

GRZEGORZ LEŚNIEWSKI

Katedra Zarządzania Jakością Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

NOWE SPOSOBY FIZYKOCHEMICZNEJ MODYFIKACJI LIZOZYMU

Streszczenie. Celem pracy było przedstawienie własnych metod modyfikacji lizozymu powodujących jego oligomeryzację oraz metod oceny wybranych właściwości fizykochemicznych i antybakteryjnych zmodyfikowanego lizozymu. Materiałem badawczym był lizozym własnej produkcji, który poddano modyfikacji metodami: termiczną, termiczno-chemiczną, chemiczną i membranową. W zmodyfikowanych preparatach lizozymu badano stopień oligomeryzacji enzymu oraz jego aktywność hydrolityczną. Wykazano, że każde z prezentowanych rozwiązań modyfikacji lizozymu może być stosowane do jego oligomeryzacji. Metodą termiczną oraz termiczno-chemiczną uzyskano preparaty zawierające w swym składzie około 57% oligomerów, w tym 34-43% dimeru. Preparaty modyfikowane chemicznie zawierały 60-80% oligomerów, w tym ponad 40% dimeru. Dobry, 50-procentowy efekt oligomeryzacji enzymu uzyskano także w wyniku modyfikacji membranowych.

Słowa kluczowe: lizozym, termiczna, termiczno-chemiczna, chemiczna, membranowa modyfikacja lizozymu, aktywność antybakteryjna

Wstęp

Lizozym (N-acetylo-muramylhydrolaza E.C.3.2.1.17) to niskocząsteczkowy enzym (14 400 Da) posiadający zdolności hydrolizy specyficznych polisacharydów wchodzących w skład ściany komórkowej bakterii. Stanowi on pierwotny, naturalny mechanizm obronny właściwy ludziom, zwierzętom i roślinom, a jako składnik białka jaja ptaków stanowi naturalną barierę ochronną treści jaja przed drobnoustrojami. Działanie ochronne lizozymu polega na niszczeniu bakterii poprzez rozerwanie wiązań $\beta(1-4)$ między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozoaminą kopolimeru polisacharydu występującego w ścianie komórkowej wielu bakterii. Te naturalne właściwości enzymu dotyczą jego monomeru, który jest podstawową formą występowania lizozymu w przyrodzie i coraz szerzej jest wykorzystywany w przemyśle żywnościowym, medycynie

i weterynarii. Wielokrotnie wykazano, że lizozym, jako składnik białka jaj, w zależności od warunków ich przechowywania może wykazywać tendencje do asocjacji, tracąc przy tym jednak część swej aktywności hydrolitycznej (JOLLES i JOLLES 1984). Podobne zjawisko obserwowano także, modyfikując wyizolowany z białka jaja enzym (SOPHIANOPOULOS 1969, IBRAHIM i IN. 1996 a). Wykazano, że utworzony dimer, pomimo utraty części aktywności hydrolitycznej, nadal zachowywał antybakteryjną aktywność monomeru, a nawet ją przewyższał. Dalsze badania wykazały, że w wyniku dimeryzacji pojawiła się nowa, „specyficzna” aktywność, która rekompensowała utratę aktywności hydrolitycznej. Cechą charakterystyczną tej nowej aktywności jest rozszerzenie antybakteryjnego działania enzymu na bakterie Gram-ujemne, w tym liczne chorobotwórcze bakterie patogenne (TOMIZAWA i IN. 1994, IBRAHIM i IN. 1996 b, KIJOWSKI i IN. 2000, LEŚNIEWSKI i KIJOWSKI 2007, LEŚNIEWSKI 2007). Nowa forma zmodyfikowanego lizozymu czyni go atrakcyjnym środkiem antybakteryjnym mającym rozległe możliwości praktycznego wykorzystania. Jednak dotąd nie opracowano ani standardowych metod modyfikacji enzymu, ani sposobu bezpośredniego pomiaru nowo utworzonej specyficznej jego aktywności, choć są one przedmiotem wielu opracowań także monograficznych (IBRAHIM 1998, NOHARA i IN. 1999). Z analizy dostępnej literatury wynika, że większość badań nad metodami modyfikowania lizozymu jak na razie nie wykracza poza skalę laboratoryjną i koncentruje się głównie na próbie wyjaśnienia mechanizmów rządzących procesami jego modyfikacji oraz będących ich konsekwencją zmianami strukturalnymi białka (IBRAHIM 1998, 2003, NOHARA i IN. 1999).

