

MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, WIESŁAW KOPEĆ

IZOLACJA CYSTATYNY Z BIAŁKA JAJA Z ZASTOSOWANIEM FILTRACJI MEMBRANOWEJ I CHROMATOGRAFII POWINOWACTWA

Streszczenie

Podobieństwa budowy i właściwości biologicznych cystatyny białka jaja kurzego do ludzkiej cystatyny c stwarzają możliwość jej wykorzystania w prewencji i leczeniu wielu chorób. Dlatego celem badań było opracowanie podstaw procesów izolacji i oczyszczania cystatyny białka jaja przy użyciu techniki filtracji membranowej i chromatografii powinowactwa. W wyniku diafiltracji odzyskiwano z białka jaja lub jego roztworów, po usunięciu z nich lizozymu, 40-65% aktywnego inhibitora. Wykazano, że usunięcie lizozymu z roztworu białka nie wpływa na ilość odzyskanej cystatyny w filtratach. Natomiast w procesach oczyszczania cystatyny metodą chromatografii powinowactwa odzyskiwano do 50% inhibitora zawartego w preparatach uzyskanych po suszeniu rozpyłowym roztworów białek; ilości te były niższe o 3-4% jeśli oczyszczano preparaty białka z którego usunięto lizozym.

Wstęp

Surowce żywnościowe są bogatym źródłem substancji biologicznie czynnych tj. enzymów i ich inhibitorów, witamin i prowitamin, steroli i in. Dużo tych związków zawiera jajo kurze, a szczególnie jego część białkowa bogata m.in. w lizozym, enzym o silnych właściwościach bakteriobójczych, który jest pozyskiwany z tego surowca i wykorzystywany na szeroką skalę zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w medycynie [8]. Białko jaja zawiera także owomucynę, która stanowi bogate źródło kwasu sialowego czy owomukoid wykazujący silne właściwości inhibicji enzymów proteolitycznych [3]. Mniej znanym biologicznie aktywnym składnikiem białka jaja jest cystatyna, będąca inhibitorem proteaz cysteinowych. Występuje w białku jaja kurzego jako mieszanina dwóch głównych izoelektrycznych form o identycznej sekwencji aminokwasowej (obie formy zawierają po 116 aminokwasów) i masie molekularnej 12700

Mgr inż. M. Korzeniowska, dr hab. inż. W. Kopeć, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych, Akademia Rolnicza we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław.

Da: formy A nieufosforylowanej o pI = 6,5 oraz formy B ufosforylowanej o pI=5,6 [2, 9]. Cystatyna białka jaja kurzego jest silnym inhibitorem papainy i ficyny oraz katepsyn B, H, L i peptydaz papaino-podobnych [1]. Białko to charakteryzujące się wysoką stabilnością zarówno w ekstremalnych warunkach pH (pH około 12,0), jak i temperatury (-20°C i 115°C przez 15 min nie powoduje spadku aktywności inhibicyjnej) [5, 10]. Według klasyfikacji Rawlingsa i Barretta [6] należy ona wraz z ludzką cystatyną c do drugiej podrodziny cystatyn; oba inhibitory wykazują wysoki stopień podobieństwa, wyrażający się zbliżoną masą molekularną, strukturą trzeciorzędową, sekwencją aminokwasową oraz sposobem inhibicji enzymów. Dlatego też cystatyna izolowana z białka jaja kurzego może być stosowana w leczeniu wielu chorób, m.in.: chorób nowotworowych, choroby Alzheimera, czy schorzeń przyzębia [4, 7]. Istotnym ograniczeniem w pozyskiwaniu inhibitora z białka jaja jest jego niska zawartość wynosząca 0,05% oraz duża lepkość białka jaja utrudniająca proces chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem papainy, który jest podstawową metodą wykorzystywaną do oczyszczania cystatyny. W związku z tym procesy izolowania i oczyszczania cystatyny są łatwiejsze do przeprowadzenia, jeśli stosuje się rozcieńczone roztwory białka, bądź frakcje białek jaja uzyskiwane m.in. w procesach izolacji lizozymu prowadzonych z wykorzystaniem technik chromatograficznych i separacji membranowej. Proces pozyskiwania cystatyny jest wówczas dwustopniowy; w pierwszym etapie wydziela się filtrat białkowy wzbogacony w inhibitor (przy wykorzystaniu technik membranowych), w drugim prowadzi się oczyszczanie inhibitora techniką chromatografii powinowactwa, dlatego też celem przeprowadzonych badań było opracowanie podstaw procesów izolacji i oczyszczania cystatyny białka jaja przy użyciu wspomnianych technik separacji.

