

PRZEMYSŁAW RATAJCZAK, WOJCIECH BIAŁAS,
RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, WŁODZIMIERZ GRAJEK,
TOMASZ JANKOWSKI

EKSTRAKCYJA DWUFAZOWA LIZOZYMU Z BIAŁKA JAJA KURZEGO

Streszczenie

W pracy badano przydatność wodnych układów dwufazowych do separacji lizozymu z białka jaja kurzego oraz opracowano optymalne warunki procesu.

Separację lizozymu wykonano w wodnym układzie dwufazowym PEG/fosforan potasu. Stosując czysty preparat lizozymu, w doświadczeniach modelowych określono optymalne warunki jego separacji metodą płaszczyzny odpowiedzi. Zbadano wpływ wielkości masy cząsteczkowej PEG, pH roztworu fosforanów oraz stężenia chlorku sodu w układzie dwufazowym na wartość współczynnika podziału lizozymu K . Stwierdzono, że w badanym zakresie stężeń NaCl w układzie dwufazowym, wzrost stężenia chlorku sodu zwiększał wartość tego współczynnika. Z kolei wzrost pH i masy cząsteczkowej glikolu polietylenowego zmniejszał wartość współczynnika K . Największą jego wartość uzyskano w układzie: PEG 4000 (20% m/m) / K_2HPO_4 + KH_2PO_4 (25% m/m), o pH równym 6,0 i stężeniu NaCl wynoszącym $0,85 \text{ mol/dm}^3$. Zastosowanie tego układu do separacji lizozymu z białka jaja kurzego umożliwiło piętnastokrotne zwiększenie jego aktywności.

Słowa kluczowe: lizozym, białko jaja kurzego, ekstrakcja dwufazowa, PEG, fosforany, współczynnik podziału.

Wstęp

Lizozym (N-acetylmuramylhydrołaza; E.C.3.2.1.17) katalizuje hydrolizę wiązań β -1,4-glikozydowych pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetylglikozoaminą w ścianie komórek bakterii, głównie gramdodatnich, prowadząc do zniszczenia jej struktury i w efekcie końcowym do śmierci mikroorganizmu [13].

Mgr inż. P. Ratajczak, mgr inż. W. Białas, dr inż. R. Dembczyński, prof. dr hab. W. Grajek, prof. dr hab. T. Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

Dzięki tej właściwości może on być wykorzystywany jako środek antybakteryjny zwiększający bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności [4, 6]. Dotychczas w Polsce enzym ten jest stosowany jako konserwant tylko przy produkcji serów dojrzewających, zamiennie z azotanami, pod nazwą E 1105 [5].

Lizozym występuje w formie pojedynczego łańcucha polipeptydowego, składającego się ze 129 aminokwasów. Na N-końcu występuje lizyna, natomiast C-końcowym aminokwasem jest leucyna. Łańcuch polipeptydowy połączony jest za pomocą czterech mostków dwusiarczkowych [12]. Białko ma kształt zbliżony do elipsoidy o wymiarach 4,5 x 3,0 x 3,0 nm. Masa cząsteczkowa jest stosunkowo niska i wynosi około $14,4 \cdot 10^6$ Da. Lizozym ma zasadowy charakter, a wartość liczbową punktu izoelektrycznego w zależności od pochodzenia enzymu zawiera się w przedziale 9,6–11,0. Białko lizozymu odznacza się wysoką termostabilnością, szczególnie w środowisku kwaśnym [7], jest dobrze rozpuszczalne w wodzie, wodnych roztworach soli oraz tłuszczach. Ponadto lizozym jest odporny na działanie enzymów proteolitycznych takich, jak trypsyna czy pepsyna [11].

Bardzo wydajnym źródłem tego enzymu, pod względem możliwości pozyskiwania go na skalę przemysłową, jest białko jaj ptaków, a szczególnie jaja kurzego, w którym stanowi on ok. 3,5% suchej masy [16]. Aktualnie, najczęściej stosowaną metodą izolacji lizozymu z białka jaja kurzego jest wieloetapowe wytrącanie przy użyciu chlorku sodu oraz ultrafiltracja [8]. Preparaty o bardzo wysokiej czystości otrzymuje się stosując techniki chromatograficzne [10, 17].

