نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۴، ص. ۵۷۱-۵۶۰

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 5, Dec - Jan 2015, p. 560-571

استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص پروتئین لیزوزیم سفید تخم‌مرغ با بازدهی بالا

زینب محمدی[۱]، دینا مرشدی[۲*]، مسعود مشهدی اکبر بوجار[۳]، فرهنگ علی اکبری[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۰۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۰۴/۰۸

چکیده

لیزوزیم سفیده تخم مرغ بدلیل ویژگی‌های خاص، یکی از پروتئینهایی است که در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و دارویی اهمیت روز افزونی یافته است. لیزوزیم بعنوان نانوفیبریل زیستی، آنتی بیوتیک، افزودنی غذایی طبیعی و شیرین‌کننده استفاده می‌شود. همچنین با توجه به اطلاعات بیوفیزیکی- بیوشیمیایی نسبتا کامل، بعنوان مدل در مطالعات مربوط به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها مطرح می‌باشد. با توجه به اهمیت روز افزون لیزوزیم توسعه روشی موثر، ساده و ارزان برای تخلیص این پروتئین مورد نیاز است. بر این اساس روش تخلیصی مبتنی بر رسوب‌دهی با استفاده از نمک و کروماتوگرافی تعویض یون انجام گردید. در این مطالعه پس از جداسازی سفیده تخم مرغ، عصاره حاصل طی دو مرحله توسط نمک آمونیوم سولفات ۳۰ و ۵۰ درصد رسوب‌دهی گردید. سپس لیزوزیم توسط کروماتوگرافی تعویض کاتیون در ستون SP سفارز تخلیص شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ، لیزوزیم با فعالیت ویژه ۳۳۳(U/mg) و خلوص حدود ۹۸ تا ۱۰۰ درصد تخلیص گردید. مطالعات ساختاری با استفاده از دورنگ نمایی دورانی (CD) و فلورسانس ذاتی موید تشابه ساختاری در سطح ساختار دوم و سوم پروتئین با نمونه استاندارد بود. در این مطالعه یک روش آزمایشگاهی ساده، سریع، کم هزینه و با کیفیت بالا جهت خالص‌سازی لیزوزیم بهینه گردیده است.

واژه‌های کلیدی: آنالیز ساختار پروتئین، تخلیص پروتئین، کروماتوگرافی تعویض یون، لیزوزیم سفیده تخم مرغ.

مقدمه

فرآیند جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها بدلیل تنوع در ساختار و ویژگی‌های شیمیایی- فیزیکی منحصر بفرد آنها پیچیده است (Nawi, 2006). رشد سریع در زمینه زیست فن آوری منجر به افزایش تقاضا برای روش‌های موثر و مناسب تخلیص پروتئین‌ها شده است.

لیزوزیم بدلیل ویژگی‌ها و کاربردهایش یکی از مهمترین پروتئین‌ها در زیست‌فناوری محسوب می‌شود. لیزوزیم بعنوان مدلی برای تحقیق بر روی ساختار و عملکرد پروتئین کاربرد دارد (Swaminathan *et a*l.,2011). لیزوزیم ویژگی‌های مهمی بعنوان افزودنی غذایی، بدلیل پایداری گرمایی در محدوده وسیعی از دما (نزدیک به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و انجماد خشک) و فعالیت بهینه ضد میکروبی در غذاهای اسیدی با pH (۵/۳-۶/۴) دارد (Safarik *et al*., 2007). فعالیتهای ضد میکربی آن در برابر طیف وسیعی از باکتریها از قبیل *باسیلوس استیروترموفیلوس*، *میکروکوکوس* اس‌پی‌پی، *کلاستریدیوم تیروبوتریکوم* و *لیستریا مونوسیتوژنها* و قارچها است. لیزوزیم در واقع یک آنتی‌بیوتیک طبیعی است. در صنعت بعنوان افزودنی یا نگهدارنده طبیعی جایگزین افزودنی‌های شیمیایی گردیده است و در فرآوری محصولات غذایی و برای جلوگیری از رشد باکتری در محصولات گوشتی نظیر سوسیس، گوشت گاو و خوک بکار می رود و نیز برای جلوگیری از رشد *کلاستریدیوم تیروبوتریکوم* در محصولات لبنی (در پنیر سازی) استفاده می‌شود (Safarik *et al*., 2007, Jin *et al*., 2009 and Dembczynski *et al*., 2010). همچنین نشان داده شده است که لیزوزیم موجب تسریع در به عمل آمدن پنیر و از طرف دیگر باعث کنترل رشد باکتری اسید لاکتیک در تولید نوشابه‌های الکلی می‌شود (You *et al*., 2010). لیزوزیم

۱-کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۲-استادیار قسمت زیست فناوری صنعت و محیط، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۳-دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۴- دانشجوی دکتری زیست فناوری دارویی، قسمت زیست فناوری صنعت و محیط، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: morshedi@nigeb.ac.ir

همچنین می‌تواند بعنوان افزودنی شیرین‌کننده به شیر بچه اضافه شود زیرا پروتئینی با طعم شیرین با مقدار آستانه شیرینی حدود ۷ میکرومولار است (Masuda *et al*.,2005).

از کاربردهای دیگر لیزوزیم، استفاده از تجمعات القا شده منظم فیبریلی آن در حوزه نانو است. فیبریلهای پروتئینی اساسا بدلیل سنتز آسان و تجدیدپذیر بودن و تجزیه پذیری زیستی، بعنوان رده جدیدی از نانو مواد زیستی- عملکردی، بکار می‌روند (Morshedi *et al*., 2013).

لیزوزیم که بعنوان مورامیداز و یا ان استیل مورامیک هیدرولاز (EC:3.2.1.17) نیز شناخته شده است، یک آنزیم گلیکوزیدازی است. لیزوزیم به هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی (۴-۱) بین ان استیل مورامینیک اسید و ان استیل گلیکوز آمین در پلی ساکاریدهای دیواره سلول باکتری، سرعت می بخشد، فعالیت ضد میکروبی لیزوزیم بدلیل عدم وجود غشای خارجی اطراف لایه پپتید وگلیکان، بر باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی بیشتر است (Safarik *et al*., 2007).

آنزیم لیزوزیم تک زنجیره، متشکل از ۱۲۹ اسید آمینه، با وزن مولکولی ۱۴/۴ کیلودالتون و pH بهینه ۹/۲، pH ایزوالکتریک برابر ۱۱/۳۵ می‌باشد. این پروتئین جزئی از پروتئین‌های کروی و ساختاری تقریبا به شکل بیضی دارد. دارای شکاف عمیقی در یک طرف آن است که مولکول را به دو دومین[1] بنام های آلفا و بتا تقسیم می‌کند. لیزوزیم دارای چهار پل دی‌سولفیدی است، که همراه با شش ناحیه هلیکس، باعث پایداری دمایی بالای مولکول می‌شود (Mecitoflu *et al*., 2006).

از میان انواع لیزوزیم‌های طبیعی تنها آنزیم نوع c از سفیده تخم‌مرغ، بعنوان نگهدارنده غذایی استفاده می‌شود که دلیل آن تخلیص نسبتا آسان، سمیت پایین و تداخل کم در کیفیت غذاها است (Jin *et al*., 2009). مهمترین و ارزانترین منبع لیزوزیم، سفیده تخم‌مرغ است که علاوه بر دسترس بودن، تقریبا ۳/۵ درصد وزن کل پروتئینهای سفیده را تشکیل می دهد (Cegielska-Radziejewska *et al*., 2008).