Jako jedne z nielicznych badania nad modyfikacją lizozymu są prowadzone w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Zakres realizowanych tu prac dotyczy modyfikacji enzymu oraz antybakteryjnej aktywności otrzymanych preparatów i ich praktycznego wykorzystania. Celem niniejszego opracowania była prezentacja wyników badań obejmujących aspekty wybranych fizykochemicznych metod modyfikacji enzymu.

Material i metody

Material badawczy stanowił lizozym własnej produkcji, separowany z białka świeżych jaj kur niosek astra S, pochodzących z fermy hodowlanej w Zakrzewie k. Poznania (Oddział Badawczy Drobiarstwa Instytutu Zootechniki w Krakowie). Jako wzorcowy dimer lizozymu stosowano preparat (lek weterynaryjny) o nazwie Lydium KLP szwajcarsko-polskiej korporacji firm farmaceutycznych Nika Health Products i Finepharm.

Modyfikacje termiczne prowadzono, ogrzewając wodne roztwory lizozymu o stężeniu od 0,5 do 20 mg/ml (0,05-2,0%) w reaktorze analitycznym Synacore Analyst firmy Büchi. Czas modyfikacji wynosił od 10 do 60 min, temperatura – 50-90°C, a pH środowiska zmieniano w zakresie od 4,0 do 8,0.

Termiczno-chemiczną modyfikację lizozymu prowadzono dwustopniowo. Pierwszy stopień obejmował modyfikację termiczną (według procedury przedstawionej powyżej), a drugi – utlenianie termicznie zmodyfikowanego enzymu.

Modyfikacja chemiczna w niskich temperaturach polegała na działaniu silnego utleniacza na monomer lizozymu w określonych warunkach pH, temperatury i czasu. Do wodnych roztworów enzymu o stężeniu 2% dodano taką ilość wodorotlenku sodu

lub kwasu solnego (roztwory 1,5 M), aby ich pH wynosiło odpowiednio 10,0 i 4,0. Następnie do prób dodano utleniacz i pozostawiono je w temperaturze -25 , -15 , -10 , 0 , 5 , 10 , 20 , 30 i 40°C przez 24, 72 i 144 h (1, 3 i 6 dób).

Modyfikacji membranowej poddawano lizozym bezpośrednio po jego wyizolowaniu z białka jaja kurzego metodą ultrafiltracji. Modyfikacja polegała na prowadzeniu diafiltracji roztworu lizozymu w płytowym module ultrafiltracyjnym DDS 20-0,36 LAB w określonych warunkach ciśnienia (15, 20 i 30 bar), temperatury (20, 35 i 50°C), pH (7,0, 8,0, 9,0, 10,0) i czasu (1, 2 i 5 h). Ścisłe określoną temperaturę procesu utrzymywano za pomocą termostatu LW 102 firmy Auritronic.

Ogólna charakterystyka fizykochemiczna badanych preparatów lizozymu obejmowała ustalenie zawartości białka (metodą Kjeldahla według PN-75/A-04018 1975) oraz zawartości wody (metodą suszarkową według PN-73/A-82110 1973).

Analiza antybakteryjnych właściwości badanych preparatów obejmowała oznaczenia:

- aktywności hydrolitycznej badanej metodą spektrofotometryczną (TRZISZKA i CLOSTERMANN 1993, LEŚNIEROWSKI 2007),
- testu antybakteryjnego przeciwko bakteriom Gram-ujemnym opartego na pomiarze spektrofotometrycznym (LEŚNIEROWSKI 2007).

Analizę elektroforetyczną preparatów prowadzono z użyciem aparatu SE-600 firmy Hoefer Scientific Instruments metodą z SDS-PAGE (LEŚNIEROWSKI 2007).

Analiza statystyczna wyników obejmowała podstawowe opisowe obliczenia statystyczne dla każdej zmiennej, jak wartość średnia, minimum i maksimum, odchylenie standardowe, błąd standardowy i przedział ufności. W celu określenia istotności wyników w grupach przeprowadzono weryfikację statystyczną testem Duncana i NIR. Zależnie od potrzeby stosowano jedno- (ANOVA) i wieloczynnikową (MANOVA) analizę wariancji lub metody korelacji i regresji. Za statystycznie istotne uznano zależności na poziomie istotności nie przekraczającym wartości $p = 0,05$. Podstawowym narzędziem stosowanym do obliczeń statystycznych było oprogramowanie Statistica PL v. 7.0.

