolizatów**Wstęp**

Serwatka jako produkt uboczny przemysłu jest zakwalifikowana, zgodnie z zarządzeniem *Ministra Środowiska* jako medium szczególnie niebezpieczne. Współczynniki BOD oraz ChZT₅ serwatki powinny zostać obniżone do wartości 40 mg l⁻¹ zgodnie z prawem [Rozporządzenie MS, 2006]. Równocześnie jednak serwatka stanowi źródło cennych białek i laktozy, które mogą zostać zagospodarowane, co spowoduje obniżenie BOD oraz ChZT₅.

Białka serwatkowe wykazują właściwości bioaktywne, więc wykorzystanie ich oraz ich hydrolizatów do suplementacji środków spożywczych, czy terapeutycznych przynosi korzystne efekty. Bardzo często białka serwatkowe są głównym komponentem produktów przeznaczonych dla sportowców. Laktoferyna – białko występujące w serwatce w najmniejszym stężeniu (Tab. 1), a posiadające bardzo silne właściwości antybakteryjne, ma zastosowanie w produkcji kosmosecutyków, czy produktów do higieny jamy ustnej.

Tab. 1. Charakterystyka białek serwatkowych pochodzących z mleka koziego [Sanmartin i in. 2012]

	Masa cząsteczkowa [kDa]	Stężenie · 10 ³ [kg·m ⁻³]	pI
Immunoglobuliny (IM)	150÷1000	0,42	5,5÷8,3
Laktoferyna (LF)	78	0,12	9,0
Albumina (SA)	69	0,26±0,3	4,7÷4,9
β-laktoglobulina (LA)	18,3	1,8±2,8	5,2
α-laktoalbumina (LG)	14	0,6±1,1	4,5÷4,8
Glikomakropeptydy (GMP)	7	0,96	-

Immunoglobuliny serwatkowe poprawiają natomiast właściwości immunomodulacyjne środków spożywczych przeznaczonych dla noworodków [Maubois i Ollivier, 1997]. Hydrolizaty białkowe stosuje się u noworodków z alergią. Peptydy pochodzenia serwatkowego posiadają również właściwości prozdrowotne, a np. zhydrolizowana α-laktoalbumina jest źródłem α-laktorfiny (fr. 50-53) czyli peptydu o działaniu opioidowym [Dziuba i Fornal, 2009].

W celu separacji, zateżenia serwatki można wykorzystać ciśnieniowe techniki membranowe. Membrany mikrofiltracyjne stosowane są w przemyśle do sterylizacji mleka [Zander i Zander, 2004], jego zagęszczania [Mawson, 1994], czy separowania miceli kazeinowych [Caron, 1997]. Membrany ultrafiltracyjne, których rozmiary porów są z zakresu cząsteczkowego, testowane były pod kątem wymycia laktozy z serwatki [Erdem i in., 2006] oraz produkcji koncentratów białkowych [Morr i Ha, 1993; Arunkumar i Etzel, 2015]. Membrany nanofiltracyjne badano także pod kątem odseparowania peptydów, będących efektem hydrolizy przemysłowej białek serwatkowych [Butylina, 2006].

Zintegrowanie ultra-, mikro- oraz nanofiltracji może doprowadzić do efektywnego zagospodarowania serwatki, pozyskania cennych, biologicznie aktywnych białek serwatkowych i peptydów pochodzących z ich hydrolizy.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie propozycji wielostopniowej separacji białek serwatkowych oraz peptydów.

Badania doświadczalne**Materiały**

Do eksperymentów separacyjnych wykorzystywano serwatke pochodzącą z firmy *Sery Lomnickie - Kozia Łąka*, Polska. Charakteryzowała się ona lekko żółtą barwą, wykazywała lekkie zmętnienie, a jej lepkość (oznaczona wiskozymetrem *Hoeplera*) wynosiła

0,950 mPa·s. Serwatke przed podaniem na membranę poddawano klarowaniu wapniowo-termicznemu w celu zmniejszenia niekorzystnego osadzania się białek na powierzchni membrany [Rinn i in., 1990]. W pierwszym etapie stosowano wirowanie (przy 9508 G) przez 30 minut w 4°C a następnie dodawano 1,2 kg m⁻³ CaCl₂ w temperaturze 2÷5°C i 2M NaOH w celu doprowadzenia pH do wartości 7,3. Tak uzyskany roztwór termostawiano przez 8 minut w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu ponownie wirowano w taki sam sposób, jak w etapie wstępnym. Uzyskane medium było klarownym roztworem białek serwatkowych nie różniącym się od początkowego zarówno pod względem składu jakościowego jak i ilościowego białek.

