

EWELINA SIEPKA, ŁUKASZ BOBAK, TADEUSZ TRZISZKA

FRAKCJONOWANIE ŻÓŁTKA W CELU POZYSKIWANIA PREPARATÓW WZBOGACONYCH W SUBSTANCJE BIOLOGICZNIE AKTYWNE

Streszczenie

Jaja są surowcem żywnościowym zawierającym wszystkie niezbędne substancje do rozwoju młodego organizmu. Wykorzystywane są w przemyśle żywnościowym, jak również w farmaceutycznym, kosmetycznym, chemicznym i paszowym ze względu na zawartość substancji biologicznie aktywnych m.in. immunoglobuliny (IgY), foswityny i fosfolipidów.

W pracy podjęto próbę frakcjonowania żółtek jaj kurzych ukierunkowaną na pozyskanie frakcji bogatych w immunoglobulinę (IgY), foswitynę oraz w celu izolacji fosfolipidów. Surowiec stanowiły świeże jaja pozyskane od niosek linii Lohmann Brown, pochodzące z gospodarstwa specjalistycznego zarządzanego przez firmę TRONINA. Nioski utrzymywano w dwóch grupach i żywiono *ad libitum*. Grupie kontrolnej niosek podawano pełnoporcjową standardową mieszankę paszową oraz preparat o nazwie handlowej Biostrong 510, stanowiący mieszaninę olejków eterycznych i wysokowartościowych ekstraktów ziółowych w formie otoczkowanej. W grupie doświadczalnej pasza wzbogacona była w preparaty Humobentofet i Humokarbowit (zawierające omega 3), zmieszane w stosunku masowym 1 : 2.

Zawartość IgY w plazmie jaj grupy kontrolnej utrzymywała się na poziomie ok. 3,6 mg/ml, natomiast plazma wyizolowana z żółtek jaj niosek żywionych paszą wzbogaconą zawierała ok. 1 mg/ml więcej tego białka. Zawartość foswityny z żółtek jaj pozyskanych zarówno od niosek żywionych paszą standardową, jak i wzbogaconą wyniosła ok. 4 %. Zawartość białka ogółem we frakcji foswitynowej była na podobnym poziomie ok. 60 %. Czystość frakcji fosfolipidowej pozyskanej w obydwóch wariantach żywieniowych, określonej jako ilość substancji nierozpuszczalnej w acetonie, wyniosła ok. 85 %. We frakcji tej zawartość fosfatydylocholino (PC) wynosiła ok. 75 %, a fosfatydyloetanoloaminy (PE) ok. 24 %.

Słowa kluczowe: foswityna, fosfolipidy, immunoglobulina, żółtka jaj kurzych, frakcjonowanie

Wprowadzenie

Zbilansowana w prawidłowy sposób dieta pełni istotną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Surowiec jajczarski pełni ważną rolę

Mgr inż. E. Siepka, dr inż. L. Bobak, prof. dr hab. inż. T. Trziszka, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27 50-375 Wrocław

w dostarczaniu składników odżywczych, co wynika szczególnie z dużej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT), zrównoważonego składu aminokwasów, składników mineralnych oraz niemal wszystkich witamin [17]. Na obecnym poziomie wiedzy surowiec jajczarski jest nie tylko uwzględniany jako składnik diety, ale przede wszystkim jako materiał wyjściowy do odzysku (produkcji) cennych bioaktywnych substancji, takich jak: immunoglobulina, foswityna oraz fosfolipidy. Zwłaszcza nowa forma produkcji jaj kurzych (projektowanych) może być rozpatrywana jako etap procesu biotechnologicznego wytwarzania nutraceutyków lub preparatów biomedycznych [2, 9]. Surowiec jajczarski poza funkcją odżywczą stanowi bardzo dobre źródło substancji biologicznie aktywnych o potencjalnej możliwości wykorzystania ich w gałęziach przemysłu m.in. spożywczego, kosmetycznego czy farmaceutycznego. Żółtko jaja będące emulsją typu olej w wodzie (O/W) charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami emulgującymi i wykorzystywane jest jako dodatek funkcjonalny w produkcji żywności. Właściwości te kształtowane są w głównej mierze przez fosfolipidy i lipoproteiny oraz cholesterol [4, 7, 12].