Material i metody badań

Całość doświadczenia, podobnie jak proces izolacji cystatyny z białka jaja i jej oczyszczania, podzielono na dwa etapy. W etapie pierwszym pozyskiwano filtry białek jaja wzbogacone w cystatynę metodami separacji membranowej. Materiałem do badań było białko jaja, oddzielone od żółtka metodą przemysłową (Ovopol, Nowa Sól), o pH w granicach 8,5–9,0, które poddawano procesowi mikrofiltracji (diafiltracji) na filtrach kapilarnych polipropylenowych o rzeczywistym punkcie "odcięcia" wyznaczonym w stosunku do białek jaja na poziomie 30 kDa (w warunkach filtracji niskociśnieniowej rzędu ok. $1-2 \cdot 10^3$ kPa) przy rozcieńczeniu wodą w stosunku od 1:2 do 1:6. Przeprowadzono również diafiltrację roztworów białka jaja (rozcieńczonych w stosunku 1:4) po izolacji z nich lizozymu metodą chromatografii jonowymiennej w warunkach przemysłowych (Ovopol, Nowa Sól). Filtry uzyskane w wyniku separacji na filtrach kapilarnych polipropylenowych zagęszczano na filtrach membranowych polisulfonowych o nominalnym punkcie "odcięcia" 10 kDa, a następnie suszono rozpyło-

wo uzyskując dwa rodzaje preparatów wzbogaconych w cystatynę; pierwszy z białka jaja i drugi z białka jaja – z którego usunięto lizozym.

W drugim etapie badań preparaty białka jaja wzbogacone w cystatynę, po uprzedniej rehydratacji wodą w stosunku 1:8, oczyszczano techniką chromatografii powinowactwa według Siewińskiego i wsp. [7]. W tym celu roztwory preparatów nanoszono na złożę kolumny chromatograficznej Sepharose 4B z immobilizowaną papainą, gdzie następowało wiązanie cystatyny tzw. wolnej, tzn. nieskompleksowanej z innymi białkami. Po przejściu roztworu białka przez złożę kolumny (tzw. kolumna I) przemywano 200 cm³ wody destylowanej, a następnie 50 cm³ 2% roztworem NaCl w celu usunięcia białek zanieczyszczających preparat. Inhibitor odzyskiwano ze złoża kolumny poprzez przeprowadzenie obróbki chemiczno-termicznej wykorzystującej bardzo wysoką oporność cystatyny na działania termiczne i zmiany pH. Obróbka ta polegała na doprowadzeniu pH zawiesiny złoża ze związanym białkiem do wartości 12,0 przy użyciu 0,1 M NaOH, ogrzaniu w 100°C przez 3 min, schłodzeniu do 2–4°C i utrzymaniu tej temperatury przez 24 godziny, następnie zmianie pH do wartości 6,0–7,0 przy użyciu 0,1 N HCl i odwirowaniu roztworu zawierającego oczyszczoną cystatynę od złoża. Roztwór białek uzyskany po przejściu przez kolumnę chromatograficzną zawierający kompleksy cystatyny z innymi białkami poddawano takiej samej obróbce chemiczno-termicznej, jak w przypadku złoża, w celu rozłożenia kompleksów, doprowadzenia do denaturacji innych niż cystatyna białek i ich usunięciu z roztworu w wyniku wirowania. Tak przygotowany roztwór nanoszono na złożę drugiej kolumny chromatograficznej (tzw. II kolumna) i powtarzano całość procedury przemywania i odzyskiwania inhibitora ze złoża.