Alternatywę dla wymienionych metod stanowi ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych (ATPS – *aqueous two-phase systems*) [1]. Układy te zbudowane są z dwóch faz bogatych w wodę i znajdujących się w stanie równowagi. Główną ich zaletą, w odniesieniu do tradycyjnych metod, są sprzyjające warunki do zachowania w stanie nienaruszonym właściwości biologicznych rozdzielanych cząstek. Podział substancji pomiędzy obie fazy jest głównie efektem określonych właściwości hydrofobowych oraz wielkości i rodzaju ładunku danej cząstki. Optymalizacja tego procesu ogranicza się z reguły do doświadczalnego określenia składu poszczególnych faz, jak również, sporadycznie na modyfikacjach struktury izolowanej molekuly np. metodami inżynierii genetycznej [9]. Wodne układy dwufazowe otrzymuje się zwykle przez zmieszanie (1) roztworu glikolu polietylenowego (PEG) z roztworem dekstranu, (2) roztworu glikolu polietylenowego z wodnym roztworem soli np. siarczanów, fosforanów, względnie (3) wodnego roztworu niejonowego związku powierzchniowo czynnego (polimery typu oksyetylen, oksypropylen), w którym po zmianie temperatury na wyższą od temperatury mętnienia lub niższą od krytycznej temperatury roztworu, następuje rozdział na dwie fazy [18].

Celem pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania wodnych układów dwufazowych do oczyszczania lizozymu z białka jaja kurzego oraz optymalizacja

procesu poprzez określenie odpowiedniego pH roztworu fosforanów, masy cząsteczkowej glikolu polietylenowego oraz stężenia NaCl w układzie separacyjnym.

Materiały i metody badań

Lizozym

Materiałem użytym do badań był lizozym (Sigma – Aldrich, USA) o aktywności 46400 U/mg oraz białko jaja kurzego pochodzące z jaj dostępnych w handlu.

Wodne układy dwufazowe

Układy dwufazowe wytworzono z przygotowanych wcześniej roztworów glikoli polietylenowych o stężeniach 27% (m/m) i mieszanin roztworów fosforanów $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ o stężeniach 25% (m/m). Wartości pH fosforanów ustalane były poprzez zmieszanie w odpowiednich proporcjach roztworów K_2HPO_4 i KH_2PO_4 . Kontroli pH dokonywano za pomocą pH-metru. Układy przygotowywano w naczyniach wirówkowych o pojemności 15 cm³. W pierwszym etapie w naczyniach umieszczano 1,5 cm³ roztworu PEG o określonej masie cząsteczkowej, po czym wprowadzano 0,5 cm³ wodnego roztworu lizozymu o stężeniu 0,4 mg/cm³ i całość dokładnie mieszano. Do powstałego roztworu dodawano 2 cm³ roztworu fosforanów o określonym pH. W przypadku badania wpływu chlorku sodu na rozdział lizozymu, dodawano NaCl w takiej ilości, by końcowe stężenie soli w układzie wynosiło odpowiednio 0,085, 0,47 i 0,85 mol/dm³. Tak wypełnione naczynie wirówkowe wytrząsano przez 3 min, a następnie wirowano (3500 obr./min, 3 min) w celu przyspieszenia rozdziału faz. Po pomiarze objętości rozdzielonych faz, dolnej i górnej, były one przenoszone do probówek typu „Eppendorf”.

Przygotowanie białka jaja kurzego do rozdziału

Białko jaja kurzego, oddzielone od żółtka, homogenizowano przez 2 godziny przy użyciu mieszadła mechanicznego (450 obr./min). Następnie homogenat filtrowano dwukrotnie przez sito o średnicy otworów 1 mm w celu usunięcia ewentualnej piany. Tak przygotowane białko rozcieńczano 50 razy (w stosunku objętościowym) i wirowano (3000 obr./min, 2 min). Rozcieńczone białko poddawano rozdziałowi w wodnych układach dwufazowych.

Rozdział białka jaja kurzego

Do układów dwufazowych wprowadzano, zamiast roztworu czystego lizozymu, pięćdziesięciokrotnie rozcieńczone białko jaja kurzego i dalej postępowano jak w

punkcie powyżej. W zebranych fazach oznaczano aktywność lizozymu i stężenie białka całkowitego, a następnie porównywano z próbą wyjściową i określano stopień oczyszczenia enzymu, korzystając z równania [8]:

Stopień oczyszczenia = (aktywność właściwa lizozymu po zagęszczeniu) / (aktywność właściwa enzymu przed zagęszczeniem)