Wdrożenie opracowanej w laboratorium technologii frakcjonowania żółtka jaja w warunkach przemysłowych powinno być ukierunkowane na pozyskanie jak największej liczby składników biologicznie aktywnych. Otrzymywanie w pierwszym etapie jedynie frakcji fosfolipidowej z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych powoduje denaturację białek i w związku z tym całkowitą utratę ich właściwości funkcjonalnych. Za racjonalny kierunek zagospodarowania surowca jajczarskiego, poza klasycznym przetwórstwem ukierunkowanym na pozyskanie makroskopowych części składowych jaja w formie suchej lub płynnej, uważa się rozdział żółtka przewidujący rozcieńczanie i wirowanie co prowadzi do pozyskania dwóch frakcji: plazmy (stanowiącej w badaniach własnych ok. 80 %) i granuli. We frakcji plazmy zawarte są liwetyny (α , β , γ), a z frakcji granularnej pozyskać można m.in. foswitynę, białko o właściwościach chelatujących oraz frakcję lipidową w tym fosfolipidy [1]. Frakcja liwetynowa zawarta w plazmie jest doskonałym źródłem immunoglobuliny [11]. Gamma liwetyna izolowana z plazmy żółtka jaja kurzego wykazuje aktywność immunologiczną, identyczną jak immunoglobulina G i została nazwana (z ang. żółtko – yolk) immunoglobuliną Y (IgY). Immunoglobulina Y odgrywa ważną rolę i jest wykorzystywana w przemyśle paszowym oraz spożywczym do komponowania preparatów zwiększających bierną odporność ludzi i zwierząt na infekcje jelitowe [4]. Metody izolacji IgY polegają na rozcieńczeniu żółtka wodą lub roztworami soli o niskiej sile jonowej oraz adiustacji odczynu roztworu poniżej wartości pH żółtka natywnego $6,2 \div 6,5$. Optymalnym odczynem jest wartość pH $5,0 \div 5,5$, w którym następuje rozdział na frakcję granularną i plazmę [1].

Żółtka jaj kurzych są bogatym źródłem lipidów, które stanowią ok. 64 % jego suchej masy, w tym fosfolipidy stanowią jedną trzecią frakcji tłuszczowej, a cholesterol

stanowi ok. 1 % [13]. Wbudowane w strukturę fosfolipidów reszty acylowe charakteryzują się wysoką zawartością kwasów tłuszczowych o łańcuchu zbudowanym z 20 i większej liczby atomów węgla w tym kwasy tłuszczowe z grupy ω -3: EPA (cis- $\Delta^{5,8,11,14,17}$ eikozapentaenowy) i DHA (cis- $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ dokozaheksaenowy) oraz ω -6 AA (cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ arachidonowy). Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe nie są spotykane w fosfolipidach izolowanych z surowca roślinnego, dlatego fosfolipidy żółtka jaja mogą znaleźć szerokie zastosowanie jako składnik produktów specjalnego przeznaczenia żywieniowego, przede wszystkim w celu wzbogacenia diety w kwasy z grupy ω -3 i ω -6. Ponadto fosfolipidy żółtka jaja są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym do wytwarzania liposomów. Przemysł spożywczy wykorzystuje zdolność lecytyny do emulgowania i stabilizowania układów dyspersyjnych. W większości, dostępna na rynku lecytyna (mieszanina fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanoloaminy) izolowana jest ze szlamów poekstrakcyjnych pochodzących z przemysłu tłuszczowego (soja, rzepak, słonecznik) [15]. Lecytyna izolowana z żółtka jaja kurzego, ze względu na skład chemiczny, jest bardziej wartościowa od lecytyn pochodzenia roślinnego, zawiera bowiem w składzie do 80 % fosfatydylocholiny. Wiadomo, że cholina występuje we wszystkich błonach komórkowych i jest niezbędna do życia każdej komórki organizmu [14, 18].