Aparatura i metodyka

W badaniach wykorzystano trzy rodzaje membran ceramicznych (*Tammi Industries*, Nyons, Francja) o różnych wielkościach porów (współczynnikach odcięcia) i powierzchni separacyjnej (Tab. 2).

Tab. 2. Parametry zastosowanych membran ceramicznych (*Tammi Industries*)

Średnica porów (Wsp. odcięcia)	Powierzchnia filtracyjna [m ²]	Liczba kanałów	Materiał nośnika	Materiał membrany
0,14 [μm]	0,013	7	TiO ₂	TiO ₂
150 [kDa]	0,013	7	TiO ₂	ZrO ₂ /TiO ₂
15 [kDa]	0,0045	1	TiO ₂	ZrO ₂ /TiO ₂

Strumień zasilający podawano do wnętrza rurek, w przepływie krzyżowym, z szybkością 2 m s⁻¹. Ciśnienie transmembranowe wynosiło 0,5 bar dla MF i 2,0 bar dla UF oraz NF.

Zmiany pH dokonywano poprzez odpowiednie rozcieńczenie 0,1 M buforem fosforanowym o pH 5 lub pH 9. Natomiast siłę jonową roztworu podwyższano za pomocą NaCl. Separacji poddawano serwatke o 20-krotnym rozcieńczeniu. Stężenie początkowe białka było w zakresie od 9 do 14 kg m⁻³ (w zależności od dnia pozyskania serwatki od producenta).

Zawartość białka w roztworach była prowadzona metodą *Lowry'ego* i in. [1951] bazując na krzywej standardowej na albuminę wołową o równaniu

$$C [\text{kg m}^{-3}] = 0,396 \text{ Abs (750)} \quad (1)$$

Zawartość peptydów oznaczano przy długości fali $\lambda = 280$ (*Shimadzu*) korzystając z krzywej standardowej (również na albuminę wołową)

$$C [\text{kg m}^{-3}] = 1,512 \text{ Abs (280)} \quad (2)$$

Analizy jakościowej roztworów białkowo-peptydowych dokonano wykorzystując chromatograf HPLC (*Shimadzu*), z kolumnami do filtracji żelowej *BioSep-SEC s2000* i *Yarra SEC-2000 (Phenomenex)* połączonych w sposób szeregowy. Jako eluent stosowano 0,05M bufor fosforanowy o pH 6,8. Wyniki zostały opracowane na podstawie krzywej standardowej:

$$\log(M_{\text{czqst}}) = -0,110 t_{\text{ret}} + 4,276 \quad (3)$$

Reakcję hydrolizy prowadzono z udziałem termolizyny (*Calbiochem*). Przed procesem hydrolizy serwatka (pH 7,3) była inkubowana przez 30 minut w temperaturze 60°C w celu rozfałdowania struktury 3. rzędowej obecnych w niej białek. Reakcja prowadzona była w reaktorze mieszalnikowym zaopatrzonym w płaszcz grzejny, dzięki któremu utrzymywana była temperatura 60°C optymalna dla działania enzymu. Czas trwania reakcji hydrolizy wynosił 24 godziny.

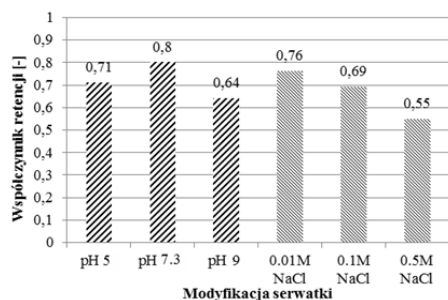
Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania miały na celu uzyskanie odpowiedzi jak siła jonowa oraz pH wpływają na separację białek serwatkowych oraz ich hydrolizatów oraz czy dobrane na podstawie danych literaturowych membrany są odpowiednimi do separacji białek serwatkowych.