Oznaczanie aktywności lizozymu metodą spektrofotometryczną

Aktywność enzymu oznaczano w oparciu o spektrofotometryczny pomiar zmiany absorbancji zawiesiny bakterii *Micrococcus lysodeikticus* w czasie 1 min. Liofilizowane bakterie *Micrococcus lysodeikticus* zawieszono w 0,066 molowym buforze fosforanowym o pH 6,2 w takim stężeniu, aby absorbancja mierzona przy długości fali 450 nm zawierała się w zakresie 0,55 – 0,6 (wartość początkowa A_0). Następnie do kuwety o drodze optycznej 1 cm, w której znajdowało się 2,5 cm³ przygotowanej zawiesiny bakterii o temp. 25°C, dodawano 0,1 cm³ badanej próby i po upływie 60 s odczytywano absorbancję końcową (A_k). Następnie obliczano różnicę absorbancji ΔA i korzystając z równania krzywej wzorcowej wyznaczano stężenie lizozymu. Znając aktywność wzorca obliczano aktywność w badanej próbce według równania:

Aktywność próby = aktywność wzorca x stężenie lizozymu odczytane z krzywej kalibracyjnej.

Oznaczanie zawartości białka całkowitego

Białko całkowite oznaczano metodą BCA [15]. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko polegające na tym, że w środowisku alkalicznym jony Cu^{2+} w obecności określonych aminokwasów ulegają redukcji do jonów Cu^+ , które następnie tworzą barwny kompleks z kwasem bis-cynchoninowym. Maksimum absorpcji tego kompleksu znajduje się przy $\lambda = 562$ nm. W celu wykonania oznaczenia, do szklanych probówek nalewano 2 cm³ mieszaniny roboczej, a następnie dodawano 0,1 cm³ badanej próby. Przygotowany roztwór inkubowano przez 30 min w temp. 37°C i mierzono absorbancję przy długości fali 562 nm. Stężenie białka obliczano na podstawie równania krzywej kalibracyjnej zależności absorbancji od stężenia albuminy surowicy bydlęcej.

Metoda płaszczyzny odpowiedzi w optymalizacji warunków rozdziału

Plan doświadczenia oraz pełną analizę statystyczną wykonano w oparciu o zastosowanie metody płaszczyzny odpowiedzi (ang. response surface methodology, RSM). Wszystkie obliczenia wykonano w programie komputerowym Statistica 6.0. W badaniach uwzględniono wpływ trzech czynników: pH w zakresie 6,0–9,0, stężenie

NaCl w zakresie 0,085–0,85 mol/dm³ oraz masę cząsteczkową PEG w zakresie 4000–8000. Otrzymane wyniki doświadczalne poddano transformacji postaci $y' = \log(y)$, gdzie

$y = K$, co ułatwiło przeprowadzenie analizy statystycznej. Przy wyborze modelu matematycznego, opisującego zależności pomiędzy badanymi czynnikami oraz ich wpływ na wartość współczynnika K , kierowano się rezultatem testu braku dopasowania oraz wartością poprawionego współczynnika determinacji R^2 . Wnioskowanie przeprowadzono na poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Badania modelowe z użyciem czystego preparatu lizozymu

Pierwszy etap badań stanowiły doświadczenia modelowe z użyciem czystego preparatu lizozymu (Sigma-Aldrich). Szczegółowy schemat doświadczenia wraz z wynikami w postaci średniej z trzech powtórzeń przedstawiono w tab. 1.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników (tab. 2) wskazuje, że dobrany model był wysoce istotny ($p < 0,0001$), cechował się również wysoką wartością poprawionego współczynnika determinacji ($R^2 = 0,98$). Wynik testu braku dopasowania ($p = 0,068$) wskazywał ponadto, że model ten może być wykorzystany do przewidywania zmian wartości współczynnika podziału K w założonych przedziałach wartości badanych zmiennych niezależnych. Wszystkie wartości współczynników podane w tab. 2. były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Siłę, z jaką badane czynniki oddziaływały na wielkość K , przedstawiono w postaci wykresu PARETO efektów (rys. 1).

Na podstawie przeprowadzonych obliczeń wyznaczone zostały ponadto równania regresji współczynnika podziału K :

- PEG 4000 $\log(K) = 3,4958 - 0,9232a + 2,384b + 0,0576a^2$,
- PEG 6000 $\log(K) = 3,4218 - 0,9232a + 2,384b + 0,0576a^2$,
- PEG 8000 $\log(K) = 3,3590 - 0,9232a + 2,384b + 0,0576a^2$,

gdzie a – wartość pH, b – stężenie NaCl.