Foswityna jest fosfoproteiną występującą w dwóch frakcjach o masach cząsteczkowych $160 \cdot 10^3$ i $190 \cdot 10^3$ Da. Seryna, stanowiąca ponad 50 % składu aminokwasowego tego białka, warunkuje dużą zawartość fosforu sięgającą do 60 % całej zawartości tego biopierwiastka w żółtku [5, 6]. Foswityna wykazuje właściwości antyoksydacyjne, co powoduje duże zainteresowanie tym białkiem, wynikające z możliwości jego zastosowania jako naturalnego dodatku ograniczającego niepożądany wpływ procesów oksydacyjnych na produkty spożywcze, prowadzące m.in. do chorób nowotworowych [3]. Foswityna wykazuje zdolności do chelatowania jonów metali Fe^{+2} , Cu^{+2} (sprzyjających powstawaniu wolnych rodników), co pozwala na skuteczną inhibicję utleniania m.in. fosfolipidów.

Material i metody badań

Proces frakcjonowania żółtka

Świeże jaja pozyskane od niosek linii Lohmann Brown poddano ręcznemu podziałowi na jego makroskopowe części. Żółtko przefiltrowano przez lejek Schotta o średnicy otworów 1 mm, w celu homogenizacji, usunięcia błony witelinowej oraz ewentualnych pozostałości skorup. Ujednolicone żółtko natywne poddawano rozcieńczeniu w stosunku 1 : 3 i adiustacji odczynu do pH=5,0 z wykorzystaniem 1,0 M roztworu kwasu cytrynowego. Powyższy zabieg, a następnie wirowanie przy 12000-g pozwoliło na rozdział żółtka jaja na plazmę (jako roztwór zawierający IgY) oraz osad

granuli zawierający foswitynę. Pozyskany supernatant mrożono, poddawano suszeniu sublimacyjnemu, a następnie określano zawartość gamma globuliny metodą immunodyfuzji radialnej [10]. Pozostałe po procesie izolacji granule zamrażano i przetrzymywano w tym stanie przez 7 dni. Umożliwiło to łatwe rozdzielanie kompleksu foswityny występującej w kompleksie z lipowiteliną (w stosunku molowym 2 : 1). Następnie po rozmrożeniu granule rozcieńczano w proporcji 1 : 1,5 (m/v) 1,75 M roztworem NaCl. Po dobowym przechowywaniu chłodniczym osad granul wirowano przy przyspieszeniu 8000·g. W celu obniżenia siły jonowej otrzymany supernatant rozcieńczano w stosunku objętościowym 1 : 4 (v/v), co pozwoliło na oddysocjowanie foswityny w postaci osadu.

Pozostałość (granule) po procesie izolacji foswityny, zawierającą fosfolipidy, wymrażano na szalkach Petriego w temp. -80 °C i poddawano liofilizacji. Wysuszone granule rozcierano w moździerzu w celu ujednoczenia przed właściwym procesem ekstrakcji. Rozdrobniony liofilizat mieszano z 96 % alkoholem etylowym w proporcji 1:3 (m/v) i wytrząsano, intensyfikując proces ekstrakcji. Po zakończonym procesie wytrząsania każdorazowo mieszaninę odwirowywano przy sile odśrodkowej 26000·g celem oddzielenia fazy stałej od alkoholowego roztworu fosfolipidów. Zabieg powtórzono trzykrotnie. Zawarty w supernatancie alkohol oddestylowywano z wykorzystaniem wyparki laboratoryjnej R-215. Pozyskany osad lecytyny zawieszano w heksanie i strącano zimnym acetonem (4 °C), uwzględniając zachowanie proporcji mieszaniny heksan ÷ aceton 1 :3 (v/v). Powyższy zabieg pozwolił na przedstawienie czystości fosfolipidów wyrażonych jako zawartość substancji nierozpuszczalnej w acetonie.