Wg doniesień literaturowych dodatek NaCl skutkuje zwiększeniem średnicy białka, co wynika z tworzenia się wtórnej warstwy jonowej [Zydney, 1998]. Natomiast zmiana pH powoduje zmianę ładunku białka, ponieważ posiada ono charakter obojętny jedynie w jego punkcie izoelektrycznym [Xu, 2000], co może powodować agregowanie białek oraz zmianę powinowactwa białek do materiału membrany.

Proces mikrofiltracji

Membrana o średnicy porów 0,14 μm teoretycznie powinna przepuszczać wszystkie z białek serwatkowych. Nawet immunoglobuliny, których masy cząsteczkowe sięgają 1000 kDa [Sanmartin i in. 2012], powinny swobodnie migrować przez membranę. W celu oszacowania ich rozmiarów można je porównać do zbadanego dokładnie rybosomu, którego masa u *Escherichia coli* wynosi ok. 2700[kDa] a średnica ok. 20 nm [Berg i in., 2007]. Nasuwa się zatem wniosek, że transport immunoglobulin o masie 3-krotnie mniejszej niż wspomniany rybosom (czyli o średnicy mniejszej niż 20 nm) powinien następować bez ograniczeń przez membranę o nominalnej średnicy porów 0,14 μm . W rzeczywistości sytuacja różni się od przewidywań teoretycznych, ponieważ białka serwatkowe pomimo relatywnie dużych średnic porów membrany są w znacznym stopniu przez nią zatrzymywane (Rys. 1), co może świadczyć o ich silnej agregacji.



Rys. 1. Współczynniki retencji w procesie mikrofiltracji w zależności od modyfikacji serwatki

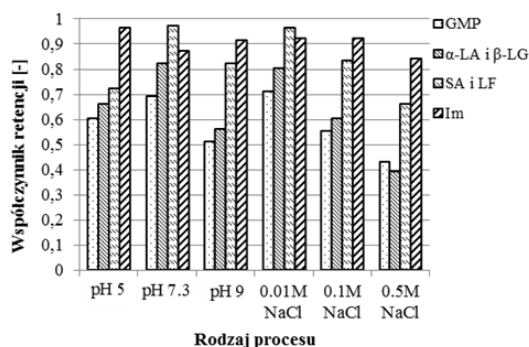
Współczynnik retencji zdefiniowany jako:

$$R = 1 - \frac{C_P}{C_R} \quad (4)$$

w każdym z przeprowadzonych eksperymentów był nieoczekiwanie wysoki. Dla serwatki niemodyfikowanej wynosił 0,8, zaś najniższą wartość równą 0,55 miał dla serwatki o dużej sile jonowej (0,5M).

Analizując retencję poszczególnych frakcji (Rys. 2) białka o podobnej masie połączono w grupy a ich współczynnik retencji wyrażono odpowiednio jako pole powierzchni odpowiadające tej grupie w permeacie i retenciacie:

$$R = 1 - \frac{A_{HPLC_P}}{A_{HPLC_R}} \quad (5)$$

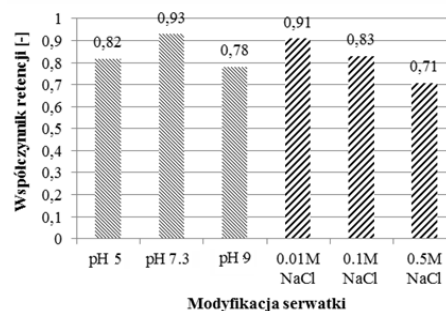


Rys. 2. Współczynniki retencji poszczególnych frakcji białek serwatkowych w procesie mikrofiltracji

Jak się spodziewano stopień zatrzymania białka malał wraz ze spadkiem jego masy. Dość nieoczekiwane było, że białka o masie 14 kDa, tzn. α -LA były również w dużym stopniu zatrzymywane na membranie.

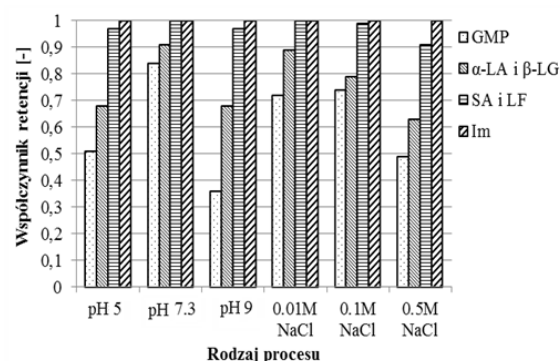
Proces ultrafiltracji

Retencja membrany ultrafiltracyjnej (Rys. 3) jest wyższa od i tak już wysokiej retencji w procesie mikrofiltracyjnym; współczynnik retencji wynosi blisko 0,9. Wskazuje to na zastosowanie takiej membrany do uzyskiwania koncentratów białkowych, nie zaś do ich sekwencjonowania. Analogicznie jak dla membrany ultrafiltracyjnej wysokie pH oraz zwiększona siła jonowa powodują obniżenie ogólnej retencji za sprawą usprawnienia transportu najmniejszych z białek (Rys. 4).