Wartości liczbowe wyrazów wolnych w powyższych równaniach regresji wskazywały na istotny, lecz bardzo mały wpływ masy cząsteczkowej PEG na podział badanego białka. Zmiana masy glikolu polietylenowego z 4000 na 8000 Da ($C_{\text{NaCl}} 0,085$ mol/dm³, pH 6,0) powodowała spadek wartości K o około 0,46. Z danych literaturowych wynika, że białka o niskiej masie cząsteczkowej szybciej migrują do fazy glikolu polietylenowego, a istotny wpływ na to zjawisko wywiera również masa cząsteczkowa polimerów tworzących poszczególne fazy [1]. Zależność ta ma charakter odwrotny, tj. im mniejsza jest masa cząsteczkowa glikolu tym większy jest

współczynnik podziału K. Lizozym jako białko o niskiej masie cząsteczkowej ($14,4 \cdot 10^3$ Da) zachowywał się zgodnie z tą regułą i gromadził się przede wszystkim w fazie górnej (PEG). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku taumatyny, białka o nieznacznie większej masie cząsteczkowej ($22 \cdot 10^3$ Da) i identycznym punkcie izoelektrycznym, separowanego

Tabela 1

Plan doświadczenia (pH, stężenie NaCl, masa PEG) oraz wartości współczynnika podziału lizozymu (K) w wodnych układach dwufazowych PEG/fosforan potasu.

The experiment plan (pH, concentration of NaCl, molecular weight of PEG) and values of the (K) partition coefficient for lysozyme in aqueous two-phase systems of PEG/potassium phosphate.

Lp. No.	pH	Stężenie NaCl Concentration of NaCl [mol·dm ³]	Masa cząsteczkowa PEG Molecular weight of PEG	Wartość K 'K' coefficient value	log K
1	6,0	0,085	4000	1,31	0,117
2	6,0	0,085	6000	1,60	0,204
3	6,0	0,085	8000	1,09	0,037
4	6,0	0,470	4000	19,07	1,280
5	6,0	0,470	6000	13,88	1,142
6	6,0	0,470	8000	13,94	1,144
7	6,0	0,850	4000	85,66	1,933
8	6,0	0,850	6000	84,33	1,926
9	6,0	0,850	8000	80,64	1,907
10	7,5	0,085	4000	0,98	-0,009
11	7,5	0,085	6000	0,73	-0,137
12	7,5	0,085	8000	0,67	-0,174
13	7,5	0,470	4000	8,56	0,932
14	7,5	0,470	4000	9,34	0,970
15	7,5	0,470	4000	8,02	0,904
16	7,5	0,470	4000	9,10	0,959
17	7,5	0,470	4000	8,43	0,926
18	7,5	0,470	6000	9,10	0,959
19	7,5	0,470	6000	6,97	0,843
20	7,5	0,470	6000	8,68	0,939
21	7,5	0,470	6000	8,25	0,916
22	7,5	0,470	6000	5,36	0,729
23	7,5	0,470	8000	5,73	0,758
24	7,5	0,470	8000	6,97	0,843
25	7,5	0,470	8000	6,62	0,821
26	7,5	0,470	8000	6,46	0,810
27	7,5	0,470	8000	5,00	0,699
28	7,5	0,850	4000	72,75	1,862
29	7,5	0,850	6000	75,42	1,877
30	7,5	0,850	8000	17,62	1,246
31	9,0	0,085	4000	1,48	0,170

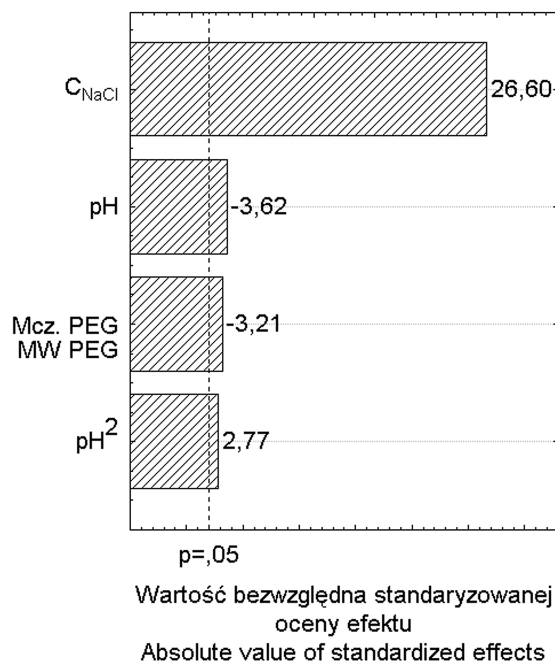
32	9,0	0,085	6000	0,84	-0,076
33	9,0	0,085	8000	1,09	0,037
34	9,0	0,470	4000	11,86	1,074
35	9,0	0,470	6000	5,95	0,775
36	9,0	0,470	8000	6,58	0,818
37	9,0	0,850	4000	57,0	1,756
38	9,0	0,850	6000	18,92	1,277
39	9,0	0,850	8000	56,73	1,754