Analiza frakcji fosfolipidowych

Oznaczenie zawartości fosfolipidów

W otrzymanym preparacie określano zawartość fosfolipidów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), stosując system HP1200 firmy Agilent wyposażony w detektor diodowy (DAD przy długości fali λ - 205 nm). W tym celu sporządzano 1 % roztwór ekstraktu fosfolipidów w alkoholu izopropylowym i po przefiltrowaniu poddawano analizie chromatograficznej. Eluent sporządzono z acetonitrylu, alkoholu metylowego oraz kwasu ortofosforowego (100/10/1,8;v/v/v), a przepływ ustalono na 2,5 ml/min. Kolumnę z wypełnieniem diolowym termostatowano w temp. 55 °C.

Oznaczenie kwasów tłuszczowych w pozycji sn-1 i sn-2

Do enzymatycznej hydrolizy kwasów tłuszczowych w pozycji sn-1 i sn-2 stosowano odpowiednio lipazę (EC 3.1.1.3, pochodzenia mikrobiologicznego – *Candida antarctica*) oraz fosfolipazę A₂ (EC 3.1.1.4, izolowaną z trzustki wieprzowej). Do spo-

rzędzonego 10 % wodnego roztworu fosfolipidów (pH – 8,0 regulowane 0,1 N NaOH) dodawano odpowiednio lipazę i PLA₂, inkubując w temp. 50 ± 2 °C w ciągu 4 h. Ilość i jakość wolnych kwasów tłuszczowych po hydrolizie określano poddając je adsorpcji na aktywowanym (mieszaniną eter dietylowy - hexan) obojętnym tlenku glinu (Al₂O₃). Zawartość kolumnienek wypełnionych Al₂O₃ z zaadsorbowanymi kwasami tłuszczowymi suszono pod próżnią, po czym przenoszono ich zawartość do suchych probówek, dodając 6 % kwasu mrówkowego w eterze diizopropylowym. Po ujednoczeniu mieszaniny poddawano ją wirowaniu (siła odśrodkowa 2000·g; czas 5 min). Pozyskany supernatant odparowywano do sucha i określano w nim zawartość kwasów tłuszczowych, przeprowadzając je w estry metylowe kwasów tłuszczowych z wykorzystaniem 14 % metanolowego roztworu trifluorku boru (BF₃) oraz analizowano z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego z detektorem mas. Warunki analizy chromatograficznej (GC/MS): chromatograf gazowy 6890N sprzęgnięty ze spektrometrem mas GC5973 firmy Agilent wykorzystano do określania profilu kwasów tłuszczowych. Zastosowano kolumnę – HP88 (długość – 100 m; średnica – 0,25 mm; grubość filmu fazy stacjonarnej – 0,20 μm).

Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Duncana na poziomie istotności $p = 0,05$, przy użyciu programu Statistica 9.0.

Wyniki i dyskusja

W wyniku frakcjonowania żółtka metodą wirowania określono stopień podziału na dwie frakcje: granulę i plazmę. Oznaczono 80 % plazmy zarówno w grupie kontrolnej, jak i w roztworze sporządzonym z żółtek jaj wzbogaconych. Zawartość białka w plazmie w grupie kontrolnej była większa i wynosiła 8,87 % w porównaniu z jajami wzbogaconymi – 8,05 %, a różnice były statystycznie istotne (tab. 1). W badaniach Kopcja i wsp. [10] wykazano o 10 % mniejszą zawartość plazmy w jajach niosek immunizowanych.