Wyniki i dyskusja

W ramach przeprowadzonych badań monomer lizozymu poddano modyfikacjom obejmującym trzy grupy oddziaływań fizykochemicznych. Pierwsza grupa metod dotyczyła procesów termicznych i chemicznych w zakresie temperatur bliskich obszarowi denaturacji lizozymu (metoda termiczna i termiczno-chemiczna). Druga grupa metod to niskotemperaturowa denaturacja enzymu z udziałem substancji utleniających (chemiczna modyfikacja lizozymu w niskich temperaturach). W jej ramach zbadano również efekt modyfikacji w temperaturze zamrażalniczej (do -25°C). W trzeciej grupie metod, obejmujących modyfikację membranową, wykorzystano zjawiska fizykochemiczne zachodzące podczas procesów filtracyjnych (ultrafiltracja, diafiltracja). Wszystkie przedstawione w pracy procedury modyfikacji enzymu to oryginalne, własne metody opracowane w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Podstawowym surowcem doświadczalnym był monomer lizozymu własnej produkcji o aktywności hydrolitycznej równej 18 600 U/mg, zawartości białka ogólnego 99,4% i 100-procentowej rozpuszczalności w środowisku wodnym.

Wcześniejsze badania dotyczące mechanizmu termicznej denaturacji lizozymu wykazały, że rozfałdowanie białka powodowało m.in. niszczenie wiązań dwusiarczkowych, pojawienie się wolnych grup sulfhydrołowych oraz wyeksponowanie na powierzchnię cząsteczki reszt tryptofanowych, co prowadziło do zwiększenia powierzchniowej hydrofobowości enzymu, jego oligomeryzacji oraz w konsekwencji do pojawienia się nowej aktywności antibakteryjnej (odmiennej od hydrolitycznej) skierowanej głównie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym (IBRAHIM i IN. 1991, TOMIZAWA i IN. 1994, YOUNG i IN. 1994). Próby wykorzystania termicznej denaturacji lizozymu do pozyskania tej nowej jego aktywności (nazwanej roboczo „specyficzną”) przeprowadzone przez IBRAHIMA i IN. (1996 a, b) dobry efekt przyniosły jednak tylko dla niewielkich objętościowo prób (1 ml roztworu) o maksymalnym stężeniu lizozymu wynoszącym 0,05%. W prezentowanej pracy w celu uzyskania lizozymu w postaci spolimeryzowanej metodą termiczną modyfikację enzymu prowadzono na zdecydowanie większych objętościowo próbach (do 250 ml) w ściśle określonych warunkach stężenia enzymu, kwasowości środowiska, temperatury i czasu trwania modyfikacji. Wyniki wpływu tych czynników na stopień dimeryzacji enzymu, jego rozpuszczalność oraz aktywność hydrolityczną przedstawiono w tabeli 1. Badania potwierdziły, że stężenie enzymu bardzo istotnie wpływało na ilość utworzonego dimeru, ale ważny był także wpływ pH roztworu oraz temperatura i czas trwania procesu. Z rozdziałów elektroforetycznych na żelu SDS–PAGE (rys. 1) uzyskano obraz zmian zachodzących w lizozymie

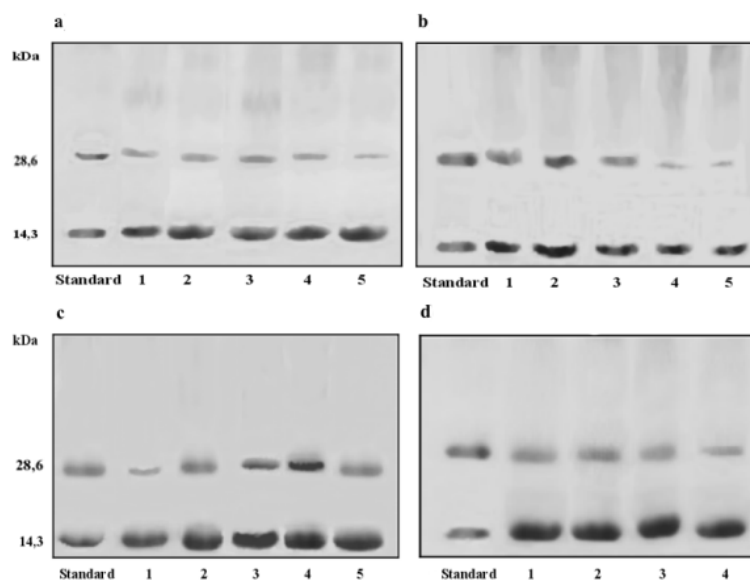
Tabela 1. Charakterystyka preparatów lizozymu zmodyfikowanych termicznie w określonych warunkach stężenia enzymu, kwasowości środowiska, temperatury i czasu trwania modyfikacji
Table 1. Characteristics of preparations of thermally modified lysozyme at specific enzyme concentration, acidity of the medium, temperature and modification time