Tabela 2

Analiza wariancji zredukowanego modelu kwadratowego.

The variance analysis of a reduced quadratic model.

Źródło Source	Suma kwadratów Sum of squares	Stopnie swobody Degree of freedom	Średni kwadrat Mean square	Wartość F F Value	Prawdopodobieństwo Probability
Model	13,903	5	2,781	359,32	< 0,0001
pH	0,141	1	0,141	18,22	0,0002
C _{NaCl}	13,108	1	13,108	1693,86	< 0,0001
M.cz. PEG MW PEG	0,117	2	0,058	7,55	0,0021
pH ²	0,154	1	0,154	19,86	0,0001
Reszta Residual	0,240	31	0,008		
Brak dopasowania Lack of Fit	0,189	19	0,010	2,33	0,0682
Czysty błąd Pure Error	0,051	12	0,004	-	-



Rys. 1. Wykres PARETO efektów.

Fig. 1. The Pareto chart of effects.

z homogenatu bakterii *Escherichia coli* w układach dwufazowych typu PEG/dekstran oraz PEG/fosforany [3]. Wpływ masy cząsteczkowej glikolu zwiększa się ze wzrostem masy cząsteczkowej izolowanego białka. Badania nad rozdziałem α -amylazy ($48 \cdot 10^3$ Da) w układach PEG/fosforany wykazały, że wraz ze wzrostem masy glikolu z 1500 do 6000 Da następował blisko 170-krotny spadek wartości współczynnika podziału K [14].

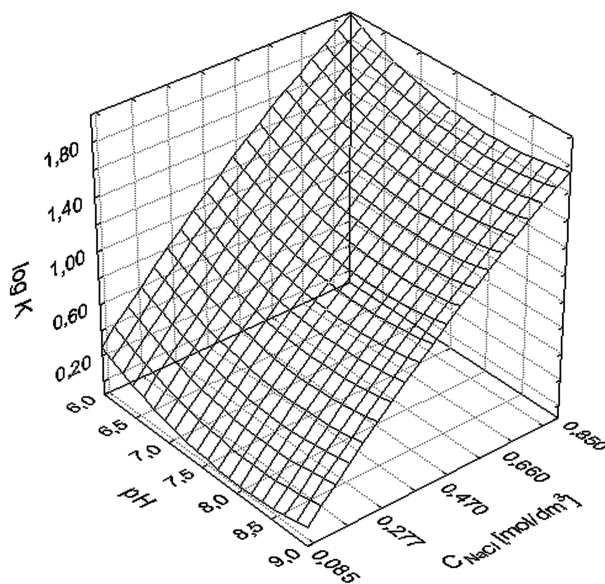
W badanych układach stopień zagęszczenia lizozymu w fazie górnej, wyrażony za pomocą współczynnika podziału K, był bardzo zróżnicowany, a jego wartość wahała się od 0,67 do 85,66. Czynniki, które wpływały w sposób wysoce istotny na kierunek migracji lizozymu było przede wszystkim stężenie chlorku sodu oraz w mniejszym stopniu pH fazy dolnej badanych układów (rys. 2). Najmniejsze zagęszczenie enzymu w fazie glikolu odnotowano w układach o najniższym z badanych stężeń NaCl ($0,085 \text{ mol/dm}^3$). Zwiększenie stężenia z $0,085 \text{ mol/dm}^3$ do $0,85 \text{ mol/dm}^3$ powodowało około 100-krotny wzrost wartości K, niezależnie od masy cząsteczkowej glikolu polietylenowego (rys. 3). Podobne zmiany wielkości wartości współczynnika podziału zaobserwowano podczas ekstrakcji lizozymu z transgenicznego tytoniu w układach PEG/fosforany, w których stężenie NaCl wynosiło $1,0 \text{ mol/dm}^3$ [2]. Również w przypadku wspomnianych powyżej badań nad migracją α -

amylazy w układach PEG/fosforany, stwierdzono, że 8,8% stężenie (m/m) chlorku sodu powoduje blisko 77-krotny wzrost współczynnika podziału [14]. Na podstawie badań modelowych, prowadzonych na czystych roztworach określonych białek stwierdzono, że dodatek obojętnej soli, np. chlorku sodu, powoduje wzrost współczynnika podziału dodatnio naładowanych białek [3].

