

RADOSŁAW DEMBCZYŃSKI, ALEKSANDRA M. DOLATA,
KINGA BOMB CZYŃSKA, WOJCIECH BIAŁAS, TOMASZ JANKOWSKI

SEPARACJA LAKTOFERYNY Z SERWATKI W EKSTRAKCYJNYCH UKŁADACH TRÓJFAZOWYCH

Streszczenie

Do separacji laktoferyny z serwatki zastosowano ekstrakcję w układach trójfazowych. W pracy zbadano 72 warianty układów trójfazowych, które różniły się stopniem wysycenia serwatki siarczanem amonu, pH oraz objętościowym stosunkiem serwatki do tert-butanolu. W powstałych fazach oznaczono stężenie laktoferyny i zawartość białka ogólnego w celu wyznaczenia parametrów separacji, takich jak: stopień oczyszczenia oraz wydajność odzysku laktoferyny. Na podstawie uzyskanych doświadczalnie parametrów separacji opracowano model matematyczny. Ustalony na jego podstawie optymalny układ trójfazowy składał się z serwatki o pH 10 wysyczonej w 35 % siarczanem amonu, natomiast objętościowy stosunek serwatki do tert-butanolu wynosił 1 : 0,5. Takie warunki ekstrakcji umożliwiały uzyskanie w fazie dolnej układu trójfazowego preparatu laktoferyny o stopniu oczyszczenia wynoszącym około 3. Wydajność ekstrakcji laktoferyny w tej fazie była równa 26 %.

Słowa kluczowe: układ trójfazowy, laktoferyna, serwatka, tert-butanol, ekstrakcja

Wprowadzenie

Laktoferyna (LF) jest jednym z białek o właściwościach bioaktywnych wchodzących w skład białek serwatkowych. Jej stężenie w serwatce mleka wynosi od 50 do 120 mg/dm³ [12, 14, 27]. Białko to występuje również w wydzielinach innych niż mleko, takich jak: łzy, pot, ślina, a także w wielu narządach, błonach surowiczych oraz w drugorzędowych ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych u ssaków [1, 15]. Laktoferyna należy do grupy transferyn i jest glikoproteiną o budowie monomerycznej, której łańcuch polipeptydowy o masie 80 000 Da składa się z dwóch kulistych płatów połączonych regionem zawiasowym [22]. Funkcje laktoferyny związane są z mechanizmami naturalnej odporności organizmu. Wykazuje ona właściwości bakteriostatycz-

Dr inż. R. Dembczyński, mgr inż. A. M. Dolata, mgr inż. K. Bombczyńska, dr inż. W. Białas, prof. dr hab. T. Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

ne, bakteriobójcze, antywirusowe, immunomodulujące, przeciwgrzybiczne i przeciw-pasożytnicze, a także przeciwnowotworowe oraz przeciwzapalne [15, 23]. Laktoferyna jest przeciwutleniaczem, ma aktywność prokoagulanta nowotworowego, rybonukleazy, proteazy, a *in vitro* wykazuje działanie czynnika aktywowującego transkrypcję kilku genów [16, 29].

Laktoferyna (bLF) jest izolowana na skalę przemysłową od 1985 r. głównie z mleka i z serwatki. Szacuje się, że jej roczna światowa produkcja wynosi 60 - 79 t. Białko to znajduje zastosowanie w kosmetyce, produkcji preparatów odżywczych dla niemowląt oraz jako suplement produktów mlecznych (np. chudego mleka, jogurtów). Preparaty laktoferyny mają także formę tabletek [28, 29].

Ze względu na denaturację laktoferyny surowce do jej produkcji nie mogą być poddawane pasteryzacji. Najczęstszym sposobem otrzymywania preparatów zawierających bLF przez firmy produkujące suplementy jest wykorzystanie chromatografii kationowymiennej [29]. Izolacja laktoferyny od innych białek jest możliwa, gdyż dwa główne białka serwatki (α -laktoalbumina i β -laktoglobulina) mają inne punkty izoelektryczne (pI). Zastosowanie odpowiedniego pH powoduje, że laktoferynę można związać na wymienniczu jonowym, a następnie eluować jako osobną frakcję z powierzchni wymiennicza przy użyciu roztworu soli o odpowiednim stężeniu [18].

W procesach oczyszczania laktoferyny stosowane są też różne modyfikacje chromatografii powinowactwa, w tym specjalnie dobrane ligandy. Wykorzystuje się m.in. metale przejściowe (miedź) i różnego rodzaju związki chemiczne o charakterze anionów, takie jak: heparyna, cząsteczki DNA oraz specyficzne przeciwciała. Dotychczas wymienione metody stosowano jedynie w skali laboratoryjnej, podobnie jak filtrację żelową i chromatografię oddziaływań hydrofobowych [13, 29].

Tradycyjne metody chromatograficzne cechuje wiele niedogodności związanych z dużymi objętościami serwatki i znaczną koncentracją w nich białek, zanieczyszczeniami, długimi cyklami oraz spadkiem ciśnienia wzdłuż kolumny chromatograficznej i skomplikowanym procesem kontrolnym [20]. Chromatografia z żywicą jonowymienną jest procesem kosztownym, co sprawia że otrzymana za jej pomocą LF o czystości 98 % osiąga przeciętną cenę 1 USD za 1 g [19]. Dlatego modyfikuje się te metody w celu uproszczenia procedury, powiększenia skali i obniżenia kosztów. Służy temu np. adsorpcyjna chromatografia membranowa [20] oraz membranowa chromatografia powinowactwa [31]. W celu obniżenia kosztów otrzymywania LF próbowano także zastosować wstępną izolację LF z mleka za pomocą frakcjonowania z wytworzeniem piany [19]. Proces miał na celu zwiększenie koncentracji rozpuszczonych cząsteczek konkretnego białka.

Uzyskanie z serwatki laktoferyny o wysokiej czystości przy użyciu konwencjonalnych metod chromatograficznych jest dodatkowo utrudnione ze względu na występowanie razem z nią laktoperoksydazy, której cząsteczka niewiele różni się pod

względem masy i pI. Rozwiązanie tego problemu zaproponowali Ng i Yoshitake [18], którzy zastosowali dwustopniową izokratyczną elucję. W ostatnim czasie powstała także koncepcja rozdziału białek z użyciem magnetycznych wymienników jonowych [5]. Zaletami tej metody są duża objętościowa przepustowość i brak większych zakłóceń związanych z zanieczyszczeniami występującymi w surowcu.

