

Kamil KOPEĆ, Andrzej KOŁTUNIEWICZ, Katarzyna DĄBKOWSKA

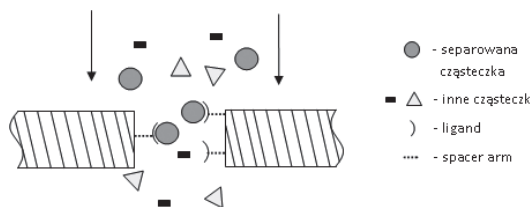
e-mail: k.kopec@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Separacja lizozymu z białka jaja kurzego za pomocą chromatografii membranowej jonowymiennej

Wstęp

Chromatografia membranowa jest techniką rozdzielania, która budzi największe zainteresowanie w kontekście separacji białek. W metodzie tej fazę stacjonarną stanowi mikroporowata membrana, w której porach immobilizowane są ligandy posiadające zdolność do selektywnego i odwracalnego wiązania docelowych cząsteczek z roztworu (Rys. 1). Ligandy mogą być przyłączone do powierzchni membrany bezpośrednio lub za pomocą tzw. wysięgników dystansujących (*spacer arms*), czyli cząsteczek umożliwiających swobodną rotację ligandom. Powoduje to zniesienie ograniczeń sterycznych wiązania separowanej cząsteczki do ligandu, przez co rośnie prawdopodobieństwo odpowiedniego ustawienia się cząsteczki i ligandu względem siebie i wystąpienia oddziaływań między nimi [Pabby i in., 2009].



Rys. 1. Schemat procesu separacji za pomocą chromatografii membranowej [Pabby A. i in., 2009]

Adsorpcja separowanych cząsteczek na adsorberach membranowych następuje poprzez oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe, siły van der Waalsa lub wiązania wodorowe. Najczęściej w procesie adsorpcji uczestniczą wszystkie wymienione zjawiska, a jedno z nich jest dominujące.

Chromatografia membranowa wykazuje wiele zalet, dzięki którym może w przyszłości zastąpić powszechnie stosowaną w separacji białek chromatografię kolumnową. Należą do nich: dominujący konwekcyjny transport masy, znacznie mniejszy spadek ciśnienia, krótszy czas trwania procesu, mniejsze zużycie buforów oraz liniowy charakter w powiększaniu skali [Saxena i in., 2009].

Chromatografia membranowa posiada również pewne ograniczenia, wśród których należy wymienić: problemy z jednolitym rozprowadzeniem strumienia zasilającego, uzyskaniem równomiernych wielkości porów oraz równomiernych grubości membrany, a także niska wydajność wiązania dla małych cząsteczek [Ghosh, 2002]. Tym ograniczeniom można łatwo zaradzić dobierając membrany o odpowiedniej jakości i właściwościach dla danego procesu.

Jednym z potencjalnych zastosowań chromatografii membranowej do przemysłowej separacji białek jest separacja lizozymu z białka jaja kurzego. Lizozym jest enzymem zdolnym do hydrolizy peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii, głównie Gram-dodatnich. Enzym ten znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym jako naturalny i bezpieczny konserwant żywności (tzw. biokonserwant) [Golqb i in., 2005]. Coraz większe zainteresowanie lizozymem obserwuje się w przemyśle farmaceutycznym. Stosowany jest jako lek w terapii wrzodów i infekcji, czynnik przeciwbakteryjny w preparatach okulistycznych, czynnik wspomagający w terapiach antybiotykami, antyseptykami, kortykosteroidami i proteazami [Golqb i in., 2005].

Adsorpcję lizozymu z roztworów zawierających mieszaninę kilku białek wzorcowych na membranach jonowymiennych badano wielokrotnie. Badania nad separacją enzymu z białka jaja kurzego metodą chromatografii membranowej jonowymiennej mają charakter wstępny.