Lp.	Stężenie lizozymu (%)	Udział monomeru (%)	Udział dimeru (%)	Aktywność hydrolityczna (U/mg)
1	2	3	4	5
Stężenie enzymu				
1	0,05	66,5 ^a	33,4 ^e	6 610 ^a
2	0,10	67,8 ^b	32,0 ^d	7 005 ^b
3	0,50	70,1 ^c	29,8 ^c	7 120 ^b
4	1,00	75,3 ^d	24,6 ^b	9 520 ^c
5	2,00	77,2 ^e	22,3 ^a	10 630 ^d
Kwasowość środowiska				
1	4,0	68,5 ^b	31,3 ^a	8 150 ^c
2	5,0	66,1 ^a	33,8 ^b	8 960 ^d
3	6,0	66,3 ^a	33,4 ^b	6 610 ^b
4	7,0	76,5 ^c	23,4 ^c	6 480 ^b
5	8,0	88,9 ^d	11,2 ^d	3 595 ^a
Temperatura				
1	50	77,2 ^e	22,6 ^a	11 860 ^e

Tabela 1 – cd. / Table 1 – cont.

1	2	3	4	5
2	60	71,1 ^d	28,8 ^b	10 320 ^d
3	70	65,5 ^a	34,3 ^d	8 520 ^c
4	80	68,7 ^c	31,1 ^c	7 870 ^b
5	90	66,4 ^b	23,5 ^b	1 625 ^a
Czas trwania modyfikacji				
1	10	66,5 ^a	33,4 ^b	9 040 ^c
2	20	65,4 ^a	34,1 ^b	8 895 ^c
3	40	67,2 ^{ab}	32,6 ^{ab}	5840 ^b
4	60	68,1 ^b	31,7 ^a	4 750 ^a

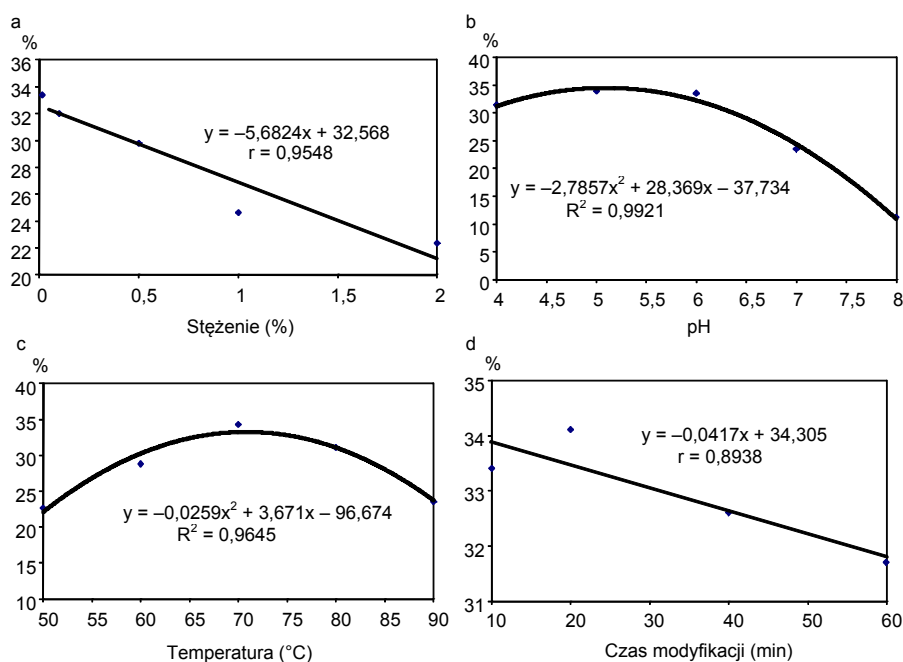
Różne litery w kolumnach oznaczają różnicę istotną dla wartości średnich przy $p \leq 0,05$.



Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział frakcji lizozymu w preparatach modyfikowanych termicznie: a) stężenie lizozymu w modyfikowanym preparacie: 1 – 0,05%, 2 – 0,1%, 3 – 0,5%, 4 – 1,0%, 5 – 2,0%, b) pH środowiska: 1 – 4,0, 2 – 5,0, 3 – 6,0, 4 – 7,0, 5 – 8,0, c) temperatura modyfikacji: 1 – 50°C, 2 – 60°C, 3 – 70°C, 4 – 80°C, 5 – 90°C, d) czas modyfikacji: 1 – 10 min, 2 – 20 min, 3 – 40 min, 4 – 60 min

Fig. 1. Electrophoretic separation of lysozyme fractions in thermally modified preparations: a) lysozyme concentration in modified preparation: 1 – 0.05%, 2 – 0.1%, 3 – 0.5%, 4 – 1.0%, 5 – 2.0%, b) pH of medium: 1 – 4.0, 2 – 5.0, 3 – 6.0, 4 – 7.0, 5 – 8.0, c) modification temperature: 1 – 50°C, 2 – 60°C, 3 – 70°C, 4 – 80°C, 5 – 90°C, d) modification time: 1 – 10 min, 2 – 20 min, 3 – 40 min, 4 – 60 min

w wyniku termicznej jego modyfikacji, który wykorzystano do wyznaczenia procentowej zawartości monomeru i dimeru w badanych próbach. Analiza statystyczna (rys. 2) wykazała, że występowała bardzo silna korelacja ($r = 0,9548$) pomiędzy ilością uzyskanego dimeru a stężeniem lizozymu w modyfikowanych próbach, a dobry efekt dimeryzacji uzyskano nie tylko dla bardzo słabego jego stężenia, tak jak to było u IBRAHIMA i IN. (1996 a, b), lecz także dla silniejszych, dochodzących nawet do 2%, stężeń enzymu. Stwierdzono ponadto, że na wynik dimeryzacji w sposób istotny wpływało pH środowiska oraz temperatura prowadzenia procesu. W zależności od warunków prowadzenia procesu termicznego zmodyfikowany lizozym zawierał od 11 do 34% dimeru. Najwięcej dimeru powstawało w początkowym okresie ogrzewania enzymu i próby o największym jego udziale już po 10 min zawierały go ponad 30%. W kolejnym interwale czasowym (20 min) wzrost ilości dimeru był nieznaczny, a w następnych (40 i 60 min) jego udział wręcz się zmniejszał, czego główną przyczyną była postępująca i nieodwracalna denaturacja lizozymu. Zwiększeniu skuteczności dimeryzacji sprzyjało lekko kwaśne środowisko (pH równe 5,0-6,0) i prowadzenie procesu w temperaturze 70°C. W wyniku modyfikacji enzymu w takich warunkach otrzymano preparat, w którym udział dimeru przekraczał 34%. Następnie podjęto próbę zwiększenia tego udziału, poddając termicznie zmodyfikowany lizozym dalszej modyfikacji na drodze chemicznej.



Rys. 2. Statystyczne zależności pomiędzy ilością dimeru a warunkami prowadzenia termicznej modyfikacji lizozymu: a – stężenie lizozymu, b – pH środowiska, c – temperatura, d – czas procesu

Fig. 2. Statistical relationships between the amount of dimer and conditions of thermal lysozyme modification: a – lysozyme concentration, b – pH of medium, c – temperature, d – process time