Metodą, która do tej pory nie była wykorzystywana do izolacji laktoferyny, jest separacja w układach trójfazowych (ang. three-phase partitioning – TPP). Jej zaletami, w przeciwieństwie do metod chromatograficznych, są: niski koszt separacji oraz łatwość powiększania skali procesu. Układ trójfazowy tworzy się zwykle po dodaniu tert-butanolu (t-butanolu) do wodnego roztworu mieszaniny białek (w której znajduje się separowane białko), a następnie siarczanu amonu [6]. Celem tej metody jest wytrącenie separowanej substancji (składnika mieszaniny) w interfazie (fazie środkowej), tworzącej się pomiędzy górną fazą organiczną a dolną nieorganiczną (będącą wodnym roztworem soli) lub preferencyjne przeprowadzenie separowanej substancji do fazy dolnej z jednoczesnym strąceniem pozostałych białek w interfazie [21].

Celem pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania układów trójfazowych do separacji laktoferyny z serwatki oraz optymalizacja tego procesu poprzez określenie odpowiedniego pH serwatki, stężenia siarczanu amonu oraz stosunku objętości serwatki do tert-butanolu w układzie separacyjnym.

Material i metody badań

Serwatkę otrzymano z niepasteryzowanego mleka, które poddano wirowaniu w celu usunięcia tłuszczu ($4566 \times g$, 15 min). Odtłuszczone mleko podgrzano do temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i dodawano enzym Fromase 750 TL ($300\ \mu\text{l}$ enzymu do $1\ \text{dm}^3$ mleka). Wydzielony skrzep oddzielano od serwatki podczas wirowania w wirówce sedimentacyjnej o działaniu ciągłym ($12\ 000 \times g$, Ceba Z61, Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Niemcy). Otrzymałą serwatkę zagęszczano w ultrafiltrze (moduł płaski) o punkcie odcięcia $10\ 000\ \text{Da}$.

Układy trójfazowe uzyskiwano po zmieszaniu w probówce o pojemności 15 ml odpowiedniej objętości serwatki wysyczonej siarczanem amonu (20, 40 lub 60 %, m/v) z tert-butanolem. Stosunek objętości serwatki do tert-butanolu wynosił 1 : 0,5; 1 : 1 lub 1 : 2. Przed przystąpieniem do formowania układu trójfazowego kwasowość serwatki regulowano za pomocą H_2SO_4 i NH_4OH w celu uzyskania pH: 3; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9 lub 10. Składniki układu mieszano w probówce, następnie zostawiano w temp. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 1 h, a po tym czasie próbki wirowano ($3452 \times g$, 10 min). Po wytworzeniu się układu trójfazowego zapisywano objętości fazy górnej, środkowej i dolnej, a następnie je rozdzielano. Fazę środkową rozpuszczano w jak najmniejszej objętości wody dejonizowanej. W każdej z faz oznaczano zawartość białka ogólnego oraz stężenie laktoferyny. Przed analizą laktoferyny w fazach górnych próby odpowiednio przygotowywano.

Usuwno z nich tert-butanol (za pomocą chromatografii sitowej) oraz zagęszczano (susząno sublimacyjnie i rozpuszczano w 500 μl wody dejonizowanej). Wszystkie próbki analizowano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki uśredniano.

Białko ogólne oznaczano za pomocą metody BCA [26], w której wykorzystuje się zjawisko redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ w środowisku zasadowym w obecności określonych aminokwasów, a następnie tworzenia się barwnego kompleksu jonów Cu^+ z kwasem bis-cynchroninowym. Ilość barwnego kompleksu, powstałego po 30 min inkubacji mieszaniny reakcyjnej (Bicinchronic Acid Kit, Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) z badaną próbą w temp. 37 °C, mierzono za pomocą spektrofotometru ($\lambda = 562$ nm). Stężenie białka obliczano na podstawie równania krzywej kalibracyjnej zależności absorbancji od stężenia albuminy surowicy bydłowej.

Stężenie laktoferyny oznaczano za pomocą HPLC. Do analiz zastosowano kolumnę jonowymienną Shodex IEC SP-825 (75 mm \times 8 mm). Detekcję prowadzono przy fali o długości $\lambda = 280$ nm. Temp. rozdziału wynosiła 40 °C. Próby podawano na szczyt kolumny w ilości 100 μl . Szybkość przepływu fazy ruchomej była równa 0,6 ml/min. Zastosowano rozdział gradientowy o następującym układzie: 0 min 0 % B, 33 min 60 % B, 35 min 100 % B, 40 min 100 % B, 42 min 0 % B, 47 min 0 % B. Fazą A był bufor fosforanowy (0,05 mol/dm³; pH 6,5), natomiast fazą B bufor fosforanowy (0,05 mol/dm³; pH 6,5) zawierający NaCl o stężeniu 2 mol/dm³.

W celu usunięcia tert-butanolu z faz górnych układów trójfazowych zastosowano chromatografię sitową. Używano chromatografu AKTA Explorer Air (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Szwecja) wyposażonego w kolumnę wypełnioną żelem Sephadex G-25 (objętość kolumny 64 ml). Fazą ruchomą była woda dejonizowana. Detekcję prowadzono przy fali o długości $\lambda = 280$. Objętość próby podawanej do kolumny wynosiła 2000 μl .

Frację białkową po chromatografii sitowej susząno sublimacyjnie przy użyciu liofilizatora Christ Beta 1.16 (Martin Christ, Niemcy). Próby zamrażano w temp. -80 °C, a następnie susząno przez 48 h (suszenie właściwe 40 h i dosuszanie 8 h). Temp. półki w trakcie suszenia właściwego wynosiła 15 °C (ciśnienie w komorze suszenia 10 Pa), a w trakcie dosuszania 25 °C (bez kontroli ciśnienia).

Na podstawie przeprowadzonych analiz zawartości białka ogólnego oraz stężenia laktoferyny wyznaczano parametry ekstrakcji, takie jak: stopień oczyszczenia (PF) i procentową wydajność ekstrakcji (Y%). Stopień oczyszczenia obliczano według równania:

Stopień oczyszczenia (PF) = (stężenia laktoferyny w danej fazie po ekstrakcji \times zawartość białka ogólnego w serwatce przed ekstrakcją) / (zawartość białka ogólnego w danej fazie po ekstrakcji \times stężenie laktoferyny w serwatce przed ekstrakcją).

Procentową wydajność ekstrakcji określano zgodnie z równaniem:

Procentowa wydajność ekstrakcji ($Y\%$) = (stężenia laktoferyny w danej fazie po ekstrakcji \times objętość tej fazy) / (stężenie laktoferyny w serwatce przed ekstrakcją \times objętość serwatki poddanej ekstrakcji) \times 100.