Badania nad separacją lizozymu z białka jaja kurzego mogą ponadto zostać wykorzystane do realizacji czystej technologii w której pełnowartościowy produkt powstaje ze ścieków. W tym wypadku wydajna i tania produkcja enzymu o najwyższej czystości może być połączona z równoczesnym oczyszczaniem ścieków powstających w zakładach produkujących jaja w proszku.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano membrany kationowymienne *Mustang® S Coin* (polieterosulfon, pory 0,8 µm) firmy *PALL*. Jako surowiec wykorzystano jaja kurze pochodzące z chowu klatkowego. Do sporządzenia roztworów buforowych wykorzystano odczynniki o czystości cz.d.a. firmy *POCH* oraz wodę dejonizowaną. Wszystkie roztwory podawane na membranę kationowymienną zostały uprzednio poddane filtracji na module mikrofiltracyjnym *Vivaflow 50* (polieterosulfon, pory 0,2 µm) firmy *Sartorius Stedim Biotech*. Do wyznaczenia aktywności lizozymu wykorzystano bakterie *Micrococcus luteus* dostarczone przez Zakład Biologii Wydziału Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej. Do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) wykorzystano aparat *Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell* oraz odczynniki firmy *Bio-Rad*. Jako wzorec zastosowano lizozym z białka jaja kurzego (≥ 30 000 FIP-U/mg) firmy *Merck*.

Obróbka wstępna surowca

Białko jaja kurzego oddzielono ręcznie od żółtka i skorupki, a następnie rozcieńczono 10-krotnie w 50 mM buforze fosforanowym o *pH* 8,00. W zastosowanym buforze lizozym (*pI* 10,7; 14,3 kDa) i awidyna (*pI* 10,0; 68,3 kDa) miały wypadkowy ładunek dodatni, podczas gdy wypadkowy ładunek pozostałych protein białka jaja kurzego był ujemny. Lizozym i awidyna stanowią odpowiednio 3,50 i 0,05% zawartości wszystkich protein w białku jaja kurzego [Patent PL/EP 1746898, 2007].

200 ml rozcieńczonego białka umieszczono w szklanej zlewce obłożonej lodem, po czym roztwór poddano homogenizacji przez 30 sekund, a następnie wirowaniu w celu oddzielenia osadu. Po rozcieńczeniu i homogenizacji roztwór został poddany wirowaniu w celu oddzielenia osadu (5000 obr./min, 15 minut). Supernatant po wirowaniu został poddany procesowi chromatografii membranowej.

Separacja lizozymu na membranie jonowymiennej

Separacja lizozymu z roztworu po obróbce wstępnej przebiegała w 3 etapach. W 1 etapie przez membranę przepuszczono 20 ml roztworu białka jaja kurzego w buforze fosforanowym. Etap 2 polegał na przepłukaniu membrany 20 ml buforu fosforanowego. W etapie 3 przeprowadzono elucję lizozymu z membrany za pomocą 20 ml 50 mM buforu fosforanowego o *pH* 8,00 zawierającego 0,5 M NaCl. Proces ten przeprowadzono w temperaturze 25°C, przy przepływie przez membranę wynoszącym 3,2 ml/min. Różnica ciśnienia na membranie wynosiła 5 PSI. Zbadano skuteczność separacji lizozymu dla trzech wariantów recyrkulacji strumieni przechodzących przez membranę: bez recyrkulacji – proces I, z dwukrotną recyrkulacją – proces II, z czterokrotną recyrkulacją – proces III.