Zjawisko to tłumaczy się w ten sposób, że wprowadzona do układu sól ulega dysocjacji na jony, które gromadzą się przy powierzchni międzyfazowej, tworząc podwójną warstwę elektryczną. W zależności od wielkości współczynników podziału kationów i anionów, powierzchnia podwójnej warstwy elektrycznej od strony np. fazy górnej będzie dodatnia bądź ujemna [18].

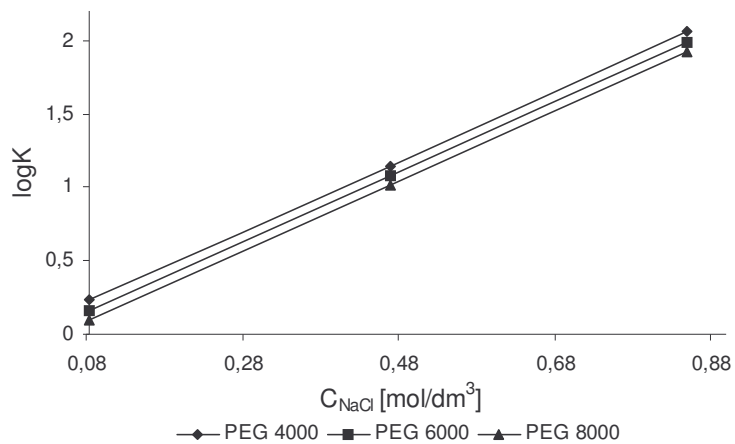
W przypadku chlorku sodu współczynnik podziału anionów jest większy niż kationów, zatem badane białka, mające w podanych warunkach pH ładunek dodatni, będą preferencyjnie przeciągane do fazy górnej, na skutek oddziaływań elektrostatycznych z jonem chlorkowym.

Analiza zmian wielkości współczynnika podziału w zależności od pH wykazała, że w zakresie pH od 6,0 do 7,5 następował wyraźny spadek stężenia lizozymu w fazie glikolu polietylenowego. Powyżej pH 7,5 odnotowano natomiast niewielki jego wzrost (rys. 4). Zależność ta występowała bez względu na stężenie NaCl i masę cząsteczkową PEG.



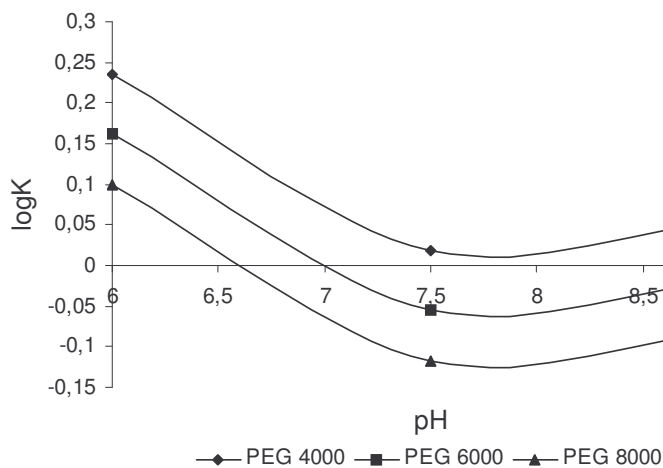
Rys. 2. Wykres powierzchni odpowiedzi współczynnika podziału K w funkcji pH i stężenia chlorku sodu (M.cz. PEG 4000).

Fig. 2. The response surface diagram of 'K' partition coefficient as a function of pH and sodium chloride concentration (MW PEG = 4000).



Rys. 3. Wartość współczynnika podziału K w zależności od stężenia chlorku sodu (PEG 4000, 6000, 8000; pH = 6,0).

Fig. 3. The 'K' coefficient values depending on the NaCl concentration (PEG 4000, 6000, 8000; pH = 6,0).



Rys. 4. Wartość współczynnika podziału K w zależności od pH (PEG 4000, 6000, 8000; $C_{NaCl} = 0,085$ mol/dm³).