Parametry ekstrakcji, wyznaczone na podstawie eksperymentów (PF i $Y\%$), poddano analizie statystycznej w celu określenia wpływu wysycenia serwatki siarczanem amonu (X_1), pH serwatki (X_2) oraz stosunku objętości serwatki do tert-butanolu (X_3) na proces ekstrakcji laktoferyny. Analizowane parametry ekstrakcji (zmiennie zależne), jak stopień oczyszczenia oraz wydajność odzysku laktoferyny, są wskaźnikami wybieranymi najczęściej do oceny skuteczności ekstrakcji białek w układach trójfazowych [4, 17]. Na podstawie danych eksperymentalnych dla każdej zmiennej zależnej wyznaczano metodą regresji krokowej wstecznej równania wielomianu o ogólnej postaci:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_k X_k + b_{12} X_1 X_2 + \dots + b_{1-k,k} X_{k-1} X_k + b_{11} X_1^2 + \dots + b_{kk} X_k^2$$

gdzie: Y to zmienna zależna, natomiast b_0 , b_k , $b_{k-1,k}$ i b_{kk} to odpowiednio współczynniki określające wyraz wolny, efekty główne, ich interakcję oraz wyrazy kwadratowe. W trakcie opracowywania modeli regresji, wartości zmiennych zależnych (wymienione wyżej parametry ekstrakcji) poddano transformacji logarytmicznej zgodnie z równaniem:

$$Y' = \log_{10}(Y)$$

gdzie: Y' to zmienna transformowana, natomiast Y to zmienna zależna w postaci pierwotnej. Typ transformacji ustalono na podstawie wyników testu Box-Cox, stanowiącego narzędzie wspomagające procedury wyboru formy funkcyjnej modeli regresji w przypadku wykrycia nieprawidłowości związanych z występowaniem korelacji pomiędzy średnią a wariancją [3]. Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica 6.0 PL.

Wyniki i dyskusja

W doświadczeniach przetestowano 72 warianty układów trójfazowych. Po zmieszaniu składników i separacji faz każdy układ zawierał fazę górną (fg), fazę środkową (fs) oraz fazę dolną (fd). Statystyczną ocenę wykonano w odniesieniu do dolnych i środkowych faz układów trójfazowych. Natomiast w fazach górnych sporadycznie wykrywano śladowe ilości laktoferyny, dlatego nie było możliwe przeprowadzenie analizy regresji. Należy jednak podkreślić, że obecność laktoferyny w tej fazie układów byłaby niepożądana. Fazy górne składały się głównie z tert-butanolu, stąd ewentualnie znajdująca się w nich laktoferyna wymagałaby skomplikowanych i kosztownych zabiegów zmierzających do oddzielenia jej od tert-butanolu. Zwykle fazy górne (zwane fazami organicznymi) zawierające tert-butanol nie są brane pod uwagę i analizowane [4, 30] jako frakcje zawierające lipofilne zanieczyszczenia ekstraktów [7]. Przeprowadzona analiza zawartości laktoferyny w fazach górnych po usunięciu tert-

butanolu (za pomocą chromatografii sitowej i suszenia sublimacyjnego) potwierdziła, że fazy te praktycznie nie zawierały laktoferyny, a tym samym nie występował problem strat tego białka wynikający z jego migracji.

Oceną statystyczną wpływu poszczególnych zmiennych na parametry ekstrakcji w postaci wartości F oraz prawdopodobieństwa wyznaczonego podczas analizy wariancji przedstawiono w tab. 1. Zarówno modele opisujące ekstrakcję w fazach środkowych, jak i w dolnych, są istotne statystycznie. Wielkości skorygowanego współczynnika determinacji wskazują, że zmienne niezależne uwzględnione w modelach wyjaśniają zmienność parametrów ekstrakcji w 73 - 80 %. Oznacza to, że poza badanymi istnieją także inne czynniki nieuwzględnione w modelu, które w pewnym stopniu wpływają na stopień oczyszczenia i wydajność ekstrakcji w badanych układach trójfazowych. Na podstawie danych przedstawionych w tab. 1. można stwierdzić, że parametry ekstrakcji (zmienne zależne) w sposób istotny zależą od stężenia siarczanu amonu, pH oraz stosunku serwatki do tert-butanolu. Istotne znaczenie ma też interakcja pomiędzy stężeniem siarczanu amonu i pH oraz pomiędzy stosunkiem objętości serwatki do tert-butanolu a stężeniem siarczanu amonu i pH. Współczynniki równań opisujących proces ekstrakcji w fazach środkowych i dolnych układów trójfazowych przedstawiono w tab. 2.

Spośród zbadanych zmiennych niezależnych, wysycenie siarczanem amonu jest uważane za jeden z głównych czynników wpływających na ekstrakcję w układach trójfazowych [25]. W fazach środkowych zmiany zarówno stopnia oczyszczenia (PF), jak i wydajności odzysku laktoferyny (R%) wykazywały podobną w przebiegu zależność od stężenia siarczanu amonu w serwatce (rys. 1). W badanym zakresie stężeń siarczanu amonu najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku średnich wielkości wysycenia serwatki. Skrajnie małe bądź duże stężenia siarczanu amonu powodowały zmniejszenie wielkości parametrów ekstrakcji. W literaturze na temat ekstrakcji białek w układach trójfazowych odnotowuje się, że PF oraz R% mogą osiągać wielkości maksymalne przy tym samym stopniu wysycenia solą [4, 10] względnie, że korzystniejsze jest większe stężenie soli do zwiększenia wydajności odzysku aniżeli do podwyższenia stopnia oczyszczenia [17].

Jeszcze inny przebieg stopnia oczyszczenia i wydajności odzysku w zależności od stężenia siarczanu amonu stwierdzono w fazach dolnych badanych układów trójfazowych (rys. 2). Stopień oczyszczenia był najwyższy przy średnich stężeniach siarczanu amonu, natomiast wydajność odzysku wyraźnie zmniejszała się ze wzrostem wysycenia serwatki siarczanem amonu. Powyżej 40-procentowego stężenia siarczanu amonu laktoferyna w coraz większych ilościach migrowała do fazy środkowej układów trójfazowych, stąd zmniejszała się wydajność jej odzysku w fazach dolnych. Dla optymalnego stężenia siarczanu amonu (40 %) maksymalne wielkości stopnia oczyszczenia laktoferyny w fazach dolnych były wyższe niż w fazach środkowych. Przyczyną było

Tabela 1

Ocena istotności wpływu zmiennych niezależnych (wysycenia serwatki siarczanem amonu, pH serwatki oraz objętościowego stosunku serwatki do tert-butanolu) oraz ich interakcji na stopień oczyszczenia i wydajność ekstrakcji laktoferyny w fazach środkowych i dolnych układów trójfazowych (analiza wariancji, $p = 0,05$).

The effect of independent variables (saturation of whey with ammonium sulphate, pH of whey, and whey to tert-butanol volume ratio) and their interactions on the purification factor and extraction yield of lactoferrin in the middle and bottom phases of three-phase systems (analysis of variance, $p = 0.05$).