امروزه استفاده از لیزوزیم استقبال روزافزونی یافته است و تخمین زده شده که هر ساله بیشتر از صد تن لیزوزیم در زمینه‌های مختلف غذایی، دارویی و زیست‌فناوری استفاده گردد (You *et al*., 2010). برای جداسازی لیزوزیم از سفیده تخم‌مرغ روش‌های متعددی بکار برده شده که شامل کروماتوگرافی تعویض یون، کروماتوگرافی تمایلی، کروماتوگرافی اتصال رنگ، صافیهای خیلی حساس (تصفیه در حد بالا)[2]، سیستم دو فازی آبی نمک/ پلی اتیلن گلیکول[3]، میسل‌های معکوس، رسوب‌دهی تمایلی فلزی یا جذب به باقیمانده‌های گیاهی هستند که دارای مزیت‌ها و محدودیت‌هایی در استفاده هستند (Cegielska-Radziejewska *et al*., Safarik *et al*., 2007, 2008 and Dembczynski *et al*., 2010). بر این اساس در این مطالعه سعی شد، روشی ساده و سریع با بازدهی و خلوص بالا بر پایه کروماتوگرافی تعویض یون برای تخلیص این پروتئین طراحی و اجرا گردد.

مواد و روش‌ها

مواد

تخم‌مرغ تازه تهیه شده از سوپر مارکت، تنظیف کتانی[4]، آمونیوم سولفات[5]، لیزوزیم استاندارد (L 2879 057K7013) از شرکت سیگما، کیسه دیالیز (Dialysis Tubing Cellulose, D 9652-100Ft, Cut Off 10000)، رزین (SP Sepharose Fast Flow) از شرکت (Amersham Biosciences)، نشانگر وزن مولکولی پروتئین (فرمنتاز) (Broad Range Fermentase # 7720S)، مواد مربوط به الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات[6]، معرف برادفورد[7]، کوماسی بلو آر۲۵۰[8]، باکتری میکروکوکوس روزئوس[9]، محیط کشت (Luria Bertani Medium)، و مابقی مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق از نوع آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک و سیگما تهیه گردید.

روش‌ها

استخراج: ابتدا سفیده از زرده تخم‌مرغ با دقت بدون اینکه با هم مخلوط گردد جدا شد. سپس سفیده با بافر رقیق سازی (تریس- اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۲، اوره ۲/۵ مولار و NaCl ۱۰۰ میلی مولار)، به نسبت‌های به ترتیب یک به یک و نیم رقیق و برای حذف ذرات اضافه از تنظیف کتانی عبور داده شد. به سفیده رقیق و فیلتر شده مقدار یک میکرو لیتر مهار کننده پروتئاز (فنیل متیل سولفونیل فلوراید[10])، ۱۰۰ میلی مولار برای حذف پروتئازهای احتمالی اضافه شد. سپس محلول حاصل با سرعت g ۹۳۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی آن با آمونیوم سولفات ۳۰ درصد به آهستگی در مدت ۱ ساعت توسط همزن مغناطیسی در اتاق سرد رسوب دهی و رسوب ایجاد شده با سانتریفوژ

1 Domain
2 Ultrafiltration
3 PEG

4 Cheezeclothe
5 Ammonium sulfate
6 SDS-PAGE
7 Bradford Reagent
8 Coomassie Brilliant Blue R250
9 Micrococcous Roseous (MR)
10 PMSF

با سرعت g ۱۸۴۰۰ بـه مـدت ۳۰ دقیقـه در ۴ درجـه سـانتی‌گـراد از محلول رویی جدا شد. سپس محلول رویی مجددا با آمونیوم سـولفات ۵۰ درصد همانند مرحله قبل رسوب‌دهی شـد و رسـوب ایجـاد شـده، مثل مرحله قبل از محلول رویی جدا شد. در ایـن مرحلـه رسـوب کـه حـاوی پـروتئین لیـزوزیم بـود بـا بـافر حـل رسـوب (تـریس- اسـید کلریدریک ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۲ و اوره ۲/۵ مولار)، تقریبا به نسبت یک به یک و نیم حل شد تا محلول شفافی بدسـت آمـد سـپس ایـن محلول با سرعت g ۹۳۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سـانتی‌گـراد سانتریفوژ و مایع رویی آن برای عبور از سـتون کروماتوگرافی تبـادل یون جدا شد.

تخلیص: کروماتوگرافی تبادل یون کاتیونی در ستونی به ارتفـاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر داخلی دو سانتی‌متر، کـه حـاوی رزیـن از جـنس اس‌پی سفارز با گروه تبادل یون سولفوپروپیل بود، انجام گرفت. رزین بصورت پیش خیس خـورده[1] در اتانـل ۲۰٪ قـرار داشـت کـه بعـد از برداشتن رزین در حجمی برابر (یا کمی بیشتر) با حجم محلول نمونـه حاوی پروتئین (بدست آمده از مرحله رسوب‌گذاری)، طی دو مرحله بـا پنج برابر حجم آب مقطر شسته شد و به ستون منتقل شد. بعد رزین با بافر اتصال دهنده، (بافر A (تریس- اسید کلریـدریک ۰/۰۵ مـولار بـا pH ۷/۲ و اوره ۲ مولار))، شسته شد تا pH رزین درون ستون با pH بافر اتصال دهنده یکی شد (کالیبره شدن). در مرحله بعد پـس از ورود نمونه به ستون و ایجاد جریانی با سرعت ۴۰۰ میلی‌لیتر در ساعت بـه کمک پمپ پریستالتیک، ستون با بافر جدا کننده که به صورت پله‌ای، غلظت آمونیوم سولفات در آن زیاد می‌گردید (نسبت بافر B به بافر A از صفر به صد تا صد به صـفر) شسـته شـد (بـافر B (تـریس- اسـید کلریدریک ۰/۱ مولار با pH ۷/۲، اوره ۲ مولار و آمونیوم سولفات ۰/۲ مولار)) و هر قسمت[2] بطور جداگانه در حجـم‌هـای ۱۰ میلـی لیتـری جمع آوری و از هر قسمت نمونه ای روی ژل پلی آکریل آمید-سـدیم دو دسیل سولفات برده شد.

دیالیز: قسمت حاوی پروتئین لیزوزیم (که با بررسی الکتروفورز و کنترل با مارکر وزنی مشخص شد) از مرحلـه سـتون تبـادل یـون، در کیسه دیالیز ریخته و به مدت ۳۶ ساعت در مقابـل بـافر بـی‌کربنـات آمونیوم ۳۰ میلی‌مولار به حجم ۲۰۰۰ میلی لیتر با سه بار تعویض بافر در سردخانه (۴ درجه سانتی‌گراد)، برای جدا شـدن نمـک از پـروتئین، دیالیز گردید.