Fig. 4. The 'K' coefficient values depending on pH values (PEG 4000, 6000, 8000; $C_{NaCl} = 0,085$ mol/dm³).

Na podstawie wyników wykonanych doświadczeń wytypowano układ, w przypadku którego współczynnik podziału był największy w badanym zakresie zmiennych: PEG (20% m/m) / K_2HPO_4 + KH_2PO_4 (25% m/m), pH 6,0 i stężenie NaCl wynoszące $0,85 \text{ mol/dm}^3$.

Oczyszczanie lizozymu z białka jaja kurzego

W drugim etapie doświadczeń wykorzystano zoptymalizowany układ dwufazowy PEG/fosforany do separacji lizozymu z białka jaja kurzego. Wyniki tych badań przedstawiono w tab. 3.

Otrzymano roztwór lizozymu w glikolu polietylenowym o 15-krotnym stopniu oczyszczenia w stosunku do wyjściowego białka jaja. Taki stopień oczyszczenia jest porównywalny z metodami membranowymi. Kijowski i wsp. [8] otrzymali preparaty lizozymu o 17-krotnym stopniu oczyszczenia stosując membranę ultrafiltracyjną o punkcie odcięcia $100 \cdot 10^3 \text{ Da}$. Aktywność preparatu lizozymu uzyskanego za pomocą technik membranowych wynosiła 12300 U/mg , czyli była o blisko 1500 jednostek niższa od aktywności lizozymu zagęszczonego metodą ekstrakcji w wodnych układach dwufazowych typu PEG/fosforany stosowanych w prezentowanej pracy.

Tabela 3

Separacja lizozymu z białka jaja kurzego w układzie dwufazowym PEG 20% (m/m) / $K_2HPO_4+KH_2PO_4$ 25% (m/m) o pH 6,0 i stężeniu NaCl $0,85 \text{ mol/dm}^3$.

The separation of lysozyme from egg white in aqueous two-phase system of PEG 20% (w/w) / $K_2HPO_4+KH_2PO_4$ 25% (w/w) at: pH = 6,0, and NaCl concentration = $0,85 \text{ mol/dm}^3$.

Surowiec Raw material	Objętość Volume [cm^3]	Białko całkowite Total protein [mg]	Aktywność całkowita Total activity [U/cm^3]	Aktywność specyficzna Specific activity [U/mg]	Wzrost aktywności Activity increase
Białko jaja Egg white	0,5	$0,85 \pm 0,06$	$1557 \pm 44,5$	$911 \pm 56,3$	1
Frakcja PEG Fraction of PEG	1,5	$0,083 \pm 0,004$	$771 \pm 18,2$	$13895 \pm 453,7$	$15,1 \pm 0,86$

Porównując nowoczesne metody izolacji lizozymu z białka jaja kurzego należy zaznaczyć, że ekstrakcja w wodnych układach dwufazowych jest procesem szybkim i zarazem najtańszym, a poza tym pozwala uzyskać podobne rezultaty jak wymienione

wyżej metody membranowe i chromatograficzne. Istotną zaletą ekstrakcji w układach dwufazowych jest ponadto łatwość powiększania skali. Celem dalszych badań powinno być jeszcze większe zagęszczenie lizozymu i jego oddzielenie od glikolu polietylenowego poprzez zastosowanie wtórnego układu dwufazowego.

Wnioski

1. Spośród trzech badanych zmiennych: pH, stężenie NaCl i masa cząsteczkowa glikolu polietylenowego, największy wpływ na migrację lizozymu do fazy górnej (PEG) ma stężenie chlorku sodu w układzie separacyjnym. Wykazano, że zwiększenie siły jonowej roztworu poprzez zwiększenie stężenia NaCl do wartości $0,85 \text{ mol/dm}^3$, zwiększyło stukrotnie wartość współczynnika podziału lizozymu.
2. Przy wzroście masy cząsteczkowej PEG z 4000 Da do 8000 Da maleje powinowactwo lizozymu do fazy glikolu polietylenowego.
3. Największe powinowactwo lizozymu do fazy glikolu polietylenowego występuje przy $\text{pH} = 6$.
4. Stopień oczyszczenia lizozymu metodą ekstrakcji dwufazowej z użyciem układu PEG/fosforany jest porównywalny z technikami membranowymi.
5. Największą wartość liczbową współczynnika podziału lizozymu uzyskano w odniesieniu do układu: 20% (m/m) PEG 4000, 25% $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ (m/m), $\text{pH} 6,0$ i $\text{NaCl } 0,85 \text{ mol/dm}^3$.