Zmienne niezależne i ich interakcje Independent variables and their interactions	Stopień oczyszczenia (PF) Purification factor (PF)				Wydajność ekstrakcji (Y%) Extraction yield (Y%)			
	Faza środkowa Middle phase		Faza dolna Bottom phase		Faza środkowa Middle phase		Faza dolna Bottom phase	
	F	p	F	p	F	p	F	p
X_1	0,43	0,5112	3,50	0,0658	6,53	0,0129	91,27	< 0,0001
X_2	58,62	< 0,0001	47,51	< 0,0001	45,57	< 0,0001	55,51	< 0,0001
X_3	13,18	< 0,0001	52,39	< 0,0001	21,19	< 0,0001	17,37	< 0,0001
$X_1 \times X_2$	4,63	0,0351	-	-	3,47	0,0669	-	-
$X_1 \times X_3$	-	-	2,78	0,0694	-	-	-	-
$X_2 \times X_3$	-	-	6,74	0,0022	-	-	-	-
X_1^2	4,77	0,0325	37,92	< 0,0001	4,67	0,0344	7,16	0,0094
X_2^2	119,97	< 0,0001	-	-	181,56	< 0,0001	-	-
Ocena istotności modelu Assessment of model significance	$F_{obl.} > F_{n1-1, n2-2, \alpha}$ 30,68 > 2,15 $p < 0,0001$		$F_{obl.} > F_{n1-1, n2-2, \alpha}$ 23,64 > 2,15 $p < 0,0001$		$F_{obl.} > F_{n1-1, n2-2, \alpha}$ 40,60 > 2,15 $p < 0,0001$		$F_{obl.} > F_{n1-1, n2-2, \alpha}$ 27,77 > 2,15 $p < 0,0001$	
Skorygowany współczynnik determinacji Adjusted coefficient of determination	0,7454		0,7416		0,7960		0,7252	

Zmienne niezależne: stężenie siarczanu amonu (X_1), pH (X_2), stosunek objętości serwatki do tert-butanolu (X_3) / Independent variables: ammonium sulphate concentration (X_1), pH (X_2), whey to tert-butanol volume ratio (X_3).

Tabela 2

Równania modelowe opisujące wielkość zmiennych zależnych (stopień oczyszczenia i wydajność ekstrakcji laktoferyny) w fazach środkowych oraz dolnych układów trójfazowych, w zależności od badanych zmiennych niezależnych (wysycenia serwatki siarczanem amonu, pH serwatki oraz objętościowego stosunku serwatki do tert-butanolu).

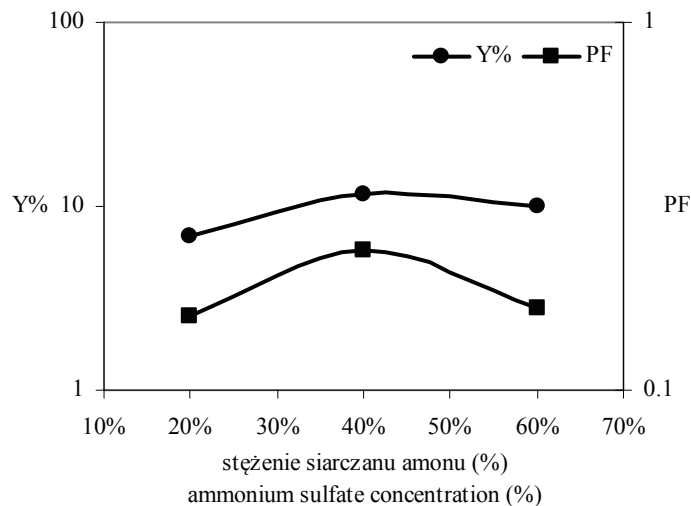
The model equations describing the dependent variables (purification factor and extraction yield of lactoferrin) in the middle and bottom phases of three-phase systems, depending on the studied independent variables (saturation of whey with ammonium sulphate, pH of whey, and whey to tert-butanol volume ratio).

Zmienne zależne Dependent variables	Faza Phase	Stosunek objętości serwatki do tert-butanolu Whey to tert-butanol volume ratio	Równanie modelu Model equation
Stopień oczyszczenia Purification factor (PF)	Środkowa Middle	1 : 0,5	$Y' = -5,0639 + 0,0190X_1 + 1,0988X_2 + 0,0023X_1X_2 - 0,0004X_1^2 - 0,0803X_2^2$
		1 : 1	$Y' = -4,8462 + 0,0190X_1 + 1,0988X_2 + 0,0023X_1X_2 - 0,0004X_1^2 - 0,0803X_2^2$
		1 : 2	$Y' = -4,6076 + 0,0190X_1 + 1,0988X_2 + 0,0023X_1X_2 - 0,0004X_1^2 - 0,0803X_2^2$
	Dolna Bottom	1 : 0,5	$Y' = -2,6732 + 0,0818X_1 + 0,1550X_2 - 0,0011X_1^2$
		1 : 1	$Y' = -2,4679 + 0,0737X_1 + 0,1423X_2 - 0,011X_1^2$
		1 : 2	$Y' = -2,6815 + 0,0846X_1 + 0,0269X_2 - 0,0011X_1^2$
Wydajność ekstrakcji Extraction yield (Y%)	Środkowa Middle	1 : 0,5	$Y' = -3,6176 + 0,0217X_1 + 1,1631X_2 + 0,0018X_1X_2 - 0,0004X_1^2 - 0,0859X_2^2$
		1 : 1	$Y' = -3,3254 + 0,0217X_1 + 1,1631X_2 + 0,0018X_1X_2 - 0,0004X_1^2 - 0,0859X_2^2$
		1 : 2	$Y' = -3,1171 + 0,0217X_1 + 1,1631X_2 + 0,0018X_1X_2 - 0,0004X_1^2 - 0,0859X_2^2$
	Dolna Bottom	1 : 0,5	$Y' = -0,5666 + 0,0243X_1 + 0,1902X_2 - 0,0006X_1^2$
		1 : 1	$Y' = -0,7905 + 0,0243X_1 + 0,2040X_2 - 0,0006X_1^2$
		1 : 2	$Y' = -0,4681 + 0,0243X_1 + 0,0880X_2 - 0,0006X_1^2$

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

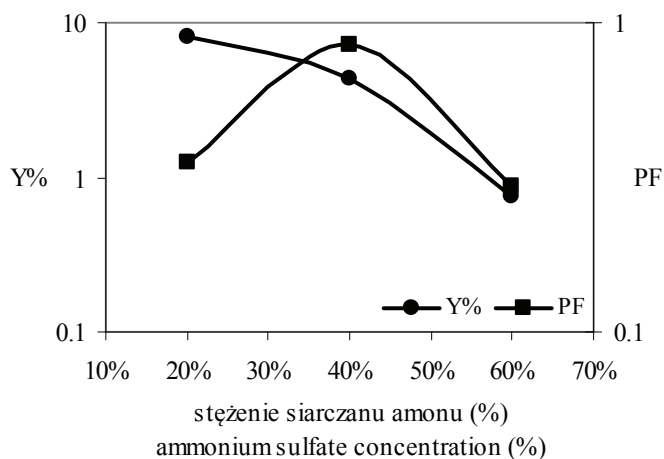
preferencyjne gromadzenie się laktoferyny w fazach dolnych, podczas gdy pozostałe białka, po wysoleniu w tych warunkach, były obecne w fazach środkowych. Podobną zależność zaobserwowali Dhananjay i Mulimani [9] podczas ekstrakcji α -galaktozydazy w układach trójfazowych.