خشک‌سازی انجمادی: محلول کیسه دیـالیز توسـط ازت مـایع منجمد شد. سپس با قرارگرفتن در دسـتگاه خشـک‌سـازی انجمـادی، خشک و پودر گردید. پودر لیزوزیم برای انجام آزمایش‌های بعـدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شناسایی شاخصه‌های پروتئین

تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین تخلیص شده بـر طبـق روش برادفورد و با استفاده از پروتئین لیزوزیم خریداری شده از شرکت سیگما بعنوان پروتئین استاندارد برای بدست آوردن منحنی اسـتاندارد، سنجیده شد. غلظتهایی از پروتئین تخلیص شده را با معـرف برادفـورد واکنش داده و جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نـانومتر قرائـت شـد و بـا توجه به معادله بدست آمده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین با سه بار تکرار تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی لیزوزیم: سنجش فعالیت لیـزوزیم بـا روش پیشـنهاد شـده توسـط Shugar (Shugar, 1952 and Sigma-Aldrich, 2011) با کمی تغییـرات، از طریـق انـدازه‌گیـری کاهش شفافیت[3] براساس لیزشدن بـاکتری *میکروکوکـوس روزئـوس* توسط آنزیم لیزوزیم، انجام شد. یک واحـد آنزیمـی برابـر بـا کـاهش شفافیتی بـه انـدازه ۰/۰۰۱ در دقیقـه در جـذب ۴۵۰ نـانومتر در pH معادل با ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد است. ابتدا آنزیم تخلیص شده به میزان ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر دوبار تقطیر سـرد حـل کرده و تا زمان سـنجش سـرد نگـه داشـته شـد و بلافاصـله قبـل از سنجش تا غلظت ۵۰۰-۱۵۰واحد آنزیمی بر میلـی‌لیتـر بـا آب دو بـار تقطیـر رقیـق شـد. در مرحلـه بعـد پـس از تنظـیم دسـتگاه اسـپکتروفتومتر (PG Instruments T80+ Double Beam UV/Vis spectrophotometer (Leicestershire, England) در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، از سوسپانسـیون باکتری آماده شده، بعنوان نمونه شاهد استفاده و به ۲/۹ میلـی‌لیتـر از سوسپانسیون باکتری آماده مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر آنـزیم لیـزوزیم رقیـق شده اضافه شد سپس تغییرات جذب آن در طول موج ۴۵۰ نـانومتر در دقیقه ثبت و فعالیت آنزیم طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Units/mg} = \frac{\triangle A450/\text{min} \times 1000}{\text{mg enzyme in reaction mixture}} \quad (۱)$$

فلورسانس ذاتـی (Intrinsic fluorescence): طیـف نشـر فلورسانس ذاتی با ابزار اسـپکتروفلورومتر کـری اکلیـپس واریـان[4] بـا کووت با طول مسیر نور یک سانتی متر، در دمـای اتـاق انجـام شـد. برای اندازه گیـری نشـر فلورسـانس ذاتـی از پـروتئین لیـزوزیم تـازه تخلیص شده و استاندارد بعنوان کنترل، به غلظت ۰/۰۵ میلی گرم بـر میلی لیتر در بافر تریس یک مولار با pH معـادل بـا ۷/۲، برداشـته و نشر فلورسنس آن در طول موج تحریکی ۲۸۰، طول موج نشر ۳۱۰ تا ۳۹۰ نانومتر، پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر ۵ نـانومتر بـا سـه بـار

1 Preswollen
2 Fraction

3Turbidity
4 Cary Eclipse VARIAN

تکرار اندازه گیری شد.

طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism (CD)): طیف دورنگ نمایی دورانی پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر AVIV215 بدست آمد. برای اندازه گیری طیف CD در محدوده فرابنفش دور (۲۶۰-۱۹۰ نانومتر)، از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر پروتئین و سلول[1] (کووت[2] یا ظروف مخصوص حاوی نمونه برای اندازه گیری) با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر استفاده شد. محاسبه درصد ساختارهای دوم براساس طیف CD فرابنفش دور با استفاده از نرم افزار CDNN نسخه ۲,۱,۰,۲۲۳ انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS به روش آنالیز واریانس یک طرفه (Student T test) و مقایسه میانگین به روش LSD و دانکن صورت پذیرفت و مقدار P_{Value} کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار تلقی شد.

نتایج و بحث

فرآیند جداسازی جزء به جزء[3] پروتئین از عصاره خام آنها گران و زمان‌بر است (Nawi, 2006). رشد سریع در زمینه زیست‌فناوری به افزایش تقاضا برای فرآیند های کاراتر تخلیص پروتئین منتهی شده است. با توجه به اهمیت لیزوزیم در زیست‌فناوری ، صنعت غذایی، دارویی و غیره، تسهیل تولید و خالص سازی این پروتئین زمینه‌ساز تسریع در مطالعات علوم زیست‌فناوری می‌شود و نیز پیشرفت فن آوری تولید انبوه آن می‌تواند تا حد بالایی منجر به کاهش هزینه‌های توسعه صنایع غذایی و دارویی گردد. بر اساس مزیت‌های فراوان روش کروماتوگرافی تبادل یون نسبت به روش‌های موجود، در این مطالعه با ترکیب روش رسوب‌گذاری و کروماتوگرافی تبادل کاتیون، روشی ساده برای بهینه سازی تخلیص لیزوزیم طراحی گردید.

رسوب‌گذاری پروتئین

نمونه صاف گردیده در این مرحله با آمونیوم سولفات نمک‌زنی گردید (شکل ۱). همانطور که در شکل یک دیده می‌شود در مرحله اول با آمونیوم سولفات ۳۰ درصد بسیاری از پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا رسوب نمودند (نوارشماره ۵). در مرحله بعد پس از جداسازی رسوب با سانتریفوژ، میزان نمک تا ۵۰ درصد در محلول اضافه گردید. پروتئین‌های مختلف موجود در محلول آبی در غلظت‌های نمکی متفاوت رسوب می‌کنند و از این پدیده برای جدا کردن آنها استفاده می‌شود (Voet, 1995). از آنجا که متداولترین فرآیند رسوب‌گذاری پروتئین، رسوب‌گذاری با غلظت بالایی از نمک (نمک‌زنی) است در این مطالعه از نمک آمونیوم سولفات بدلایل ارزان و در دسترس بودن از نظر تجاری، حل‌پذیری بالا (حدود ۳/۶ مولار) و قدرت یونی بالای آن (قدرت یونی آمونیوم سولفات ۱ مولار سه برابر قدرت یونی کلرید سدیم ۱ مولار است) و همچنین تغییر کمتر حل پذیری آمونیوم سولفات با حرارت، و بدلیل کمتر بودن تراکم محلول غلیظ آن نسبت به پروتئین حل شده در آن، که باعث رسوب پروتئین توسط سانتریفوژ از محلول غلیظ آن شده و برگشت‌پذیری رسوب‌گذاری آن، استفاده شد (Proteins and Enzymes, 2004) نوار ۸ نمونه نهایی این مرحله برای عبور از ستون انتخاب گردید که میزان لیزوزیم نسبت به پروتئین‌های دیگر آن افزایش یافته است.

کروماتوگرافی تبادل یون

کروماتوگرافی تبادل یون بر اساس میانکنش الکتروستاتیک عمل کرده و تئوری فرآیند جداسازی پروتئین توسط آن به pH ایزوالکتریک پروتئین وابسته است. دلیل استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یون در این مطالعه، خلوص بهتر، استفاده از بافرهای مختلف با دامنه pH و تجزیه نشدن پروتئین و پذیرش آنها برای صنایع دارویی بود و نیز این روش قابلیت جداسازی پروتئین‌های هدف دارای ویژگی‌های غیر مشابه نسبت به پروتئین‌های ناخالص را داشت (Bayramoglu *et al*., 2007). همچنین در این روش از رزین اس‌پی سفارز بدلیل دارابودن بازده بالا برای تخلیص پروتئین، استفاده شد (Sakakibara *et al*., 2007).