W pozyskanych supernatantach oznaczono zawartość IgY metodą immunodyszufji radialnej. Zawartość IgY w plazmie pozyskiwanej z żółtek jaj niosek żywionych standardowo utrzymywała się na poziomie ok. 3,6 mg/ml natomiast plazma wyizolowana z żółtek jaj niosek żywionych paszą wzbogaconą zawierała ok. 1 mg/ml więcej tego białka, co stanowiło różnicę statystycznie istotną.

Podczas frakcjonowania żółtka otrzymano ok. 4 % preparatu foswityny z żółtek jaj pozyskanych zarówno od niosek żywionych paszą standardową, jak i wzbogaconą (tab. 1). Zawartość białka w pozyskanych preparatach kształtowała się na podobnym poziomie ok. 60 %, a różnice nie było statystycznie istotne.

W oczyszczonym preparacie oznaczono zawartość kwasów tłuszczowych z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego z detektorem mas oraz zawartość fosfolipidów z wykorzystaniem wysokosprawniej chromatografii cieczerwowej.

Rodzaj paszy podawanej nioskom linii Lohmann Brown w nieznacznym stopniu wpłynął na zawartość fosfolipidów w żółtku, jednak różnica statystycznie istotna wynika bardziej z czystości pozyskanego preparatu niż ze zmian żywieniowych, gdyż nie obserwuje się różnic zawartości podstawowych grup fosfolipidów w oczyszczonym preparacie. Zawartość PC wynosiła ok. 75 %. Podobnie, jak w przypadku PC, nie wykazano statystycznych różnic zawartości fosfatydyloetanolaminy (PE) w żółtku, wynikających ze zmodyfikowania paszy podawanej nioskom. Zawartość PE w obydwu grupach stanowiła ok. 24 %. Czystość pozyskiwanych ekstraktów, określona jako ilość substancji nierozpuszczalnej w acetonie, wyniosła ok. 85 %. Wyniki badań przedstawiono w tab. 2.

Tabela 1

Skład chemiczny żółtka i stopień odzysku biologicznie aktywnych białek.

Chemical composition of egg yolk and recovery degree of biologically active proteins.

Grupa badawcza Research group	Żółtko Egg Yolk				Frakcja IgY IgY fraction		Frakcja foswitynowa Phosvitin fraction	
	Sucha masa Dry matter [%]	Białko Protein [%]	Odzysk plazmy Recovery of plasma [%]	Odzysk granul Recovery of granules [%]	Odzysk białka w plazmie Recovery of proteins in the plasma [%]	Zawartość IgY w plazmie IgY content in plasma [mg/ml]	Odzysk frakcji foswitynowej Recovery of phosvitin fraction [%]	Zawartość białka Protein content [%]
Grupa kontrolna Control group	49,61 ^a	15,41 ^a	80,19 ^a	19,81 ^b	8,87 ^b	3,57 ^a	4,35 ^a	58,78 ^a
Grupa doświadczalna – jaja wzbogacone Experimental group – enriched eggs	50,05 ^b	16,41 ^b	81,01 ^a	18,99 ^a	8,05 ^a	4,58 ^b	4,37 ^a	59,27 ^a

a,b – grupy statystycznie jednorodne przy poziomie istotności $p = 0,05$

a,b – statistically consistent groups with the level of significance at $p = 0.05$.

Analizując zawartość kwasów tłuszczowych w pozycji sn-1 i sn-2 fosfolipidów wyizolowanych z żółtek jaj kur Lohmann Brown wykazano statystycznie istotne różnice dotyczące wszystkich kwasów tłuszczowych, poza kwasem DHA, którego zawartość w grupie kontrolnej oraz grupie żywionej paszą wzbogaconą wynosiła odpowiednio 5,51 i 5,12 %. Ponadto podczas analizy zawartości składu kwasów tłuszczowych odnotowano wysoki wzrost zawartości kwasu EPA z poziomu 0,11 % w grupie kontro-