Wpływ pH serwatki na stopień oczyszczenia i wydajność odzysku laktoferyny przedstawiono na rys. 3 - 6.



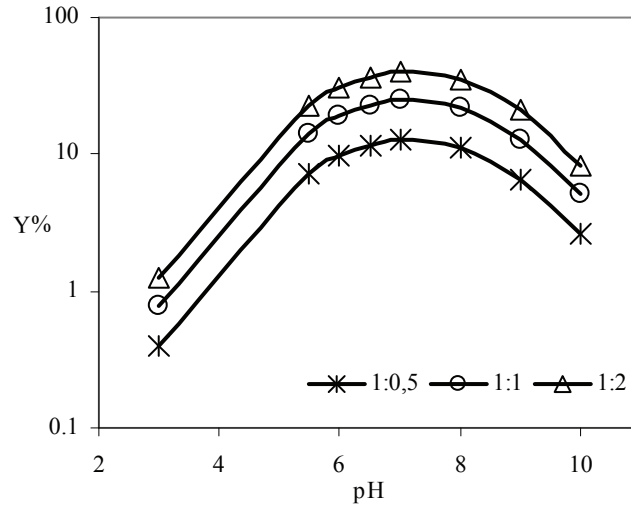
Rys. 1. Wpływ wysycenia siarczanem amonu na stopień oczyszczenia (PF) i wydajność ekstrakcji laktoferyny (Y%) w fazach środkowych układów trójfazowych (pH 6,5; stosunek objętości serwatki do t-butanolu 1 : 0,5).

Fig. 1. Effect of ammonium sulphate saturation degree on purification factor (PF) and yield of lactoferrin extraction (Y%) in middle phases of three-phase systems (pH 6.5, whey to tert-butanol volume ratio 1 : 0.5).



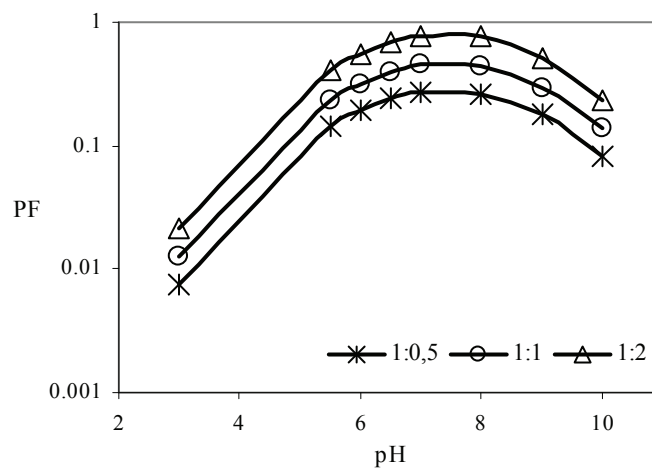
Rys. 2. Wpływ wysycenia siarczanem amonu na stopień oczyszczenia (PF) i wydajność ekstrakcji laktoferyny (Y%) w fazach dolnych układów trójfazowych (pH 6,5; stosunek serwatki do t-butanolu 1 : 0,5).

Fig. 2. Effect of ammonium sulphate saturation degree on purification factor (PF) and yield of lactoferrin extraction (Y%) in bottom phases of three-phase systems (pH 6.5, whey to tert-butanol volume ratio 1 : 0.5).



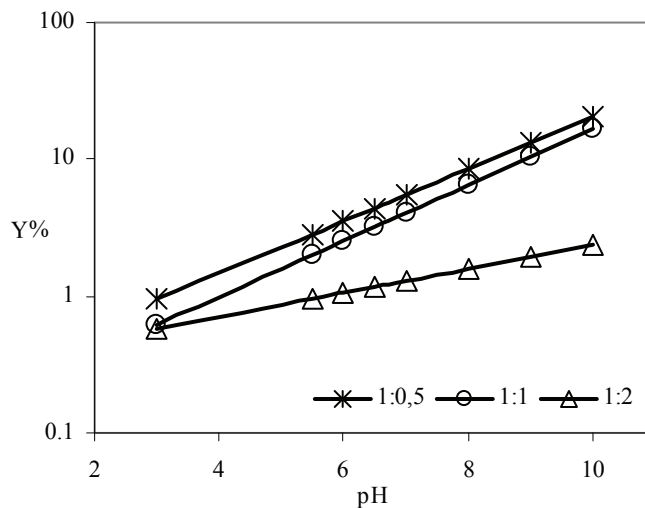
Rys. 3. Wpływ pH na wydajność ekstrakcji laktoferyny (Y%) w fazach środkowych układów trójfazowych (wysycenie siarczanem amonu równe 40 %).

Fig. 3. Effect of pH on yield of lactoferrin extraction (Y%) in middle phases of three-phase systems (ammonium sulphate saturation equalling 40 %).



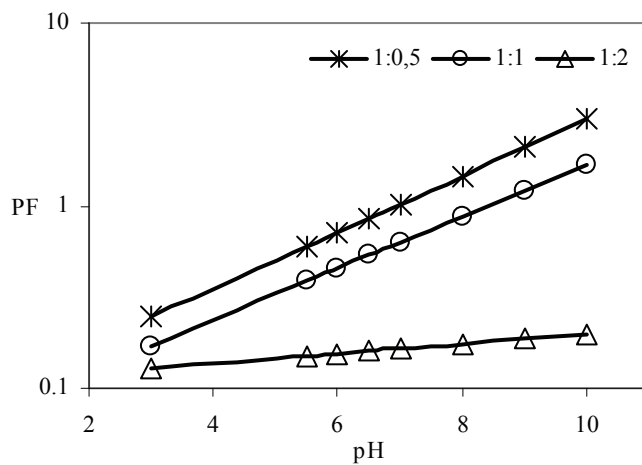
Rys. 4. Wpływ pH na stopień oczyszczenia laktoferyny (PF) w fazach środkowych układów trójfazowych (wysycenie siarczanem amonu równe 40 %).