Oznaczanie aktywności lizozymu

Aktywność enzymatyczną lizozymu mierzono metodą turbidymetryczną [Noh i in., 2005]. Gram-dodatnie bakterie *Micrococcus luteus* zostały zawieszono w 67 mM buforze fosforanowym o *pH* 6,24. Ilość użytego buforu była dobierana tak, żeby absorbancja zawiesiny przy

długości fali 450 nm zawierała się w przedziale 0,6÷0,7. Za jednostkę aktywności enzymu (U) przyjęto taką ilość lizozymu, która powoduje spadek absorbancji przy $\lambda = 450$ nm o 0,001 w ciągu jednej minuty w temperaturze 25 °C. W celu wyznaczenia aktywności lizozymu do 2,98 ml zawiesiny *Micrococcus luteus* dodawano 20 μ l badanej próbki i mierzono absorbancję co 15 sekund przez jedną minutę. Aktywność enzymatyczną (AE) na 1 ml próbki obliczano ze wzoru:

$$AE = \frac{4AA_{450}}{0,001 \cdot 0,02 \text{ ml}} \quad (1)$$

gdzie:

AE – aktywność enzymatyczna lizozymu [U/ml],

ΔA_{450} – spadek wartości absorbancji przy $\lambda = 450$ nm w ciągu 15 sekund.

Aktywność całkowitą obliczano mnożąc aktywność enzymatyczną przez objętość badanego roztworu lizozymu, natomiast procent odzysku (%R) enzymu obliczano ze wzoru:

$$\%R = \frac{A_N}{A_o} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

A_N – aktywność całkowita lizozymu w roztworze na danym etapie procesu,

A_o – aktywność całkowita lizozymu przed obróbką wstępną surowca.

Elektroforeza (SDS-PAGE)

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono opierając się na metodzie Laemmli'ego [1970]. Kanapka żelowa składała się z żelu zagęszczającego i rozdzielającego o stężeniu akrylamidu odpowiednio 4 i 12%. Elektroforeza prowadzona była w buforze elektrodowym Tris/Glicyna/SDS, przy stałym napięciu 200 V i początkowym natężeniu 60 mA. Po skończonym rozdziale żele były barwione w roztworze barwiącym: 0,1% (w/v) Coomassie Blue R-250, 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) kwas octowy, a następnie odbarwiane w roztworze odbarwiającym: 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) kwas octowy.

Wyniki i dyskusja

W tab. 1 przedstawiono uzyskane wartości procentu odzysku enzymu w badanych wariantach prowadzenia procesu.

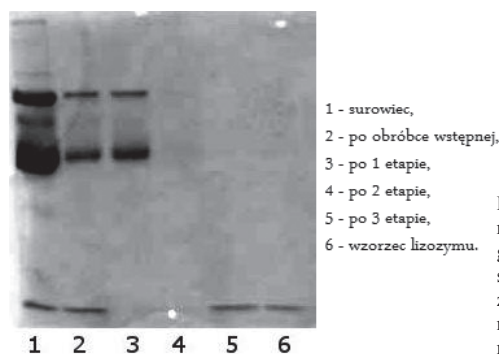
Tab. 1. Uzyskany %R lizozymu w poszczególnych procesach separacji z białka jaja kurzego na membranie jonowymiennej

Proces	Recykulacja	%R
Obróbka wstępna surowca	-	87,5%
I	brak	76,6%
II	2x	87,5%
III	4x	87,5%

Jak można zauważyć zastosowana metoda obróbki wstępnej surowca spowodowała powstanie strat aktywności lizozymu na poziomie 12,5%. Przyczyną może być blokowanie cząsteczek lizozymu wewnątrz struktury tworzącego się podczas rozcieńczenia surowca osadu owomucyny lub adsorpcja enzymu na powierzchni tego osadu. Możliwa jest również utrata części aktywności lizozymu podczas wirowania.

W przypadku separacji lizozymu na membranie jonowymiennej bez recykulacji strumieni (proces I) zaobserwowano dalsze straty aktywności enzymu. Wystąpiły one na 1 etapie procesu, co oznacza, że niecałkowita ilość lizozymu podawanego na membranę została związana w porach. Stosując dwukrotną i czterokrotną recykulację (procesy II i III) zaobserwowano całkowitą adsorpcję enzymu podanego na membranę, na co wskazują uzyskane wartości procentu odzysku lizozymu równe %R po etapie obróbki wstępnej surowca. W każdym z przeprowadzonych procesów zaobserwowano całkowite wymycie lizozymu w etapie 3 (dane nie przedstawione w artykule). Oznacza to, że nie jest wymagana recykulacja etapu elucji enzymu.