جهت بررسی میزان خالص‌سازی پروتئین لیزوزیم ، نمونه بر روی SDS-PAGE برده شد و حرکت نمونه پروتئینی با نشانگرهای استاندارد مقایسه گردید. **Error! Reference source not found.** نتایج ژل SDS-PAGE نمونه خالص شده در ستون تبادل کاتیون با رزین اس‌پی سفارز می‌باشد که نشان می‌دهد نوار ۶ و ۷ دارای بند خالصی (تک بندی در ناحیه ۱۴ کیلو دالتونی) از پروتئین لیزوزیم است. نتایج اسکن ژل‌ها در برنامه نرم افزار Alpha Ease FC که در

جدول ۱ نشان داده شده حاکی از آن است که از مقدار کامل یک سفیده تخم‌مرغ رقیق و فیلتر شده که حاوی ۲۳/۲ درصد لیزوزیم بود در قسمت جمع‌آوری شده از شستشو با گرادیان 4A+6B و گرادیان 3A+7B، پروتئین لیزوزیم با خلوص به ترتیب در این دو فراکشن حدود ۱۰۰ درصد و ۹۶/۸ درصد بدست آمد. نتایج نشان داد که با این روش تخلیص، خلوص پروتئین در حد بالایی (حدود ۹۸ تا ۱۰۰ درصد) می‌باشد که اسکن ژل در برنامه نرم افزار Alpha Ease FC مناسب بودن روش آزمایشگاهی انجام شده برای فرآیند بهینه‌سازی و جداسازی جزء به جزء لیزوزیم از سفیده تخم مرغ را تائید کرد.

1 Cell
2 Cuvette
3 Fractionation

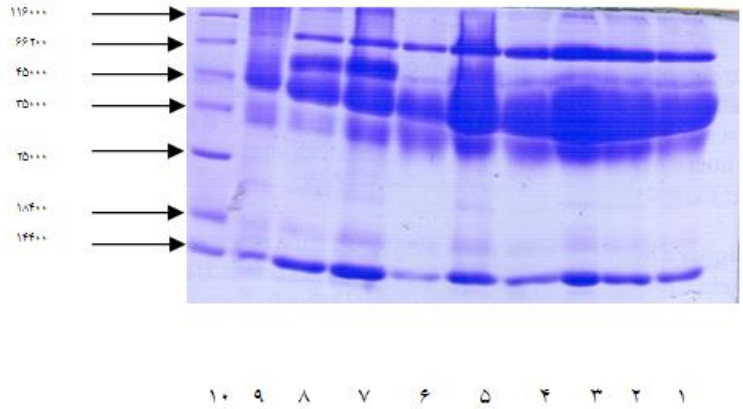
شاخصه‌های ویژه پروتئین لیزوزیم

تعیین غلظت پروتئین لیزوزیم (روش برادفورد): پس از تعیین منحنی استاندارد(شکل ۳)، غلظت پروتئین طبق معادله اتخاذ شده از منحنی استاندارد برادفورد، تعیین شد. نتایج جدول ۲ تائید کرد که غلظت پروتئین لیزوزیم تخلیص شده نسبت به پروتئین لیزوزیم استاندارد حدود ۹۵ درصد می باشد.

معادله تعیین غلظت برابر با فرمول زیر بدست آمد:

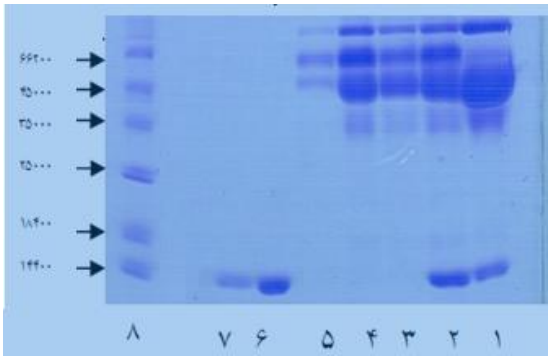
$$y=0.004x-0.021 \quad (۲)$$

$$R^2 = 0.989$$



۱۰ ۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱

شکل ۱- نمونه رسوب‌گذاری شده با آمونیوم سولفات. ۱- سفیده تخم‌مرغ رقیق و فیلتر شده، ۲- محلول رویی سانتریفوژ اولیه، ۳- رسوب سانتریفوژ اولیه، ٤- محلول رویی آمونیوم سولفات ۳۰٪، ٥- رسوب آمونیوم سولفات ۳۰٪، ٦- محلول رویی آمونیوم سولفات ٥۰٪، ۷- رسوب آمونیوم سولفات ٥۰٪، ۸- محلول رویی سانتریفوژ قبل از ستون (نمونه عبوری از ستون)، ۹- رسوب سانتریفوژ قبل از ستون، ۱۰- نشانگر های وزن مولکولی که بند مجاور بند انتهایی حدود ١٤ کیلو دالتون است.

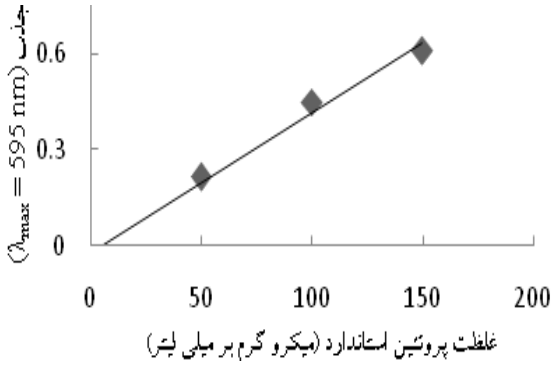


۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱

شکل ۲- SDS-PAGE نمونه خالص شده با رزین اس پی سفارز (SP Sepharose). ۱- سفیده تخم مرغ رقیق وفیلتر شده، ۲- محلول رویی سانتریفوژ قبل از ستون (نمونه عبوری از ستون)، ۳- اولین قسمت (فراکشن) عبوری از ستون (نمونه رد شده از ستون)، ٤- بافر A، ٥- گرادیان 9A+1B، ٦- گرادیان 4A+6B، ۷- گرادیان A+7B۳، ۸- نشانگرهای وزن مولکولی که بند مجاور بند انتهایی حدود ١٤ کیلو دالتون است.

جدول ۱- مقدار درصد لیزوزیم موجود در هر نمونه از مراحل مختلف رسوب‌دهی و کروماتوگرافی تعویض کاتیون

نمونه	درصد لیزوزیم به کل پروتئین‌ها
سفیده تخم مرغ رقیق و فیلتر شده	۲۳/۲
رسوب سولفات آمونیوم ۳۰ درصد	۳۳/۲
رسوب سولفات آمونیوم ۵۰ درصد	۳۸/۸
مایع رویی آخرین سانتریفوژ رسوب گذاری	۴۴/۷
فراکشن گرادیان 4A+6B	۱۰۰
فراکشن گرادیان 3A+7B	۹۶/۸



شکل ۳: منحنی استاندارد برادفورد برای پروتئین لیزوزیم استاندارد

جدول ۲: میانگین تکرارهای غلظت پروتئین لیزوزیم تخلیص شده ی بدست آمده از منحنی استاندارد برادفورد.

پروتئین	غلظت (µg/µl)	میانگین جذب	میانگین تکرارهای غلظت (µg/µl)
تخلیصی	۵۰	۰/۱۶۹±۰/۰۰۶	۴۷/۶۲
	۱۰۰	۰/۳۰۲±۰/۰۰۲	۸۰/۸۷
استاندارد	۵۰	۰/۳۴۲±۰/۰۰۱	۵۰
	۱۰۰	۰/۵۶۷±۰/۰۰۲	۱۰۰

جدول ۳- سنجش فعالیت آنزیمی: میانگین جذب سوسپانسیون باکتری لیز شده در حضور لیزوزیم (تخلیص شده و استاندارد) در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمانهای مختلف.