Fig. 4. Effect of pH on purification factor of lactoferrin (PF) in middle phases of three-phase systems (ammonium sulphate saturation equalling 40 %).



Rys. 5. Wpływ pH na wydajność ekstrakcji laktoferyny (Y%) w fazach dolnych układów trójfazowych (wysycenie siarczanem amonu równe 40 %).

Fig. 5. Effect of pH on yield of lactoferrin extraction (Y%) in bottom phases of three-phase systems (ammonium sulphate saturation equalling 40 %).



Rys. 6. Wpływ pH na stopień oczyszczenia laktoferyny (PF) w fazach dolnych układów trójfazowych (wysycenie siarczanem amonu równe 40 %).

Fig. 6. Effect of pH on purification factor of lactoferrin (PF) in bottom phases of three-phase systems (ammonium sulphate saturation equalling 40 %).

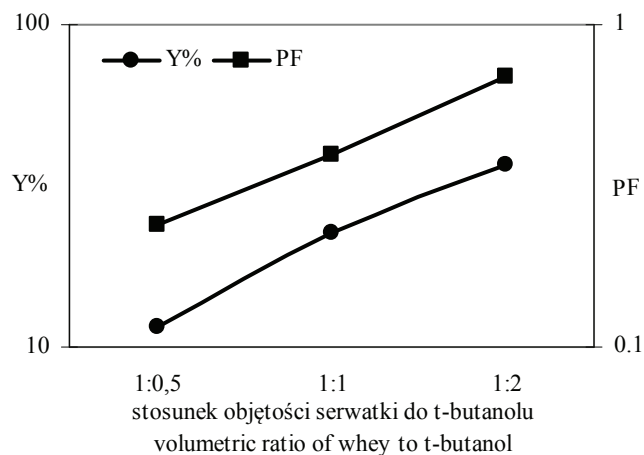
Zaobserwowano, że w fazach środkowych wydajność odzysku wzrastała ze wzrostem pH serwatki do ok. 7. Dalsze zwiększanie pH serwatki prowadziło do zmniejszania wydajności odzysku laktoferyny. Podobny przebieg miała także zmiana stopnia oczyszczenia laktoferyny w zależności od pH. Punkt izoelektryczny laktoferyny wyno-

si 7,8 do 8,0 [24]. W tym punkcie pH wypadkowy ładunek laktoferyny będzie równy zeru. Podobnie jak w przypadku laktoferyny, zjawisko preferencyjnego gromadzenia się separowanego białka w fazie środkowej układu trójfazowego w środowisku o pH zbliżonym do punktu izoelektrycznego zaobserwowali także Narayan i wsp. [17] podczas izolacji peroksydazy. Takie zachowanie się izolowanych białek nie zawsze jest regułą. Np. albumina surowicy wołowej w układach trójfazowych była wytrącana w fazie środkowej z maksymalną wydajnością w środowisku o pH niższym niż punkt izoelektryczny [7].

Zupełnie inną zależność badanych parametrów ekstrakcji od pH stwierdzono w fazach dolnych. Stopień oczyszczenia i wydajność odzysku laktoferyny wzrastały ze zwiększeniem pH i osiągały maksymalne wielkości w pH 10. Zjawisko to dowodzi, że w tych warunkach laktoferyna w większym stopniu pozostawała rozpuszczona w roztworze siarczanu amonu (faza dolna), podczas gdy pozostałe białka serwatki zostały strącone w fazie środkowej.

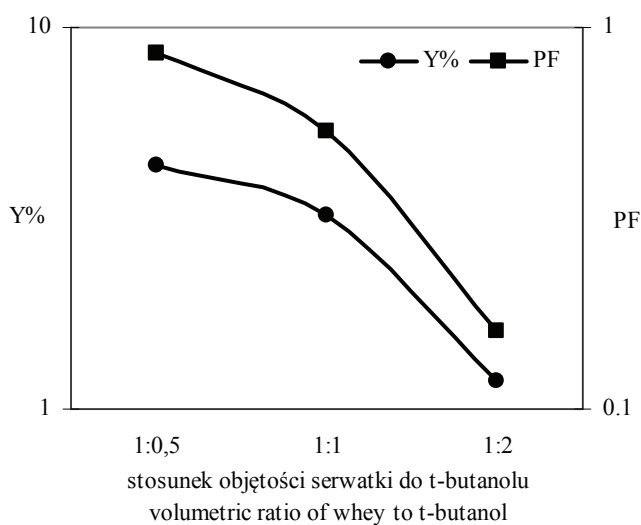
Wpływ stosunku objętości serwatki do tert-butanolu na parametry ekstrakcji w układach trójfazowych przedstawiono na rys. 7. i 8. W fazach środkowych stopień oczyszczenia wzrastał wraz ze zwiększaniem zawartości tert-butanolu w układach. Podobna tendencja dotyczyła także wydajności odzysku laktoferyny. W fazach środkowych najwyższe wielkości parametrów ekstrakcji uzyskano więc w układach dwufazowych, w których stosunek objętości serwatki do tert-butanolu wynosił 1 : 2. Z kolei w fazach dolnych zaobserwowano odwrotną tendencję. Stopień oczyszczenia oraz wydajność odzysku były najwyższe, gdy stosunek objętości serwatki do tert-butanolu wynosił 1 : 0,5 i zmniejszały się ze wzrostem ilości tert-butanolu w układzie trójfazowym. Fakt ten wydaje się oczywisty, jeśli ze wzrostem objętości tert-butanolu w układzie trójfazowym laktoferyna migrowała do fazy środkowej, odbywało się to kosztem zmniejszenia jej zawartości w fazie dolnej.

Z danych literaturowych wynika, że często najkorzystniejszym wariantem okazywał się stosunek objętościowy ekstraktu białek do tert-butanolu wynoszący 1 : 1. Obserwowano to przy oczyszczaniu α -galaktozydazy z *Lycopersicon esculentum* [4], egzopoligalakturonazy pochodzącej z *Aspergillus sojae* [10] oraz ekstrakcji peroksydazy z *Ipomoea palmata* [17]. Z kolei w trakcie oczyszczania pektynazy z owoców pomidora przyjęto stosunek surowego ekstraktu do tert-butanolu równy 1 : 2 [25]. W układach trójfazowych, opisanych w niniejszej pracy, do separacji laktoferyny w fazach środkowych optymalny stosunek objętościowy serwatki do tert-butanolu wynosił 1 : 2, natomiast w fazach dolnych 1 : 0,5.



Rys. 7. Wpływ stosunku objętości serwatki do t-butanolu na stopień oczyszczenia (PF) i wydajność ekstrakcji laktoferyny (Y%) w fazach środkowych układów trójfazowych (pH 6,5; wysycenie siarczanem amonu równe 40 %).