Rys. 3. Współczynniki retencji w procesie ultrafiltracji w zależności od modyfikacji serwatki.

Bilansując proces w każdym z przypadków, masa osadzonego białka nie różniła się znacząco i wynosiła od 10 do 20%. Sytuacja taka ma miejsce również podczas separacji MF.



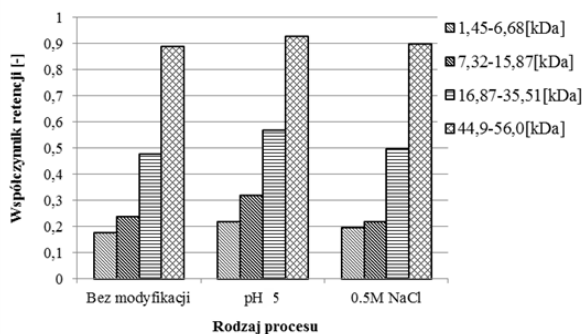
Rys. 4. Współczynniki retencji poszczególnych frakcji białek serwatkowych-UF

Analizując zatrzymanie poszczególnych frakcji w przypadku UF, obserwowano obniżenie retencji glikomakropeptydów przy pH 9 oraz przy stężeniu soli $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \cdot 10^3 \text{ mol m}^{-3}$ odpowiednio o ok. 57% i 41% w stosunku do serwatki niemodyfikowanej.

Separacja nanofiltrycyjna

Separacja nanofiltrycyjna peptydów powstałych w wyniku enzymatycznej hydrolizy białek serwatkowych, z wykorzystaniem membrany z pogranicza nano- i ultrafiltracyjnej (*uf-fine*), pozwoliła na rozdzielenie poszczególnych hydrolizatów. Separacja przebiegała zgodnie z podanym przez producenta współczynnikiem odcięcia (15 kDa). Peptydy o masie poniżej 15 kDa były zatrzymywane jedynie w 20% (Rys. 5).

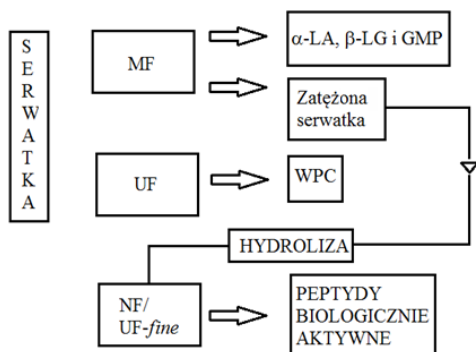
Zastosowanie diafiltracji umożliwiło całkowite ich wymycie. W przypadku, gdy strukturami separowanymi są peptydy, będące sekwencją aminokwasów i jednocześnie fragmentami białek wpływ siły jonowej czy pH nie jest istotny, ponieważ rozfałdowane oraz pofragmentowane białko traci swój punkt izoelektryczny a brak struktury trzeciorzędowej nie sprzyja tworzeniu dodatkowej chmury jonowej (NaCl) dookoła peptydów. Uzyskane wyniki potwierdziły tę prawidłowość.



Rys. 5. Współczynniki retencji poszczególnych grup peptydów pochodzenia serwatkowego

Wnioski

Wykorzystanie technik membranowych do zagospodarowania serwatki może skutecznie doprowadzić do obniżenia ładunku biologicznego, poprzez odzysk białek. Na rys. 6. przedstawiono proponowany schemat odzysku cennych białek serwatkowych oraz peptydów aktywnych biologicznie powstałych z ich hydrolizy z zastosowaniem membran od mikro po ultrafiltracyjnej.