lnej do blisko 1,0 % w grupie doświadczalnej (tab. 3). Samman i wsp. [16] również porównywali zawartość kwasów tłuszczowych w jajach konwencjonalnych, organicznych i omega-3. Zawartość DHA w jajach omega-3 (2,05 %) była znacznie większa niż w organicznych (0,84 %) i kontrolnych (0,85 %), natomiast w tym materiale badawczym nie odnotowano zawartości kwasu EPA. Analiza wyników przedstawionej pracy wykazuje obecność cennych kwasów tłuszczowych nie występujących w jajach komercyjnie dostępnych. Przykładowo Palacios i wsp. [14], przedstawiając skład kwasów tłuszczowych żółtka nie odnotowali zawartości kwasu linolenowego, EPA oraz DHA.

Tabela 2

Skład frakcji fosfolipidów wyizolowanych z żółtka jaja kur Lohmann Brown.

Composition of fraction of phospholipids isolated from egg yolk laid by Lohmann Brown hens.

Grupa badawcza Research group	Ilość wyekstrahowanych fosfolipidów Amount of extracted phospholipids	Czystość fosfolipidów Purity of phospholipids* [%]	Fosfatydylocholina (lecytyna) Phosphatidylcholine (lecithin) [%]	Fosfatydyloetanolamina (kefalina) Phosphatidylethanolamine (cephalin) [%]
Grupa kontrolna Control group	14,81 ^a	85,51 ^a	75,61 ^a	24,39 ^a
Grupa doświadczalna – jaja wzbogacone Experimental group – enriched eggs	15,50 ^b	85,29 ^a	75,70 ^a	24,30 ^a

a,b – grupy statystycznie jednorodne przy poziomie istotności $p = 0,05$

a,b – statistically consistent groups with the level of significance at $p = 0.05$.

*– Czystość fosfolipidów wyrażona jako ilość substancji nierozpuszczalnej w acetonie / Purity of phospholipids expressed as quantity of acetone-insoluble substance.

Wnioski

1. Istnieje możliwość przeprowadzenia wieloetapowego frakcjonowania żółtka jaj kurzych ukierunkowanego na pozyskanie substancji aktywnych biologicznie.
2. Proces wzbogacania jaj w istotny sposób wpłynął na poziom immunoglobuliny Y we frakcji plazmy o potencjalnej możliwości zastosowania jej w preparatach stymulujących odporność organizmu.

Tabela 3

Skład kwasów tłuszczowych w pozycji sn-1 i sn-2 fosfolipidów wyizolowanych z żółtka jaja kur Lohmann Brown.

Composition of fatty acid at sn1 and sn2 position of phospholipids isolated from egg yolks of Lohmann Brown hens.

Pozycja reszt acylowych Position of acyl groups	Grupa badawcza Research group	Kwasy tłuszczowe / Fatty acids							
		16:00	18:00	18:01	18:02	18:03	20:04	20:05	22:06
sn-1	Grupa kontrolna Control group	51,31 ^a	37,30 ^b	9,46 ^b	1,93 ^b	–	–	–	–
	Grupa doświadczalna – jaja wzbogacone Experimental group - enriched eggs	58,68 ^b	33,12 ^a	7,05 ^a	1,15 ^a	–	–	–	–
sn-2	Grupa kontrolna Control group	8,75 ^a	4,03 ^b	50,43 ^b	25,19 ^b	1,07 ^b	4,91 ^a	0,11 ^a	5,51 ^a
	Grupa doświadczalna – jaja wzbogacone Experimental group - enriched eggs	9,44 ^b	3,43 ^a	49,57 ^a	24,94 ^a	–	6,53 ^b	0,97 ^b	5,12 ^a