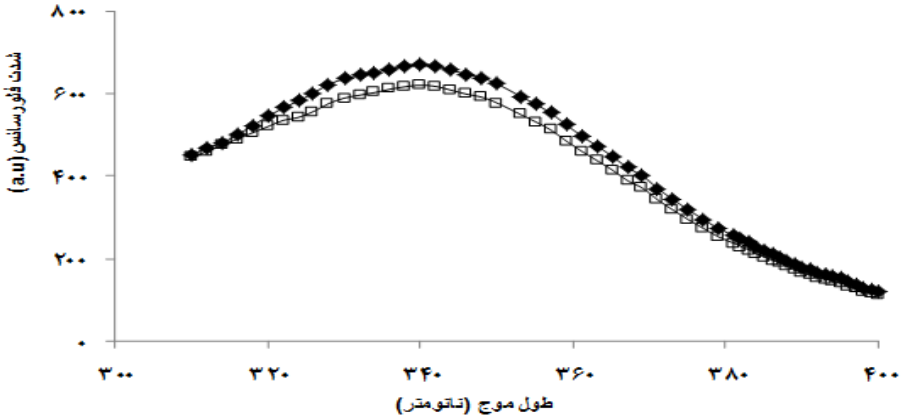
پروتئین	میانگین سه تکرار جذب ۴۵۰ نانومتر						ΔA_{450} / min Unit/mg
	۳۰ ثانیه اول	۳۰ ثانیه دوم	۳۰ ثانیه سوم	۳۰ ثانیه چهارم	۳۰ ثانیه پنجم	۳۰ ثانیه ششم	
لیزوزیم استاندارد	۰/۰۰۳±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۶±۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰۲	۰/۰۱۰±۰/۰۰۱۱	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱۴	۰/۰۰۲۲۶ ۲۶۶
لیزوزیم تخلیصی	۰/۰۰۳±۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۵±۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۹±۰/۰۰۰۲	۰/۰۱۱±۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۳۳۳ ۳۳۳

تعیین فعالیت پروتئین لیزوزیم

نتایج میانگین جذب سوسپانسیون باکتری لیز شده در حضور لیزوزیم در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمان‌های مختلف و تغییرات جذب ۴۵۰ نانومتر بر دقیقه لیزوزیم تخلیص شده و استاندارد ثبت شده د رجدول حاکی از آن بود که فعالیت آنزیم لیزوزیم تخلیص شده طبق فرمول ذکر شده در بخش روش برابر با ۳۳۳ واحد بر میلی گرم پروتئین بود. بنابراین فعالیت هیدرولیزی آنزیم لیزوزیم بر روی سوبسترای باکتریایی آن نیز مناسب بودن روش تخلیص را تقویت کرد.

فلورسانس ذاتی لیزوزیم

تعیین وضعیت تریپتوفان‌ها در پروتئین معمولا یکی از شاخصه‌های مهم در برآورد تاخوردگی صحیح پروتئین ها می‌باشد زیرا تریپتوفان‌ها معمولا بعنوان هیدروفوب‌ترین و درونی‌ترین باقیمانده محسوب می‌شوند. با توجه به اینکه لیزویم دارای ۵ تریپتوفان می‌باشد (PDB:2vb1) که موقعیت خاصی در بخش مرکزی پروتئین دارند تاخوردگی نادرست یا بازشدگی پروتئین می‌تواند در وضعیت نشری فلورسانس این فلور وفور طبیعی پروتئین اثر مشخصی بگذارد. مهمترین تغییر در طیف فلورسانس تریپتوفان زمانی که محیط اطراف آن از محیط غیر آبی به آبی تغییر نماید با انتقال حداکثر نشر به سمت طول‌موج‌های بلندتر خواهد بود. این شاخصه بسیار مهمتر از تغییرات شدت می‌باشد زیرا تغییر بسیار اندک درغلظت پروتئینی می‌تواند شدت فلورسانس را به شدت تغییر دهد (با حضور ۵ باقیمانده تریپتوفان). با بررسی طیف نشر ذاتی پروتئین لیزوزیم استاندارد و تخلیص شده (شکل ۴)، مشخص گردید که نشر ذاتی این دو پروتئین تفاوت بارزی (شیفت حدکثر نشر به طول موج بلندتر) نداشتند بنابراین به نظر می‌رسد پروتئین تخلیصی دارای ساختار مناسب و قرارگیری باقیمانده‌های تریپتوفان همانند لیزوزیم استاندارد بوده است.

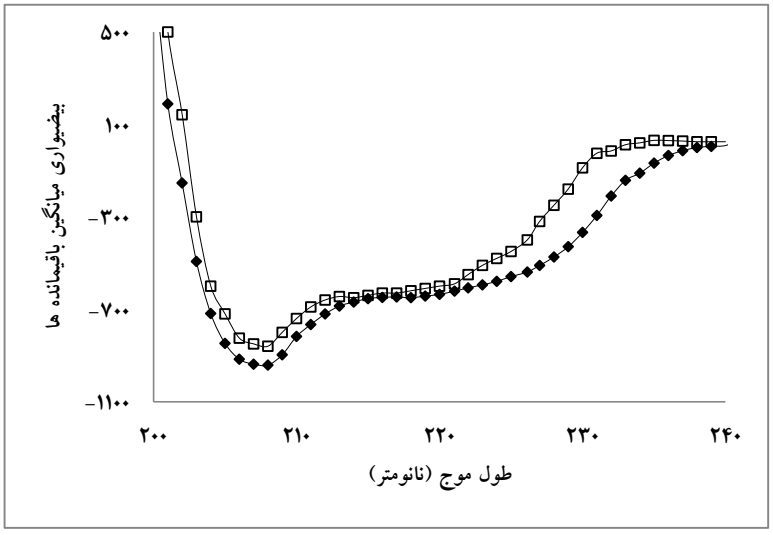


شکل ٤- طیف نشری فلورسانس ذاتی لیزوزیم: طیف نشری فلورسانس ذاتی لیزوزیم استاندارد (♦) و لیزوزیم تخلیص شده (□)، به غلظت ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر تریس یک مولار با pH برابر با ۷/۲ و در دمای محیط، در طول موج بر انگیختگی ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشر ۳۱۰ تا ۳۹۰ نانومتر. نشر حداکثری در هر دونمونه در طول موج۳٤۲ نانومتر

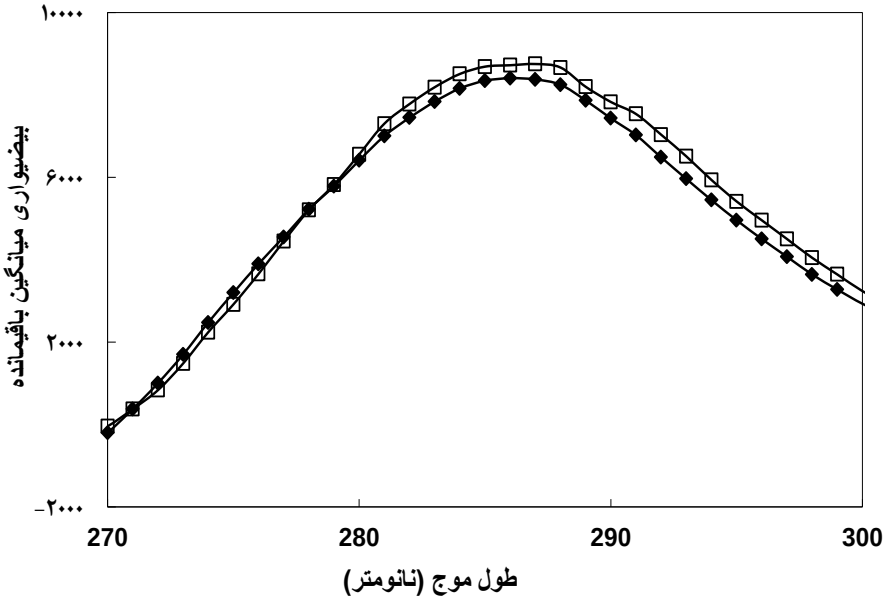
طیف دورنگ‌نمایی دورانی دور و نزدیک لیزوزیم