Rys. 6. Schemat zagospodarowania białek serwatkowych

Zastosowana membrana MF może posłużyć do odzysku α -LA, β -LG oraz GMP, które w odczynie zasadowym oraz przy wysokiej sile jonowej intensywnie przechodzą do permeatu. Ich transmisja

$$Tr = C_P/C_R \quad (6)$$

wynosi: $Tr_{\alpha-LA-\beta-LG} = 62\%$ oraz $Tr_{GMP} = 58\%$

w roztworze zawierającym $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \text{ NaCl}$. W tych samych warunkach transmisja innych białek serwatkowych jest mniejsza niż 35%. Natomiast uzyskany retentat będący zatężonym roztworem wszystkich białek serwatkowych poddany hydrolizie enzymatycznej prowadzi do powstania peptydów funkcjonalnych, które skutecznie mogą zostać rozfrakcjonowane stosując membranę NF-15 kDa.

Membrana UF-150 kDa, wspomagana metodą diafiltracji, może posłużyć do skutecznego zatężenia serwatki, przy jednoczesnym oczyszczeniu z GMP, które dość swobodnie przez nią migrują przy $pH 9$ oraz przy zwiększonej sile jonowej.

OZNACZENIA

- $A_{HPLC-PR}$ – pole powierzchni pod chromatogramem permeatu/retentatu, [V s⁻¹]
- C – stężenie, [kg m⁻³]
- C_P/C_R – stężenie białka w permeacie/retentacie, [kg m⁻³]
- R – współczynnik retencji, [-]
- Tr – transmisja, [-]
- t_{ret} – czas retencji, s
- λ – długość fali świetlnej, [nm]
- MF, UF, NF – odpowiednio mikro-, ultra- lub nanofiltracja

LITERATURA

- Arunkumar A., Etzel M. R., 2015. Negatively charged tangential flow ultrafiltration membranes for whey protein concentration. *J. Membrane Sci.*, **475**, 40–348. DOI:10.1016/j.memsci.2014.10.049
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., Clarke N. D., 2007 *Biochemia*. PWN, warszawa, 823-839
- Butylina S., Luque S., Nystrom M., 2006. Fractionation of whey – derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. *J. Membrane Sci.*, **280**, 418-426. DOI:10.1016/j.memsci.2006.01.046
- Caron A., Saint Gelis D., Pouliot Y., 1997. Coagulation of milk enriched with ultrafiltered or diafiltered microfiltered milk retentate powders. *Int. Dairy J.*, **9**, 445-451. DOI:10.1016/S0958-6946(97)00024-1
- Dziuba J., Fornal Ł. (red.), 2009. *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. WNT, Warszawa, 190-201
- Erdem I., Ciftcioglu M., Harsa S., 2006. Separation of whey components by using ceramic membranes. *Desalination*, **189**, - 91. DOI:10.1016/j.desal.2005.06.016
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265– 270
- Maubois J. L., Ollivier G., 1997. *Extraction of milk proteins* [in:] Damodaran S., Paraf A. (Eds). Food proteins and their applications, Marcel Dekker, Nowy Jork, 579-595
- Mawson A. J., 1994. Bioconversion for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Tech.*, **47**, 195-203. DOI:10.1016/0960-8524(94)90180-5
- Morr C.V., Ha E. Y. W., 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 431-447. DOI:10.1080/10408399309527643
- Rinn J. C., Morr C. V., Seo A., Surak J. G., 1990. Evaluation of nine semi-pilot scale whey pretreatment modifications for producing whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, **55**, 510-515. DOI:10.1111/j.1365-2621.1990.tb06798.x
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 24 lipca 2006 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego. Dz.U. 2006 nr 137 poz. 984
- Sanmartin B., Diaz O., Rodriguez – Turienzo L., Cobos A., 2012. Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Res.*, **105**, 186 -192. DOI:10.1016/j.smallrumres.2011.11.020
- Xu Y., Sleigh R., Hourigan J., Johnson R., 2000. Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. *Proc. Biochem.*, **36**, 393-399. DOI:10.1016/S0032-9592(00)00199-0
- Zander L., Zander R., 2004. Techniki membranowe w przetwórstwie mleka. *Ogólnopolski Informator Mleczarski* **95**, nr 11
- Zydney A. L., 1998. Protein separation using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation, *Diary J.*, **8**, 243-250. DOI:10.1016/S0958-6946(98)00045-4

Badania prowadzono w ramach projektu 2011/03/B/ST8/06029 Narodowego Centrum Nauki.