Kwasy tłuszczowe / Fatty acids:
 C16:0 palmitynowy / hexadecanoic
 C18:0 stearynowy / stearic
 C18:1 oleinowy / oleic ω -9 Δ^9
 C18:2 linolowy / linoleic LA 18:2 ω -9 $\Delta^{9,12}$
 C18:3 linolenowy / α -linoleic ALA 18:3 ω -3 $\Delta^{9,12,15}$
 C20:4 arachidonowy / arachidonic AA 20:4 ω -6 $\Delta^{5,8,11,14}$
 C20:5 eikozapentaenowy / eicosapentaenoic EPA 20:5 ω -3 $\Delta^{5,8,11,14,17}$
 C22:6 dokozaheksaenowy / docosahexaenoic DHA 22:6 ω -3 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$

a,b – grupy statystycznie jednorodne przy poziomie istotności $p = 0,05$.

a,b – statistically consistent groups with the level of significance at $p = 0.05$.

- Istnieje relatywnie prosta metoda izolacji fosfityny z żółtka jaja jako preparatu do utrwalania żywności, charakteryzującego się działaniem przeciwutleniającym i chelatującym.
- Projektowanie jaja pozwala na istotny wzrost zawartości WNKT w strukturze fosfolipidów izolowanych z żółtka jaja. Szczególnie długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

we preferencyjnie wbudowywane są w pozycję sn-2 fosfolipidów, co decyduje o ich wysokiej wartości odżywczej.

5. Stwierdzono istotny wzrost zawartości kwasu eikozapentaenowego (EPA) w wyizolowanych fosfolipidach z żółtek jaj pochodzących od niosek żywionych paszą wzbogaconą, co stwarza nowe możliwości wykorzystania jaj.

Praca naukowa finansowana ze środków na realizację projektu rozwojowego „Chemiczna ekstrakcja frakcji proteinowo-fosfolipidowych żółtka jaja, ich enzymatyczna modyfikacja ukierunkowana na wykorzystanie biomedyczne oraz produkcję suplementów diety” (nr R 05 021 03) w latach: 2007–2010.

Literatura

- [1] Akita E.M., Nakai S.: Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 629-634.
- [2] Aro H., Jarvenpaa E.P., Konko K., Sihvonen M., Hietaniemi V., Huopalahti R.: Isolation and purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction and pilot-scale supercritical fluid techniques. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **228**, 875-863.
- [3] Belhomme C., David-Briand E., Ropers M., Guérin-Dubiard C., Anton M.: Interfacial characteristics of spread films of hen egg yolk phosvitin at the air–water interface: Interrelation with its charge and aggregation state. *Food Hydrocoll.*, 2007, **21**, 896-905.
- [4] Buxmann W., Bindrich U., Heinz V., Knorr D., Franke K.: Influencing emulsifying properties of egg yolk by enzymatic modification by phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* Part 1: Technological properties of incubated egg yolk. *Coll. Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, **76**, 186-191.
- [5] Castellani O., Belhomme C., David-Briand E., Guérin-Dubiard C., Anton M.: Oil-in-water emulsion properties and interfacial characteristics of hen egg yolk phosvitin. *Food Hydrocoll.*, 2006, **20**, 35-43.
- [6] Castellani O., Guérin-Dubiard C., David-Briand E., Anton M.: Influence of physicochemical conditions and technological treatments on the iron binding capacity of egg yolk phosvitin. *Food Chem.*, 2004, **85**, 569-577.
- [7] Daimer K., Kulozik U.: Oil-in-water emulsion properties of egg yolk: Effect of enzymatic modification by phospholipase A₂. *Food Hydrocoll.*, 2009, **23**, 1366-1373.
- [8] Gładkowski W., Chojnacka A., Kielbowicz G., Pisarski B., Trziszka T., Wawrzęczyk C.: Charakterystyka frakcji fosfolipidowych izolowanych z żółtek jaj pochodzących od kur Lohmann Brown i zielononóżki kuropatwianej. *Przem. Chem.*, 2009, **5**, 85.
- [9] Kassis N., Drake S.R., Beamer S.K., Matak K.E., Jaczynski J.: Development of nutraceutical egg products with omega-3-rich oils. *Food Sci. Technol.*, 2010, **43**, 777-783.
- [10] Kopeć W., Bobak Ł., Korzycki M., Skiba T., Stefaniak T., Jawor P.: Optimisation of the dilution method of IgY isolation process from egg yolk of immunized hens. *Proceed. of XIX European Symposium on the Quality of Poultry Meat and XIII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products in Finland*, 2009, pp. 1-6.
- [11] Kovacs-Nolan J., Mine Y.: Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. *J. Immunol. Methods*, 2005, **296**, 199-209.
- [12] Laca A., Paredes B., Diaz M.: A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocoll.*, 2010, **24**, 434-443.