برای مشخص شدن وضعیت ساختارهای دوم در لیزوزیم استخراج شده و مقایسه آن با نمونه استاندارد از طیف دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور ماوراءبنفش استفاده گردید (شکل ۵). معمولا از طیف دورنگ نمایی دورانی ناحیه دور ماوراءبنفش جهت بررسی کیفی و کمی ساختار های دوم پروتئین استفاده میگردد.پروتئین لیزوزیم تخلیص شده در شکل نشان داد که دارای پیک منفی در ناحیه ۲۰۸ نانومتر و پیکی کوچکتر در ناحیه ۲۲۰ نانومتر بود که نشانه غالب **بودن ساختارهای هلیکسی در این پروتئین بود. با استفاده از برنامه CDNN، برآوردی از میزان ساختارهای دومی در پروتئین لیزوزیم استاندارد بعنوان کنترل و لیزوزیم تخلیص شده بدست آمد. درصد این ساختارها در**

جدول ۴ ذکر شده، که تفاوت اندکی در مقدار ساختارهای مارپیچ آلفاو بتا و پیچه نامنظم در این دو پروتئین شاهد بودیم و کاهش مقدار مارپیچ با افزایش ساختار پیچه نامنظم و پیچه بتا جبران شده بود.



شکل ۵- طیف دو رنگ نمایی دورانی دور لیزوزیم: طیف دو رنگ‌نمایی دورانی دور لیزوزیم تخلیص شده(□) و لیزوزیم استاندارد (♦)، واحد بیضیواری $degree.cm^2.dmol^{-1}$ است.



شکل٦- طیف جذبی دورنگ نمایی نزدیک لیزوزیم مربوط به نمونه تخلیص شده (□) و استاندارد(♦) واحد بیضی‌واری $degree.cm^2.dmol^{-1}$

جدول ٤- میزان درصد ساختارهای دوم پروتئین لیزوزیم تخلیص شده و لیزوزیم استاندارد بعنوان کنترل

تخلیص شده	کنترل	درصد ساختار دوم
٪۱۱/۲	٪۱۱/۹	مارپیچ
٪۱۴/۹	٪۱۵/۷	ناموازی
٪۱۴/۱	٪۱۴/۸	موازی
٪۱۸/۵	٪۱۷/۲	پیچ بتا
٪۴۱/۲۵	٪۳۹/۳	پیچه نامنظم
٪۱۰۰	٪۱۰۰	مجموع

نتایج مطالعه طیف دورنگ نمایی نزدیک نتایجی مشابه مطالعات فلورسانس ذابی نشان داد(شکل ۶) . این طیف نیز اطلاعاتی در مورد طبیعی بودن تاخوردگی پروتئین در مقایسه با پروتئین استاندارد نشان می‌دهد که وضعیت پیک مشابه استاندارد می‌باشد. از آنجا که توسعه روشی موثر، ساده و ارزان برای تخلیص لیزوزیم مورد نیاز است تاکنون تحقیقات گسترده ای بر روی روش‌های جداسازی و تخلیص لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ و بهینه‌سازی روش تخلیص آن انجام گرفته است بطوری که Greek (۱۹۷۰) و Sigma (۲۰۰۲) با روش کریستاله کردن، اقدام به جداسازی لیزوزیم کردند، این روش همانند روش رسوب‌دهی با نمک و سانتریفوژ کردن دارای نقایص انتخاب ضعیف، تکرار مراحل و رقیق سازی سفیده تخم‌مرغ بود که باعث افزایش هزینه، زمان و محدود شدن روش به کارهای آزمایشگاهی شد. Fernandez-Souza و Rodriguez (۱۹۷۰)، لیزوزیم را با روش کروماتوگرافی صافی ژلی جدا کردند که با وجود تفکیک مناسب لیزوزیم، مقادیر زیادی از ماده خام اولیه بدلیل محتوای کم لیزوزیم در سفیده، مورد نیاز بود بنابراین روش اقتصادی نبود (Islam *et al*., 2006 and Mayani *et al*., 2010). همچنین Weaver (۱۹۷۷) و Muzzarelli (۱۹۷۸) با همکارانشان از روش کروماتوگرافی تمایلی برای تهیه لیزوزیم بکار بردند، اما علیرغم انتخاب بالا، جداسازی موثر پروتئین، عدم تغییر ماهیت پروتئین و پایداری لیگاند، روش برای صنعتی شدن بدلیل سمیت، ظرفیت جذب پایین و هزینه بر بودن مناسب نبود (Cegielska-Radziejewska *et al*., 2008).

از روش تخلیص جزئی[1] توسط Chang و همکارانش (۲۰۰۰) استفاده شد آنها رسوب‌دهی پروتئین‌های غیر لیزوزیمی را در حضور احیا کننده‌ها، توسط حرارت القا کردند و موفق به استحصال لیزوزیم با بازده ۷۸ درصد شدند سپس Jiang Wang و همکارانش (۲۰۰۱)، اتانل را برای رسوب‌دهی پروتئین‌های غیر لیزوزیمی بکار بردند و لیزوزیمی با بازده ۵۹ درصد حاصل شد همچنین Shin و همکارانش (۲۰۰۳)، با سورفکتانت آنیونی موفق به رسوبدهی انتخابی لیزوزیم با بازده بیشتر از ۹۳ درصد شدند که با وجود قدرت مکانیکی بالا،