Zdolność (aktywność) inhibicyjną cystatyny oznaczano w roztworach odzyskanych ze złoża kolumny po obróbce chemiczno-termicznej, a także w roztworach uzyskanych po przejściu przez kolumnę oraz roztworach przemywających tj. wodzie i 2% roztworze NaCl metodą pośrednią poprzez określenie zdolności hamowania aktywności papainy wobec substratu syntetycznego BANA [7]. Jednostka aktywności cystatyny stosowana w badaniach własnych oznacza zdolność inhibowania przez 100 mg cystatyny takiej ilości papainy, która hydrolizuje 1,0 mM substratu syntetycznego BANA na minutę w warunkach standardowych (37°C). Odzysk inhibitora został wyliczony jako stosunek aktywności oczyszczonego inhibitora [jedn. akt.] do aktywności inhibitora w roztworze wyjściowym [jedn. akt.], przeliczony na objętość roztworów oraz wyrażony w procentach.

Omówienie wyników

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w przeprowadzonych procesach membranowych tj. mikrofiltracji i diafiltracji odzyskiwano od około 10% do 65% aktywnej cystatyny zawartej w wyjściowym białku jaja, przy czym najkorzystniej wy-

padła diafiltracja roztworów białka rozcieńczonych wodą w stosunku 1:4, dla której odzysk aktywnego inhibitora w filtracji wynosił 64,4% a po zagęszczaniu i suszeniu 50,4% (tab. 1). Po diafiltracji roztworów białka o stosunku rozcieńczenia 1:6 uzyskano odzysk cystatyny wynoszący 47,6%, który nie różni się statystycznie od wartości uzyskanej w procesie, w którym filtrowano białko rozcieńczone w stosunku 1:4. Tak więc stosowanie wyższych rozcieńczeń (1:6) jest nieuzasadnione. Stwierdzono również, że odzysk cystatyny z roztworów białka jaja, z których uprzednio wydzielono lizozym, kształtuje się na poziomie zbliżonym do odzysku inhibitora z roztworów białka nie

Tabela 1

Separacja membranowa roztworów białka jaja.
Membrane separation of egg white solutions.

Zawartość aktywniej cystatyny Content of active cystatin	Mikrofiltracja Microfiltration	Diafiltracja 1:2 Diafiltration 1:2	Diafiltracja 1:4 Diafiltration 1:4	Diafiltracja 1:6 Diafiltration 1:6	Diafiltracja po adsorpcji lizozymu 1:4 Diafiltration after lysozyme removal 1:4
Zawartość aktywnej Cystatyny w filtracie w stosunku do zawartości wyjściowej (%) Quantity of active cystatin in filtrates in relation to initial amount (%)	9,4 a	41,8 b	64,4 c	65,0 c	64,0 c
Zawartość aktywnej cystatyny w preparatach po zagęszczaniu i suszeniu w stosunku do zawartości wyjściowej (%) Quantity of active cystatin in preparates after concentration and drying in relation to initial amount (%)	6,8 a	30,0 b	50,4 c	47,6 c	52,1 c

a, b, c, d wystąpienie wspólnej litery w indeksach wartości średnich w jednym wierszu wskazuje na brak różnic statystycznych przy $P \geq 0,95$.

The same letter in lineans indices in row shows lack of significant difference at $P \geq 0,95$.

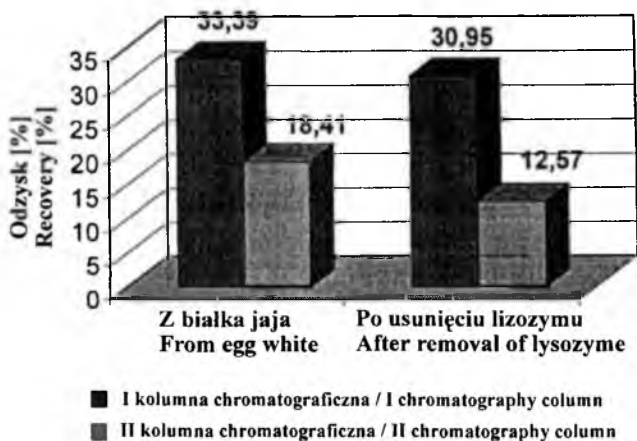
poddanego procesowi chromatografii jonowymiennej w celu adsorpcji lizozymu i wynosi 52,1%. Najniższe wartości (6,8%) odzysku inhibitora w filtracji uzyskano po procesie mikrofiltracji nierozcieńczonego białka jaja, co wyklucza tę metodę jako możliwą do zastosowania w warunkach przemysłowych.