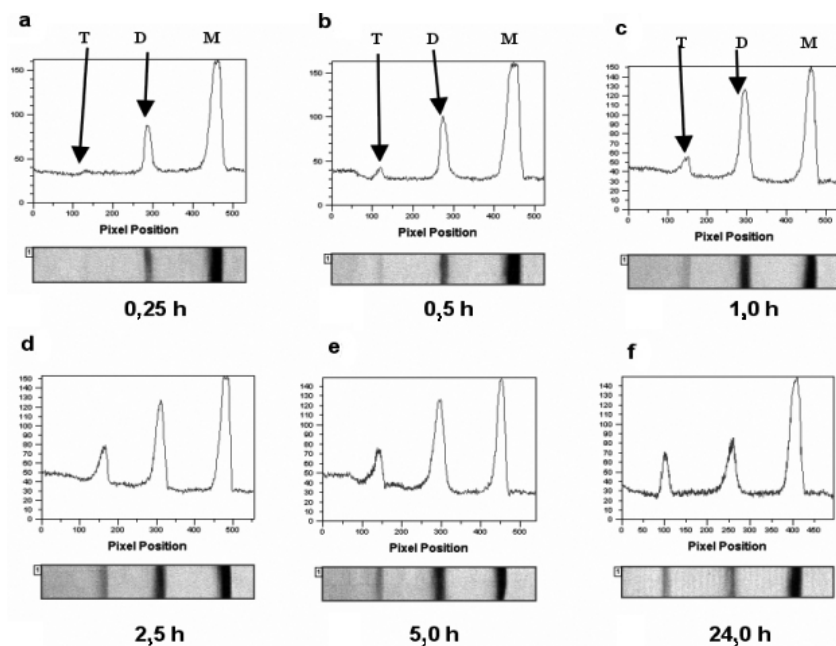
Z literatury przedmiotowej wynikało, że niektóre substancje chemiczne, takie jak np. silne utleniacze, zastosowane w odpowiednich warunkach mogą taki efekt wywołać. Między innymi THOMAS i IN. (1998) wykazali, że na drodze utleniania można doprowadzić do dimeryzacji lizozymu. W szeregu własnych prac laboratoryjnych z użyciem lizozymu obserwowano podobne zjawiska. Zauważono niejednokrotnie, że kiedy w środowisku kwaśnym dodano nadtlenek wodoru do roztworu zawierającego monomer lizozymu, występowało łączenie się cząsteczek w większe aglomeracje, a kiedy w podobnych warunkach dodano go do wcześniej zmodyfikowanego enzymu, proces ten stawał się bardziej intensywny. Informacje te były inspiracją opracowania nowego sposobu modyfikowania enzymu, który zakładał dwustopniowe otrzymywanie jego dimeru. W pierwszym etapie lizozym modyfikowano metodą termiczną, a w drugiej fazie zmodyfikowany termicznie enzym poddawano działaniu silnego utleniacza przez okres od 15 min do 24 h. Z danych prezentowanych w tabeli 2 wynika, że zastosowane warunki modyfikacji przyniosły wymierne efekty, gdyż w pierwszym okresie trwania reakcji nastąpiło zwiększenie udziału dimeru w preparatach. Po jednogodzinnym utlenianiu termicznie zmodyfikowanego enzymu ilość dimeru w próbie przekroczyła 40%, ale dalsze prowadzenie reakcji nie poprawiało już uzyskanego efektu. Nowym jakościowo zjawiskiem obserwowanym podczas drugiej fazy modyfikacji była zamiana procesu dimeryzacji enzymu, charakterystycznej dla modyfikacji termicznej, na proces jego oligomeryzacji. Efektem tej zmiany było pojawienie się obok dimeru dodatkowej frakcji odpowiadającej formie trimerycznej lizozymu, co w sumie zwiększało łączną ich ilość do poziomu ponad 50%. Proces oligomeryzacji intensyfikował się w miarę trwania reakcji utleniania lizozymu, co ilustruje rysunek 3 przedstawiający elektroforetyczny i densytometryczny obraz enzymu po określonym czasie jego modyfikacji. Na pierwszym i drugim diagramie obrazującym efekt procesu po 15 i 30 min jego trwania (rys. 3 a, b) obserwujemy ilościową przewagę monomeru i dimeru oraz pojawienie się śladowych ilości dodatkowej frakcji (trimeru). Dla prób modyfikowanych ponad 1 h (ryc. 3 c-f) charakterystycznym zjawiskiem było zmniejszanie się zawartości dimeru wraz z jednoczesnym wzrostem ilości trimeru i to w taki sposób, że suma oligomerów

Tabela 2. Charakterystyka preparatów lizozymu zmodyfikowanych chemicznie w czasie od 0,25 do 24 h