1 Partial Purification

پایداری زیاد در برابر دما، اکسیدشدن و تجزیه هیدرولیکی برای تولید در مقیاس زیاد مناسب نبود (Mecitoflu *et al*., 2006 and Gemili *et a*l., 2007). محققین دیگر، Ratajczac و همکارانش (۲۰۰۴) و Su و Chiang (۲۰۰۶)، استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول و نمک در سیستم‌های دوفازی مایع را روشی مناسب برای تخلیص لیزوزیم عنوان کردند با این روش لیزوزیم به طور جزئی تخلیص شد و لیزوزیمی با ۲۰ برابر تخلیص و فعالیت ویژه ۴۳۰۰-۳۸۰۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بدست آمد که در این روش لیزوزیم باید مجددا از فاز پلی‌اتیلن‌گلیکول جدا می‌شد و چون اجرای مراحل اضافی هزینه بر بود بنابراین این روش فقط برای پروتئین‌های دارویی اقتصادی بود و برای آنزیم‌های صنعتی و لیزوزیم که پروتئینی ارزان بود مقرون به صرفه نبود (Su *et al*., 2006) در اینصورت Dembczynski و همکارانش (۲۰۱۰)، روش سیستم‌های دوفازی مایع با بکارگیری پلیمرهای جداکننده حرارتی، (کوپلیمراتیلن‌اکسید/پروپیلن‌اکسید)، و فسفات را پیشنهاد کردند و لیزوزیمی با بازده ۷۰ درصد و فعالیت ویژه ۳۹۵۰۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بدست آمد اگر چه میزان تفکیک کمتر از روش کروماتوگرافی و میزان خلوص آن در حد روش تمایلی بود و نیاز به اجرای چند مرحله فیلتر شدن داشت ولی محتوای بالای آب، باعث سازگاری زیستی و عدم تجزیه مولکول‌های زیستی بود همچنین خلوص و ظرفیت جذب بالا، سریع و نسبتا ساده بودن روش، بازیافت بعضی از مواد مصرفی، کاهش مصرف انرژی و مواد شیمیایی و در دسترس بودن مواد، باعث ارزان و قابل صنعتی شدن روش بود (Dembczynski *et al*., 2010a,b). محققین Mayani ، Ghosh و همکارانشان (۲۰۱۰) در مقاله‌ای عنوان کردند که طی روش فیلتر شدن در حد بالای چند مرحله‌ای می‌توان موفق به تخلیص لیزوزیم با خلوص بالا شد. آنها با یک مرحله فیلتر شدن، بیشتر از ۸۰ درصد لیزوزیم را از صافی عبور داده و به خلوص بیشتر از ۹۴ درصد دست یافتند، با سه مرحله فیلتر شدن، خلوص ۹۶ درصد و بازده ۷۵ درصد و با فیلتر شدن چهار مرحله‌ای، لیزوزیمی با درجه خلوص ۹۷ درصد، بازده ۷۱ درصد و فعالیت ویژه ۶۴۰۰۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین تهیه نمودند. این روش بدلیل خلوص زیاد، خروجی بالای محصول، بازیافت بافرها، اقتصادی بودن و تولید در مقیاس انبوه مزیت داشت اما از آن بدلیل عدم درک کامل مکانیسم روش، نمی توان در صنعت زیست فن آوری استفاده نمود (Mayani *et al*., 2010). بنابراین با توجه به نقایص و محدودیت‌های روش‌های ذکر شده روش‌های متنوعی برای جداسازی لیزوزیم مبتنی بر رسوب‌دهی با استفاده از نمک‌ها و کروماتوگرافی تعویض یون بکار گرفته شده است که از روش کروماتوگرافی تعویض یون، بدلیل مزیت‌های انتخاب، تفکیک و ظرفیت بالا، اجرای سریع و ساده، تنوع رزین، استفاده مکرر از رزین، عدم تغییر ماهیت پروتئین، سازگاری زیستی، تولید در مقیاس زیاد و ارزان بودن در ۷۰-۶۰ درصد فرایندهای تخلیص پروتئین استفاده شده است (Dziennik *et al*., 2005 and El-Sayed, 2010). از این جهت Roy و همکارانش (۲۰۰۳)، روش کروماتوگرافی تعویض کاتیون پشت سرهم، با استفاده از مهره‌های سلولزی متصل به رنگ را برای تخلیص لیزوزیم از سفیده تخم‌مرغ بکار بردند و موفق به تخلیص لیزوزیم با بازده ۷۷ درصد شدند (Islam *et al*., 2006) همچنین Safarik و همکارانش (۲۰۰۷)، با معرفی روش کروماتوگرافی تعویض کاتیون مغناطیسی، با بکار بردن مهره های مغناطیسی، طی روشی ساده و یک مرحله‌ای به لیزوزیمی با خلوص بیشتر از ۹۶٪ و فعالیت ویژه‌ای مشابه لیزوزیم تجاری دست یافتند. اما علیرغم عدم رقیق‌سازی سفیده و قابل استفاده بودن سفیده فاقد لیزوزیم در مصارف روتین آن، محدودیت روش کاربرد آزمایشگاهی آن بود (Safarik *et al*., 2007). Bayramoglu و همکارانش روش کروماتوگرافی تعویض یون، با استفاده از مهره‌های سلولزی پیوند شده با پلیمر را بکار بردند و لیزوزیمی با درجه خلوص ۹۴ درصد و بازده ۸۷ درصد بدست آوردند (Bayramoglu *et al*., 2007).

در این مطالعه بنابر مطالعات ساختاری با استفاده از دورنگ نمایی دورانی (CD) و فلورسانس ذاتی که موید طبیعی بودن کنفورماسیون در سطح ساختار دوم و سوم پروتئین بود و نیز حفظ ویژگی فعالیت آنزیم تخلیص شده توسعه روشی آسان و ساده برای تخلیص لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ با آمونیوم سولفات و ستون کروماتوگرافی تبادل یون محقق شد. در مقایسه با روش‌های موجود، با ترکیب روش رسوب‌گذاری و کروماتوگرافی تبادل کاتیون، یک روش آزمایشگاهی ساده و سریع با کیفیت بالا برای فرایند بهینه سازی و جداسازی جزء به جزء لیزوزیم توسعه داده شد.

نتیجه‌گیری

سیستم تخلیص پروتئین مذکور که بر پایه رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی تعویض کاتیون با رزین اس‌پی سفارز و روش مشروح انجام شد، خلوص بالای ۹۸ درصد را نشان داد که برای پروتئین لیزوزیم با وزن پایین بسیار چشمگیر و ایده آل است همچنین ویژگی فعالیت این پروتئین (۳۳۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) نیز حفظ شده که با توجه به کاربرد لیزوزیم در صنایع غذایی و دارویی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. روش تخلیص انجام شده به‌دلیل ارزان و در دسترس بودن آمونیوم سولفات و استفاده محدود از دیگر مواد شیمیایی، باعث کم هزینه ساختن این روش جداسازی شد و همچنین ظرفیت و خلوص بالای پروتئین لیزوزیم بدست آمده از عصاره سفیده تخم مرغ، مزیت و تاییدی بر مناسب بودن این روش جداسازی و تخلیص می باشد. همچنین کم بودن مراحل روش، سریع بودن آن، تکرارپذیری و قابلیت انجام در مقیاس کم و زیاد از نکات مثبت این روش محسوب می شود.

منابع

Bayramoglu, G., and Besirli, N., (2007) "Preparation of ion-exchange beads based on poly(methacrylic acid) brush grafted chitosan beads: Isolation of lysozyme from egg white in batch system." Colloids and Surfaces A: Physicochem. *Eng. Aspects* 310, 68–77.

Cegielska-Radziejewska, R., Leśnierowski, G., and Kijowski, J. (2008) "Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations." polish journal of food and nutrition sciences 58, No. 1, 5-10.

Dembczynski, R., Bialas, W., and Jankowski, T. (2010) "Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide-propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate", *Process Biochemistry* 45, 369-374.

Dembczynski, R., Bialas, W., and Jankowski , T. (2010) "Recycling of phase components during lysozyme extraction from hen egg white in the EO50PO50/K2HPO4 aqueous two-phase system" *Biochemical Engineering Journal* 51 24–31.

Dziennik, S.R., Belcher, E.B., and Barker, G.A. (2005) "Effects of Ionic Strength on Lysozyme Uptake Rates in Cation Exchangers. I: Uptake in SP Sepharose FF." *Biotechnology and Bioengineering*, VOL. 91, NO. 2.

El-Sayed, M. (2010) "Selective cation-exchange adsorption of the two major whey proteins", PHD Thesis, Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Cambridge

Gemili, S., Umdu, E. S., and Yaprak, N. (2007) "Partial purification of hen egg white lysozyme by ethanol precipitation method and determination of the thermal stability of its lyophilized form", *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry* 31, 125-134.