Do oczyszczania cystatyny zawartej w suszonych preparatach białka jaja wzbogaconych w ten inhibitor (po ich uprzedniej rehydratacji) zastosowano metodę chromatografii powinowactwa inhibitora tj. cystatyny do enzymu – papainy. Ilości oczyszczonej cystatyny odzyskanej bezpośrednio w formie inhibitora niezwiązanego (I kolumna) oraz inhibitora wydzielonego z kompleksów białkowych (II kolumna) przedstawiono na rys. 1. W efekcie przeprowadzonego procesu ze złoża pierwszej kolumny chromatograficznej odzyskiwano około 33,39% aktywnej cystatyny w odniesieniu do ilości inhibitora w wyjściowych suszonych preparatach wzbogaconych w cystatynę, dla białka o pełnym składzie protein oraz około 30,95% dla białka po izolacji lizozymu. Na złożu kolumny chromatograficznej II adsorbowano cystatynę z roztworów po rozłożeniu kompleksów białkowych odzyskując 18,41% wyjściowej ilości aktywnego inhibitora dla roztworów białka nie poddanego procesowi adsorpcji lizozymu i 12,57% dla roztworów po izolacji lizozymu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że z roztworów, z których usunięto uprzednio lizozym, uzyskuje się o 3–4% mniej oczyszczonej cystatyny. Łącznie z preparatów białka jaja wzbogaconych w cystatynę odzyskiwano około 44–52% aktywnego inhibitora z uwzględnieniem strat w procesie rehydratacji. Siewiński i wsp. [7] w swoich badaniach uzyskiwali wyższą ilość oczyszczonej cystatyny tj. około 70% w stosunku do ilości wyjściowej, stosując podobną procedurę analityczną. Jednakże rozdział i oczyszczanie cystatyny prowadzono z natywnego białka jaja (bez zagęszczania i suszenia), co zapewne wpływało na lepszą wydajność procesu.

Generalnie stosunkowo niskie wydajności procesu oczyszczania cystatyny białka jaja, z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, wynikają z dużego udziału kompleksów inhibitora w roztworach i związanej z tym konieczności prowadzenia procesu co najmniej dwustopniowego.

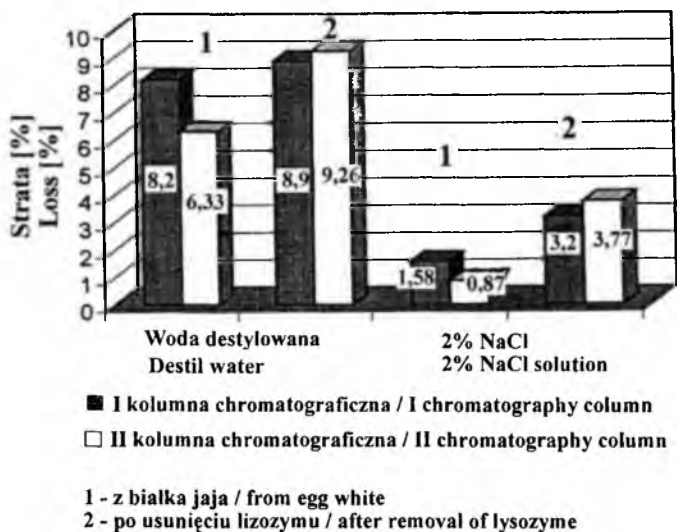
Na rys. 2. przedstawiono straty cystatyny w roztworach użytych do przemywania złoża kolumny chromatograficznej (I i II kolumny), tj. wodzie destylowanej i 2% NaCl oraz w roztworze uzyskanym po przejściu rozcieńczonego preparatu wzbogaconego w cystatynę przez pierwszą oraz drugą kolumnę. W wodzie destylowanej użytej do przemywania pierwszej kolumny chromatograficznej zanotowano od 8,20% do 8,90% wyjściowej ilości aktywnego inhibitora, natomiast w przypadku drugiej kolumny wykazano 6,33–9,26% aktywności cystatyny; przy czym wyższe wartości odnoszą się do preparatów białka z usuniętym lizozymem. Podobna zależność występowała w odniesieniu do strat cystatyny w 2% roztworach NaCl użytych do przemywania złoża kolumn chromatograficznych. W wyniku przemywania pierwszej kolumny tracono od 1,58%

do 3,20% aktywnej cystatyny, a w przypadku drugiej kolumny od 0,87% do 3,77% inhibitora.