Table 2. Characteristics of lysozyme preparations modified chemically for 15 mins to 24 h

Lp.	Czas modyfikacji (h)	Udział monomeru (%)	Udział dimeru (%)	Udział oligomerów (%)	Aktywność hydrolityczna (U/mg)
1	0,25	65,5 ^d	34,2 ^b	35,7 ^a	9 610 ^e
2	0,5	65,0 ^d	34,5 ^c	39,5 ^b	9 520 ^e
3	1,0	45,6 ^c	40,6 ^f	52,5 ^c	9 230 ^d
4	2,5	45,0 ^b	37,7 ^e	54,2 ^d	8 920 ^e
5	5,0	44,9 ^b	36,3 ^d	53,9 ^d	7 950 ^b
6	24	44,5 ^a	29,9 ^a	52,9 ^c	6 850 ^a

Różne litery w kolumnach oznaczają różnicę istotną dla wartości średnich przy $p \leq 0,05$.



Rys. 3. Obraz tworzenia się form oligomerycznych w lizozymie podczas jego termiczno-chemicznej modyfikacji: M – monomer, D – dimer, T – trimer, a-f – wielkość pików D i T na kolejnych diagramach określa ilość utworzonego dimeru i trimeru w danej temperaturze modyfikacji

Fig. 3. The image of the formation of oligomeric forms in lysozyme during its thermo-chemical modification: M – monomer, D – dimer, T – trimer, a-f – the heights of D and T peaks on the diagrams illustrate the amounts of dimer and trimer obtained at specific temperatures of modification

niezależnie od czasu trwania procesu utrzymywała się na podobnym poziomie około 52-54%. Największą ilość dimeru uzyskano w wyniku reakcji utleniania trwającej 1 h. Tak otrzymany preparat zawierał ponad 40% dimeru i 12% trimeru. Dalsze wydłużenie okresu utleniania wpływało na wzrost udziału trimeru w próbach z jednoczesnym zmniejszeniem udziału w nich dimeru (tab. 2), ale nawet w tym przypadku całkowity efekt oligomeryzacji był lepszy od tego, który osiągnięto w wyniku samej modyfikacji termicznej.

Kolejny sposób modyfikacji lizozymu to metoda oparta na chemicznej jego modyfikacji z użyciem silnego utleniacza, w którym zastosowano znaczne obniżenie temperatury w stosunku do stosowanej uprzednio w metodach termicznej i termiczno-chemicznej z jednoczesnym znacznym wydłużeniem czasu jej trwania (do 144 h). Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa przedmiotowego wynikało, że w podobny sposób jak dotąd lizozymu nie modyfikowano, ale doświadczenia własne dawały uzasadnione podstawy do przeprowadzenia takich badań i rokowały osiągnięcie założonego celu, tj. otrzymanie preparatu zawierającego spolimeryzowany enzym. Główne założenia proponowanej procedury obejmowały modyfikowanie lizozymu w środowisku kwaśnym (pH 4,0)

i alkalicznym (pH 10,0) w zakresie temperatury od -25°C do 40°C przez czas od 24 h (1 doba) do 144 h (6 dób) (tab. 3). Taki sposób modyfikowania enzymu znacznie zwiększył efektywność jego polimeryzacji i otrzymano preparaty zawierające w swym składzie od 60 do 80% sumy oligomerów, a więc znacznie więcej niż w efekcie modyfikacji termicznej i termiczno-chemicznej. Głównym czynnikiem powodującym tworzenie oligomerów był niewątpliwie czynnik chemiczny (utleniacz), jednakże efektywność jego działania zależała od warunków prowadzenia procesu modyfikacji. W wyniku analizy matematycznej otrzymanych wyników oceniono wpływ kwasowości środowiska, temperatury i czasu trwania procesu na skuteczność polimeryzacji enzymu. Wykazano, że jednym z głównych czynników decydujących o skuteczności modyfikacji była kwasowość środowiska, która w sposób istotny wpływała na ilość uzyskiwanych oligomerów. Znacząco więcej otrzymywano ich w warunkach zasadowych niż kwaśnych (rys. 4). Średnia ilość uzyskana przy pH 4 wynosiła ponad 60%, w tym około 32% dimeru, a w środowisku zasadowym (pH 10) – 75%, w tym 36% dimeru. Niewątpliwie wpływ na efektywność modyfikacji miała także temperatura procesu.