Czystość lizozymu otrzymanego w badanym procesie separacji oceniono na podstawie przeprowadzonej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Na rys. 2 przedstawiono elektroforogram uzyskany dla procesu II.



Rys. 2. Elektroforogram roztworów po poszczególnych etapach procesu separacji lizozymu z białka jaja kurzego na membranie jonowymiennej w procesie II

Jak można zauważyć dla próbki uzyskanej po trzech etapach separacji (próbka 5) zaobserwowano wystąpienie tylko jednego prążka, którego położenie odpowiada wzorcowi lizozymu (próbka 6). Oznacza to, że w procesie uzyskano lizozym o wysokiej czystości.

Brak obecności na elektroforogramie prążka odpowiadającego lizozymowi w próbce uzyskanej po 1 etapie procesu (próbka 3) oznacza, że przy zastosowaniu dwukrotnej recykulacji strumienia (proces II) całkowita ilość enzymu została związana na membranie. Prążek ten nie występuje również w próbce 4, co oznacza, że enzym nie jest wymywany z porów membrany podczas przemywania buforem (etap 2). Obserwacje te potwierdzają wyniki dotyczące zmian aktywności lizozymu w roztworach po 1 i 2 etapie procesu separacji (nie przedstawione w artykule).

Z porównania elektroforogramu dla próbek surowca przed i po obróbce wstępnej (odpowiednio próbki 1 i 2) wynika, że niektóre białka są usuwane w całości lub częściowo już na etapie obróbki wstępnej. Chociaż w obu tych próbkach obecne są także prążki dla lizozymu, to wyznaczone wartości %R enzymu (Tab. 1) wskazują, że na etapie obróbki wstępnej możliwa jest utrata pewnej ilości lizozymu.

W próbce końcowego produktu (próbka 5) nie zaobserwowano spodziewanego prążka odpowiadającego awidynie. Może to oznaczać, że białko to zostało usunięte na etapie obróbki wstępnej.

Wnioski

Chromatografia membranowa jonowymiennej jest metodą skuteczną w przypadku separacji lizozymu z białka jaja kurzego i może zostać potencjalnie wykorzystana do przemysłowej produkcji tego enzymu.

Badania wykazały, że przy zastosowaniu dwukrotnej recykulacji roztworu przez membranę adsorpcji ulega całkowita ilość zawartego w nim lizozymu.

Wyniki elektroforezy wskazują, że otrzymany tą metodą lizozym charakteryzuje się wysoką czystością, jednak dokładne określenie czystości otrzymanego produktu wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Z uwagi na zaobserwowane straty aktywności lizozymu na etapie obróbki wstępnej surowca powinna ona zostać zmodyfikowana w celu optymalizacji całego procesu.

LITERATURA

- Ghosh R., 2002. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *J. Chromatogr. A*, **952**, nr 1-2, 13-27. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00057-2
- Gołąb K., Warwas M., 2005. Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv. Clin. Exp. Med.*, **14**, nr 5, 1001-1010
- Laemmli U., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. DOI: 10.1038/227680a0
- Noh K., Imm J., 2005. One-step separation of lysozyme by reverse micelles formed by the cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide. *Food Chem.*, **93**, 95-101. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.012
- Pabby A., Rizvi S.S.H., Sastre A.M., 2009. *Handbook of membrane separations: Chemical, pharmaceutical, food, and biotechnological applications*. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Patent nr PL/EP 1746898, 2007. Erasmus C., Rossouw M.J. *Pasteryzacja jaj w skorupkach*. Uprawniony z patentu: CSIR, Pretoria, ZA
- Saxena A., Tripathi B.P., Kumar M., Shahi V.K., 2009. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Adv. Colloid Interfac.*, **145** nr 1-2, 1-22. DOI: 10.1016/j.cis.2008.07.004