Islam, R., Kite, J., Baker, A. S., and Ching A. (2006) "Affinity purification of hen egg lysozyme using sephadex G75", *African Journal of Biotechnology* 5 (20),1902-190.

Jin, M., Davidson, P. M., Zivanovic, S., and Zhong, Q. (2009) "Production of corn zein microparticles with loaded lysozyme directly extracted from hen egg white using spray drying: Extraction studies" *Food Chemistry* 115, 509–514.

Masuda, T., Ide N., and Kitabatake, N. (2005) "Effects of chemical modification of lysine residues on the sweetness of lysozyme." *Chem. Senses* 30, 253–264.

Mayani, M., and Ghosh, R. (2010) "Cascade ultrafiltration systems-Integrated processes for purification and concentration of lysozyme", *Journal of Membrane Science* 347, 150-15.

Mecitoflu, C., Yemenicioflu, A., and Arslanoflu, A. (2006) "Incorporation of partially purifed hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging." *Food Research International* 39, 12–21.

Morshedi, D., Mohammadi, Z., and Boojar, M. (2013) "Using protein nanofibrils to remove azo dyes from aqueous solution by the coagulation process." *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*,

Nawi W. N. (2006) "Preliminary study on parameters of lysozyme purification using ion exchange chromatography." MSc Thesis, Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering, University College of Engineering & Technology Malaysia

Proteins and Enzymes (2004) "Protein purification: precipitation" 115,412-508.

Safarik, I., Sabatkova, Z., and Tokar, O. (2007) "Magnetic cation exchange isolation of lysozyme from native hen egg white", *Food Technology and Biotechnology* 45, 355-359.

Sakakibara,Y., and Yanagisawa, H., (2007) "Techniques for the separation of proteins by isoelectric point column chromatography." The Bulletin of Aichi auniv. Of Education, 56 (Natural science), 45–49.

Shugar, D. (1952) "Enzymatic assay of lysozyme" Biochimica et Biophysica Acta 8, 302-309.

Sigma-Aldrich (2011) "Worthington Enzyme Manual Lysozyme assay" Worthington Biochemical Corporation,

Su, C. K., and Chiang, B. H. (2006) "Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system", *Process Biochemistry* 41, 257–263.

Swaminathan, R., Ravi, V. K., and Kumar, S. (2011) "Lysozyme: a model protein for amyloid research", *Advances in protein chemistry and structural biology* 84, 63-111.

Voet D., and Voet JC. (1995) "Fundamental of biochemistry." John wiley and sons 2nd ed. 71-103.

You, S. J., Udenigwe, C. C., and Aluko, R. E. (2010) "Multifunctional peptides from egg white lysozyme", *Food Research International* 43, 845-852.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 5, Dec - Jan 2015, p. 560-571

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۴، ص. ۵۷۱-۵۶۰

Using ion exchange chromatography in order to purify hen egg white lysozyme with high efficiency

Z. Mohammadi[1], D. Morshedi[2*], M. Mashhadi Akbar Boojar[3], F. Aliakbari[4].

Received: 2013.11.24
Accepted: 2014.06.29

Introduction: Hen egg white lysozyme (HEWL) is one of the proteins that has become increasingly important in many industrial aspects, including food and drug industries as well as high-technologies such as nanotechnology due to its specific properties. Its high thermal stability makes it a good natural food additive and sweetener. It has the antimicrobial activity against a wide variety of microorganisms such as *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus spp*, *Clostridium botulinum*,*Listeria monocytogenes* as well as fungi. This activity remains inover a broad pH and ionic strength ranges. Thanks to its numerous advantages, it has been commonly used as an alternative to chemical antimicrobial agents in food industry such as sausage and dairy industries. HEWL has also high tendency to convert to protaneous well-ordered nanofibrils that is employed in nanotechnology. Furthermore, based on its well-known biochemical and biophysical features, HEWL is widely used as a model protein in the studies associated to the structure and function of proteins. Given theimportance increasing of lysozyme, development of an effective and simple as well as inexpensive method to purify this protein is required.

Material and methods: All salts and organic solvents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).Fresh eggs were purchased from a local market. After separating the white part from the yolk of eggs, it was diluted and filtered through linen. The filtered solution was then precipitated with 30 and 50% ammonium sulfate. The pellet of 50% ammonium sulfate dissolved in tris buffer (pH:7 with 2.5 M of urea) and was dialyzed for 15 hours.Thereafter, the sample was loaded on the cation exchange chromatography on a column of SP Sepharose Fast Flow. The washing buffers include buffer A (tris 30mM, pH:7 with urea 2M) and buffer B (tris 30 mM pH:7,ammonium sulfate 0.7 M and urea 2M) which were gradiently exchanged. The structural characters of the purified protein were analyzed by Far-UV CD (AVIV 215 spectropolarimeter, USA) and intrinsic fluorescence (usingVarian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, Mulgrave, Australia) methods. To estimate the percentage of secondary structure in proteins the CD data was deconvoluted by CDNN software. In the next step, the enzymatic activity of the purified protein was tested based on Shugar's method with some modifications and by using different strain.In this regard, the turbidity of cultured *Micrococcus lysodeikticus* was measured at 450 nm by T80+ Double Beam UV/Vis spectrophotometer (Leicestershire, England) after threating the cultures with purified protein and the enzymatic activity compared with the activity of an equal concentration of standard HEWL obtained from Sigma-Aldrich (USA).Bradford assay was carried out to determine the concentration of proteins

Results& Discussion: The subject of this study was to develop an effective, simple and inexpensive method topurify HEWL which has been able to scale up practically. In the first step, the filtered diluted white part of egg was precipitated withdifferent concentrations of ammonium sulfate. SDS-PAGE analysis indicated that the final pellet achievedby precipitation with 50% of ammonium sulfate had less impurity of the high molecular weight proteins. Salting out is an inexpensive and non-invasive purification method which can be used easily. Different proteins based on their specific chemical and physical properties precipitate at different concentrations of the salt. Ammonium sulfate is a common salt widelyusing for this purpose because of its inexpensive cost and high strength for salting out of different proteins. After ammonium sulfate precipitation step, the pellet was dissolved and consequently dialyzed in the presence of 2.5 M urea for 15 hours. After centrifugation, the sample solution was loaded on a cation exchange column chromatography. PI of HEWL is 11.35and the employ of a kind of cation exchange resin is appropriateto use for chromatography.After that, the column was washed with different

1- M. Sc. Of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
3- Associated Professor, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
4- PhD. Student of Drug Biotechnology, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: morshedi@nigeb.ac.ir)

proportions of buffers A and B. Each washed fraction of chromatography was collected and then analyzed with SDS-PAGE. The high purified protein (with more than 98% purity) was obtained in the fraction after washing with a solution of 4A+6B. Special activity of the final product was calculated which was considerably comparable to the activity of the standard enzyme. Furthermore, structural studies by circular dichroism (CD) spectroscopy indicated that the spectrum of the purified protein was very comparable with the standard HEWL. Deconvolution of CD data by CDNN software also showed that there were mostly same secondary structures in both proteins.Assessment of the intrinsic fluorescence intensity is also a valuable method to consider about integrity of tertiary structure of proteins based on exposing rate of hydrophobic residues especially tryptophan. The data extracted from CD and fluorescence spectroscopies confirmed that the purified HEWL had similar secondary and tertiary structure with the standard protein.

Conclusion: This study has developed an experimental method to purify HEWL which is simple, fast, and low cost with high efficiency.

Keywords: Analysis of the protein structure, Hen egg white lysozyme, Ion exchange chromatography, Protein purification.