Fig. 7. Effect of whey to t-butanol volume ratio on purification factor (PF) and yield of lactoferrin extraction (Y%) in middle phases of three-phase systems (pH 6.5, ammonium sulphate saturation of 40 %).



Rys. 8. Wpływ stosunku objętości serwatki do t-butanolu na stopień oczyszczenia (PF) i wydajność ekstrakcji laktoferyny (Y%) w fazach dolnych układów trójfazowych (pH 6,5; wysycenie siarczanem amonu równe 40 %).

Fig. 8. Effect of whey to t-butanol volume ratio on purification factor (PF) and yield of lactoferrin extraction (Y%) in bottom phases of three-phase systems (pH 6.5, ammonium sulphate saturation of 40 %).

Tabela 3

Optymalne warunki separacji laktoferyny w układach trójfazowych.
Optimal conditions for separating lactoferrin in three-phase systems.

Zmienne niezależne Independent variables	Faza środkowa Middle phase	Faza dolna Bottom phase
Stężenie siarczanu amonu Ammonium sulphate concentration	52 %	35 %
pH	7,5	10
Stosunek objętości serwatki do tert-butanolu Whey to tert-butanol volume ratio	1 : 2	1 : 0,5
Parametry ekstrakcji Extraction parameters	Faza środkowa Middle phase	Faza dolna Bottom phase
PF	0,76	2,88
Y%	41,4	25,8
Użyteczność / Desirability	0,95	

Na podstawie opracowanych modeli matematycznych wytypowano optymalne warunki ekstrakcji laktoferyny w środkowych i dolnych fazach układów trójfazowych (tab. 3). Celem optymalizacji było znalezienie takich wartości zmiennych wejściowych, które umożliwią uzyskanie maksymalnych wartości zmiennych wyjściowych (stopnia oczyszczenia oraz wydajności odzysku). Jednoczesna optymalizacja parametrów procesu ze względu na obie zmienne wyjściowe jest zagadnieniem trudnym, dlatego też wykorzystano metodę polegającą na zastosowaniu funkcji użyteczności. Metoda ta polega na przekształceniu wartości obu zmiennych zależnych na pojedynczą wartość całkowitej użyteczności, zawierającą się w przedziale (0, 1). Optymalizacja sprowadza się wówczas do poszukiwania takich wartości zmiennych wejściowych, które maksymalizują całkowitą użyteczność zmiennych wyjściowych [8].

W dolnych fazach układów trójfazowych o optymalnym składzie uzyskano znacznie lepsze oczyszczenie laktoferyny niż w fazach środkowych. Po ekstrakcji w fazach dolnych zawartość laktoferyny w stosunku do pozostałych białek zwiększyła się nieomal trzykrotnie w porównaniu z wyjściową serwatką. Z kolei w fazach środkowych stopień oczyszczenia (PF) był mniejszy niż 1. W istocie w porównaniu z serwatką faza ta wzbogaciła się więc w białka inne niż laktoferyna.

Maksymalne wydajności odzysku laktoferyny były raczej małe (25 - 40 %), przy czym nieznacznie większe obserwowano w fazach środkowych. Jedną z przyczyn tego zjawiska mogła być nieodwracalna denaturacja pewnej ilości laktoferyny w fazach środkowych. Wytrącona laktoferyna nie przechodziła do roztworu podczas uwadniania fazy środkowej i dlatego nie mogła być oznaczona za pomocą chromatografii jonowymiennej.

Laktoferyna i laktoperoksydaza są białkami o zbliżonych masach cząsteczkowych i punktach izoelektrycznych. Należą do grupy bioaktywnych białek, których stężenie w serwatce wynosi od poniżej 0,0001 do 70 mg/dm³ [27]. Istnieją nieliczne informacje na temat ekstrakcji laktoperoksydazy w układach trójfazowych [2]. Wynika z nich, że optymalne warunki separacji laktoperoksydazy są odmienne od ustalonych w tej pracy warunków izolacji laktoferyny w układach trójfazowych. Z tej przyczyny, ekstrakcja w układach trójfazowych może być też metodą wykorzystywaną w produkcji oczyszczonych preparatów zarówno laktoferyny, jak i laktoperoksydazy.

W literaturze brak jest doniesień na temat prób ekstrakcji laktoferyny w układach trójfazowych. Trudno też porównywać tę metodę z różnymi odmianami chromatografii kolumnowej, które pomimo wysokich kosztów separacji dominują w zastosowaniach przemysłowych [13]. Ich niewątpliwą zaletą jest możliwość otrzymania preparatów laktoferyny o wysokiej czystości. Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie w produkcji przemysłowej znacznie mniej kosztownych metod membranowych (ultrafiltracja i mikrofiltracja), jednak uzyskuje się wówczas małą czystość produktu końcowego [11]. W związku z tym próbowano oczyszczać laktoferynę za pomocą technik łączących zasady separacji filtracji membranowej z innymi metodami rozdziału substancji, np. przez zastosowanie adsorpcyjnej chromatografii membranowej, które pozwoliło na osiągnięcie wydajności odzysku laktoferyny powyżej 90 % [20]. Wykorzystanie membranowej chromatografii powinowactwa umożliwiło z kolei uzyskanie preparatów laktoferyny o czystości równej 94 % [31]. Preparat laktoferyny o zbliżonej czystości otrzymano także za pomocą magnetycznych wymienniczy jonowych [5].

W układach trójfazowych opisanych w tej pracy maksymalna wydajność ekstrakcji laktoferyny wynosiła ok. 40 %. Rezultat ten jest porównywalny z wynikami uzyskanymi za pomocą frakcjonowania z wytworzeniem piany [19]. Wspomniane wyżej frakcjonowanie było pierwszym etapem w procedurze izolacji laktoferyny z mleka. Warto więc rozważyć zastosowanie układów trójfazowych jako wstępnego etapu oczyszczania laktoferyny podczas otrzymywania preparatów tego białka na skalę przemysłową.

Wnioski

1. Zbadane zmienne niezależne (pH, stopień wysycenia serwatki siarczanem amonu oraz objętościowy stosunek serwatki do tert-butanolu) mają istotny wpływ na separację laktoferyny w układach trójfazowych.
2. W fazach środkowych układów trójfazowych stopień oczyszczenia oraz wydajność odzysku laktoferyny przyjmują wartości maksymalne, gdy wysycenie serwatki siarczanem amonu wynosi 40 %.