Rys. 1. Odzysk cystatyny w procesie chromatografii powinowactwa w zależności od rodzaju oczyszczanego preparatu.

Fig. 1. Cystatin recovery in affinity chromatography process according to the kind of purified preparation.



Rys. 2. Straty aktywnej cystatyny w trakcie przemywania kolumny chromatograficznej w zależności od rodzaju oczyszczanego preparatu.

Fig. 2. Loss of active cystatin in washing processes of affinity chromatography column according to the kind of washing solution.

Wnioski

1. W wyniku diafiltracji białka jaja rozcieńczonego wodą odzyskiwano w filtracie od 40% do 65% aktywnego inhibitora; zwiększanie rozcieńczenia białka jaja powyżej wartości 1:4 nie wpłynęło na wzrost ilości aktywnej cystatyny.
2. W procesie chromatografii powinowactwa odzyskiwano do 50% cystatyny zawartej w preparatach białka jaja wzbogaconych w inhibitor, z czego około 33% stanowiła cystatyna w formie niezwiązanej.
3. Z preparatów wytworzonych z białka, z którego uprzednio usunięto lizozym, odzyskiwano o 3–4% mniejsze ilości aktywnej cystatyny niż z preparatów wytworzonych z białka jaja nie poddanego procesowi adsorpcji.

Literatura

- [1] Barrett A.J., Anastasi A., Brown M.A., Kembhavi A.A., Nicklin M.J.H., Sayers Ch.A. Sunter D.C.: Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases - improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum - *Biochem. J.*, **211**, 1983, 129.
- [2] Bode W., Engh R., Musil D., Thiele U., Huber R., Karshikov A., Brzin J., Kos J., Turk V.: The 2,0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.*, **7**, **8**, 1988, 2593.
- [3] Henskens Y.M.C., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V.: Cystatins in health and disease. *Biol. Chem.*, **377**, 1996, 71.
- [4] Jerala R., Żerownik E., Lohner K., Turk V.: Structural basis for the difference in thermodynamic properties between the two cysteine proteinase inhibitors human stefins A and B. - *Prot. Eng.*, **7**, 1994, 977.
- [5] Rawlings N.D., Barrett A.J.: Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J. Mol. Evol.*, **30**, 1990, 60.
- [6] Siewiński M.: Method of purification of thiol proteinase inhibitors from human urine. *Cancer Biochem. Biophys.*, **12**, 1991, 33.
- [7] Ternes W.: *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung*. Behr's Verlag, Hamburg 1990, 43.
- [8] Trziszka T., Kopeć W.: Lizozym fenomenalny składnik jaja. *Drobiarstwo* 1996, 43.
- [9] Turk V., Brzin J., Longer M., Ritonja A., Eropkin M., Borchart U., Machleidt W.: Protein inhibitors of cysteine proteinases III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg white. *Z. Physiol. Chem.*, **364**, 1983, 1487.
- [10] Żerownik E., Cimerman N., Kos J., Turk V., Lohner K.: Thermal denaturation of human cystatin c and two of its variants; comparison to chicken cystatin. *Biol. Chem.*, **378**, 1997, 1199.

CYSTATIN ISOLATION FROM EGG WHITE USING MEMBRANE FILTRATION AND AFFINITY CHROMATOGRAPHY

S u m m a r y

The similarity of structure and biological properties of hen's cystatin and human cystatin c gives the possibility for application of egg cystatin in therapy and prevention of many illness. In the studies basic processes for isolation and purification of cystatin from hen's egg using membrane filtration and affinity chromatography have been worked out. As the effect of diafiltration 40-65% active inhibitor was recovered from egg white or egg white solutions after lysozyme removal. It was found that quantity of active cystatin is not lowered if lysozyme was removed from egg white. Purification of cystatin with affinity chromatography led to 50% recovery of inhibitor from preparations obtained after spray drying of protein solutions. The amount of purified inhibitor was 3-4% lowered for preparations made from egg white after lysozyme removal. ✕