- [13] Nielsen H.: Production of phospholipids from spray-dried egg yolk by consecutive in situ solid phase extraction with acetone and ethanol. *Food Sci. Technol.*, 2007, **40**, 1337-1343.
- [14] Palacios L.E., Wang T.: Egg-Yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *J. Am. Oil Chem. Society*, 2005, **82**, 571-578.
- [15] Pan L.G., Campana A., Tom M.C.: A kinetic study of phospholipid extraction by degumming process in sunflower seed oil. *J. Am. Oil Chem. Society*, 2000, **77**, 1273-1276.
- [16] Samman S., Kung F.P., Carter L.M., Foster M. J., Ahmad Z.I., Phuyal J.L., Petocz P.: Fatty acid composition of certified organic, conventional and omega-3 eggs. *Food Chem.*, 2009, **116**, 911-914.
- [17] Sinanoglou V.J., Strati I.F., Miniadis-Meimaroglou S.: Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study. *Food Chem.*, 2011, **124**, 971-977.
- [18] Shah A., Akoh C.C., Toledo R.T., Corredig M.: Isolation of a phospholipid fraction from inedible egg. *J. Supercrit. Fluids*, 2004, **30**, 303-313.

FRACTIONATION OF EGG YOLK TO OBTAIN PREPARATIONS ENRICHED IN BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

S u m m a r y

Eggs are a raw food material containing all substances indispensable for the development of young organism. They are used in the food industry, as well as in the pharmaceutical, cosmetic, chemical, and feed industry owing to the content of biologically active substances, among other things, immunoglobulin (IgY), phosvitin, and phospholipids.

In the research covered by this paper, it was attempted to fraction chicken egg yolk in order to receive fractions containing rich amounts of immunoglobulin (IgY) and phosvitin, and, also, to isolate phospholipids. The raw material constituted fresh eggs laid by Lohmann Brown hens received from a specialist farm managed by the "Tronina" company. The layers were held in two groups and fed ad libitum. The control group of layers received a standard, full-portion feed mix and a preparation called Biostrong 510 (commercial name), which was a mixture of essential oils and high-quality herbal extracts in the encapsulated form. In the experimental group, the feed was supplemented with Humokarbowit and Humobentofet preparations (containing omega-3 acids) mixed at a mass ratio of 1 : 2.

The content of IgY in the egg plasma of the control group remained at a level of approximately 3.6 mg / ml, while the plasma isolated from the enriched egg yolk laid by the hens fed a supplemented feed contained about 1 mg / ml more of protein. The content of phosvitin in egg yolk of the eggs laid by the layers fed the standard and enriched feed amounted to about 4%. The total protein content in the phosvitin fraction was at a similar level of approximately 60 %. The pure phospholipid fraction, extracted from the egg yolk of hens fed two types of feed and defined as the amount of a substance insoluble in acetone, was roughly 85%. The content of phosphatidylcholine (PC) in this fraction was about 75 %, and of phosphatidylethanolamine (PE) – approximately 24 %.

Key words: phosvitin, phospholipids, immunoglobulin, chicken egg yolk, fractionation 