Literatura

- [1] Albertsson P.A.: Partition of cells particles and macromolecules. Ed. Wiley, New York 1986.
- [2] Blasubramaniam D., Wilkinson C., van Cott K., Zhang Ch.: Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *J. Chromat.*, 2003, **989**, 119-129.
- [3] Cascone O., Andrews A., Asenjo J.A.: Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, **13**, 629-635.
- [4] Cunningham F.E., Proctor V.A., Goetsch S.I.: Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World. Poultry Sci. J.*, 1991, **47**, 142-169.
- [5] Rozporządzenie MZ z dn. 23.04.2004 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych i substancji pomagających w przetwarzaniu. *Dz. U.* 2004. Nr 94, poz. 933.
- [6] Kijowski J., Leśniewski G.: Metody badania aktywności enzymatycznej oraz oznaczanie ilościowe lizozymu z białka jaja kurzego. *Przem. Spoż.*, 1995, **12**, 476-479.
- [7] Kijowski J., Leśniewski G.: Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności, w diagnostyce medycznej i farmakologii. *Biotechnologia*, 1995, **2**, 130 - 140.
- [8] Kijowski J., Leśniewski G., Fabisz-Kijowska A.: Lysozyme polymer formation and functionality of residuals after lysozyme extraction. In: *Egg nutrition and biotechnology*. J. S. Sim, S. Nakai, W. Guenter eds. CAB International Wallingford, 2000, 269-285.
- [9] Kohler K., Ljungquist C., Kondo A., Veide A., Nilsson B.: Engineering proteins to enhance their partition coefficients in aqueous two-phase systems. *Biotechnol.*, 1991, **9**, 642-646
- [10] Leśniewski G.: Otrzymywanie lizozymu z białka jaja kurzego metodami krystalizacji, ultrafiltracji oraz z użyciem wymiennicza jonowego. Praca doktorska AR w Poznaniu, 1997.

- [11] Panfil-Kuncewicz H.: Charakterystyka lizozymu i możliwości jego zastosowania w przemyśle spożywczym. *Żyw. Człow. Metab.*, 1988, **15**, 218-222.
- [12] Proctor V.A., Cunningham F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci.*, 1988, **26**, 359-360.
- [13] Schlegel H.G.: *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa 1996.
- [14] Schmidt A.S., Ventom A.M., Asenjo A.J.: Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**, 131-141.
- [15] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, **150**, 76-85.
- [16] Trziszka T., Kopeć W.: Lizozym - fenomenalny składnik białka jaja. *Drobiarstwo*, 1996, **3**, 43-44.
- [17] Vaidya A.A., Lele B.S., Kulkarni M.G., Mashelkar R.A.: Thermoprecipitation of lysozyme from egg white using copolymers of N-isopropylacrylamide and acidic monomers. *J. Biotechnol.*, 2001, **87**, 95-107.
- [18] Zielińska-Dawidziak M., Jankowski T.: Separacja produktów biotechnologii w wodnych układach dwufazowych. *Biotechnologia*, 2002, **56**, 142-152.

AN AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION OF LYSOZYME FROM EGG WHITE

S u m m a r y

The objective of this paper was to determine the usefulness and effectiveness of aqueous two-phase systems (ATPS) applied to separate lysozyme from egg white. The lysozyme separation was carried out in a system composed of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate. In the model experiments with pure lysozyme, the optimal process parameters were evaluated. Additionally, the effects of the PEG molecular weight, pH of phosphate solution, and NaCl concentration on the value of the 'K' lysozyme partition coefficient were investigated. It was found that with regard to the NaCl concentration range investigated, within this particular two-phase system, the increase in the sodium chloride concentration caused the increase in the value of 'K' coefficient. Contrary to this, the increase in the 'PEG' molecular weight and in pH values of the phosphate solution caused a decrease in the lysozyme partition coefficient in ATPS. The highest lysozyme separation parameters were obtained in the system: PEG 4000 (20% w/w)/ $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ (25% w/w), with the pH level of 6,0, and the NaCl concentration of 0,85 M.

The 15-fold increase of lysozyme activity was obtained when the optimal conditions of ATPS, as determined during the model experiments, were applied to the separation of lysozyme from egg white.

Key words: lysozyme, egg white, ATPS, PEG, phosphate, partition coefficient. ☒