3. W fazach dolnych stopień oczyszczenia przyjmuje wartości maksymalne przy 40 % wysycenia serwatki siarczanem amonu, natomiast wydajność odzysku laktoferyny zmniejsza się ze wzrostem stężenia siarczanu amonu.
4. W fazach środkowych największa wydajność odzysku i najwyższy stopień oczyszczenia laktoferyny występują, gdy pH serwatki jest zbliżone do punktu izoelektrycznego laktoferyny (pI = 7,8 - 8,0).
5. W fazach dolnych obserwuje się wzrost stopnia oczyszczenia i wydajności odzysku laktoferyny wraz ze wzrostem pH.
6. W fazach środkowych ze wzrostem zawartości tert-butanolu w układzie trójfazowym wzrasta także stopień oczyszczenia i wydajność odzysku laktoferyny, natomiast w fazach dolnych obserwuje się zależność odwrotną.
7. Optymalne warunki separacji laktoferyny to: faza dolna układu trójfazowego, wysycenie serwatki siarczanem amonu równe 35 %, pH 10 i stosunek objętości serwatki do tert-butanolu równy 1 : 0,5. W tych warunkach wydajność odzysku laktoferyny wynosi prawie 26 %, natomiast jej stopień oczyszczenia jest zbliżony do 3.

Literatura

- [1] Babina S.E., Kanyshkova T.G., Buneva V.N., Nevinski G.A.: Lactoferrin is the major deoxyribonuclease of human milk. *Biochemistry (Mosc.)*, 2004, **69**, 1006-1015.
- [2] Bombczyńska K.: Dobór składu faz ekstrakcyjnych do separacji laktoperoksydazy w układach trójfazowych. Praca magisterska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań 2011.
- [3] Box G.E.P., Cox D.R.: An analysis of transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 1964, **26**, 211-246.
- [4] Calci E., Demir T., Celem E.B., Önal S.: Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization. *Sep. Purif. Technol.*, 2009, **70**, 123-127.
- [5] Chen L., Guo C., Guan Y., Liu H.: Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation. *Sep. Purif. Technol.*, 2007, **56**, 168-174.
- [6] Dennison C.: A Guide to Protein Isolation. Eds. Kluwer Academic Publishers, New York, USA, 2002.
- [7] Dennison C., Lovrien R.: Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Express. Purif.*, 1997, **11**, 149-161.
- [8] Derringer G., Suich R.: Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.*, 1980, **12**, 214-219.
- [9] Dhananjay S.K., Mulimani V.M.: Three-phase partitioning of α -galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **36**, 123-128.
- [10] Dogan N., Tari C.: Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochem. Eng. J.*, 2008, **39**, 43-50.
- [11] Fuda E., Jauregi P., Pyle D.L.: Recovery of lactoferrin and lactoperoxidase from sweet whey using colloidal gas apheresis (CGAs) generated from an anionic surfactant, AOT. *Biotechnol. Progr.*, 2004, **20**, 514-525.
- [12] Król J., Brodziak A., Litwińczuk A.: Podstawowy skład chemiczny i zawartość wybranych białek serwatkowych w mleku krów różnych ras i w serwatce podpuszczkowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **4 (77)**, 74-83.

- [13] Lu R.R., Xu S.Y., Wang Z., Yang R.J.: Isolation of lactoferrin from bovine colostrums by ultrafiltration coupled with strong cation exchange chromatography on a production scale. *J. Membr. Sci.*, 2007, **297**, 152-161.
- [14] Madureira A.R., Pereira C.I., Gomes A.M.P., Pintado M.E., Malcata F.X.: Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.*, 2007, **40**, 1197-1211.
- [15] Małaczewska J., Rotkiewicz Z.: Laktoferyna – białko multipotencjalne. *Med. Wet.*, 2007, **63**, 136-139.
- [16] Małaczewska J., Rotkiewicz Z., Siwicki A.K.: Laktoferyna - mechanizmy działania przeciwwirusowego. *Med. Wet.*, 2006, **62**, 1104-1107.
- [17] Narayan A.V., Madhusudhan M.C., Raghavarao K.S.M.S.: Extraction and purification of *Ipomoea* peroxidase employing three-phase partitioning. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2008, **151**, 263-272.
- [18] Ng P.K., Yoshitake T.: Purification of lactoferrin using hydroxyapatite. *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 976-980.
- [19] Noel J., Prokop A., Tanner R.D.: Foam fractionation of a dilute solution of bovine lactoferrin. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, **98-100**, 395-402.
- [20] Plate K., Beutel S., Buchholz H., Demmer W., Fischer-Frühholz S., Reif O., Ulber R., Scheper T.: Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2006, **1117**, 81-86.
- [21] Przybycien T.M., Pujar N.S., Steele L.M.: Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004, **15**, 469-478.
- [22] Rahman M., Kim W.-S., Kumura H., Shimazaki K.-I.: Bovine lactoferrin region responsible for binding to bifidobacterial cell surface proteins. *Biotechnol. Lett.*, 2009, **31**, 86-868.
- [23] Sacharczuk M., Zagulski T., Sadowski B., Barcikowska M., Pluta R.: Laktoferyna w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neurol. Neuroch. Pol.*, 2005, **6 (39)**, 482-489.
- [24] Saleh Z.S., Hossain Md..M.: A study of the separation of proteins from multicomponent mixtures by semi-batch foaming process. *Chem. Eng. Prog.*, 2001, **40**, 371-378.
- [25] Sharma A., Gupta M.N.: Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1625-1627.
- [26] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, **150**, 76-85.
- [27] Smithers G.W.: Whey and whey proteins – from „gutter-to-gold”. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 695-704.
- [28] Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K.: Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*, 2009, **91**, 52-57.
- [29] Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M.: Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.*, 2006, **16**, 124-1251.
- [30] Wati R.K., Theppakorn T., Benjakul S., Rawdkuen S.: Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. *Process Biochem.*, 2009, **44**, 1307-1314.
- [31] Wolman F.J., Maglio D.G., Grasselli M., Cascone O.: One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrums by affinity membrane chromatography. *J. Membr. Sci.*, 2007, **288**, 132-138.

SEPARATION OF LACTOFERRIN FROM WHEY IN THREE-PHASE EXTRACTION SYSTEMS (TPP METHOD)

S u m m a r y

To separate lactoferrin from whey, extraction in three-phase systems was applied (known as a three-phase partitioning 'TPP' method). In the research study, 72 variants of three-phase systems were investigated; they differed in the degree of saturation of whey with ammonium sulphate, pH, and whey to tert-butanol volume ratio. In the phases formed, the concentration of lactoferrin and total protein were measured in order to determine the separation parameters such as purification factor and yield of recovered lactoferrin. Based on the separation parameters, obtained through the experiment, a mathematical model was constructed. The optimal composition of the three-phase system, determined on the basis of this model, consisted of the whey having a pH value of 10, saturated with ammonium sulphate at a concentration of 35 %, whereas the whey to tert-butanol volume ratio was 1 : 0.5. Those conditions made it possible to obtain a lactoferrin preparation in the bottom phase of the three-phase system, and the purification factor thereof was ca. 3. The extraction yield of lactoferrin in this phase was 26 %.

Key words: three-phase system, lactoferrin, whey, tert-butanol, extraction 