Tabela 3. Charakterystyka preparatów lizozymu zmodyfikowanych chemicznie w określonych warunkach kwasowości środowiska, temperatury i czasu trwania modyfikacji

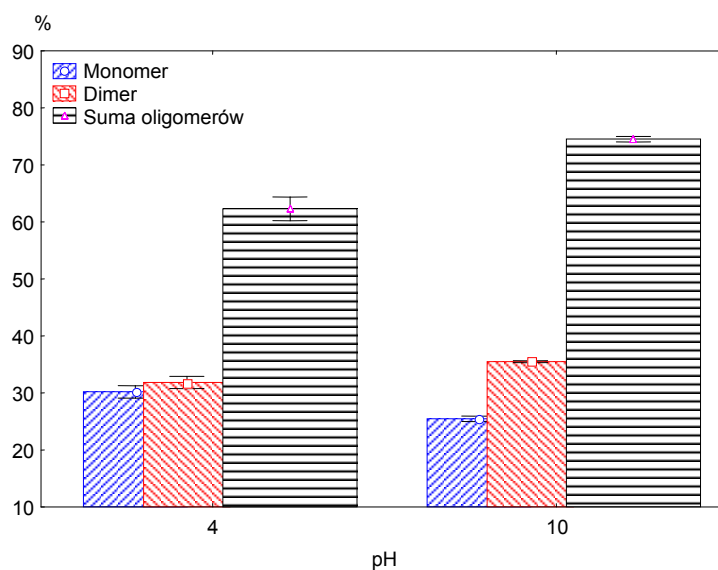
Table 3. Characteristics of lysozyme preparations chemically modified at specific acidity of the medium, temperature and modification time

Czas (doba)	Udział monomeru (%)	Udział dimeru (%)	Suma oligomerów (%)	Aktywność hydrolityczna (U/mg)
1	2	3	4	5
pH 4,0				
Temperatura -25°C				
1	35,0±0,2	33,3±0,1	64,8±0,1	3 813±144
3	34,4±0,1	33,5±0,2	65,7±0,1	2 605±137
6	34,3±0,2	33,8±0,2	65,6±0,3	2 168±129
Temperatura -10°C				
1	33,5±0,2	33,7±0,2	66,7±0,2	4 306±125
3	32,9±0,1	33,6±0,2	67,2±0,1	3 905±127
6	32,5±0,1	33,9±0,2	67,6±0,1	2 600±114
Temperatura 10°C				
1	31,4±0,1	35,3±0,2	68,6±0,2	5 060±136
3	30,8±0,1	35,5±0,3	69,3±0,4	4 803±140
6	30,6±0,2	35,7±0,1	69,5±0,2	3 404±122
Temperatura 30°C				
1	29,9±0,3	33,2±0,2	70,0±0,2	4 001±129
3	29,8±0,3	32,9±0,1	70,1±0,1	3 503±118
6	29,5±0,3	31,3±0,1	70,4±0,2	2 005±120

Tabela 3 – cd. / Table 3 – cont.

1	2	3	4	5
Temperatura 40°C				
1	29,3±0,4	32,0±0,3	70,6±0,3	503±24
3	29,0±0,2	31,6±0,2	70,9±0,2	200±15
6	–	–	–	–
pH 10,0				
Temperatura –25°C				
1	31,3±0,2	33,5±0,1	68,6±0,2	5 301±131
3	26,6±0,1	34,9±0,2	73,3±0,3	4 338±124
6	25,0±0,2	35,7±0,1	74,9±0,3	3 850±126
Temperatura –10°C				
1	29,1±0,1	34,1±0,2	70,6±0,2	5 002±141
3	26,9±0,2	34,7±0,1	72,9±0,2	4 035±125
6	24,7±0,1	35,6±0,1	75,1±0,3	3 616±133
Temperatura 10°C				
1	27,5±0,2	36,0±0,1	75,5±0,3	3 993±160
3	24,1±0,1	37,1±0,2	78,3±0,3	3 095±134
6	21,5±0,2	38,2±0,2	72,9±0,2	2 197±147
Temperatura 30°C				
1	26,3±0,1	35,4±0,2	73,2±0,3	2 410±133
3	23,5±0,2	35,7±0,2	76,5±0,3	1 647±139
6	23,2±0,1	35,9±0,1	79,6±0,1	947±102
Temperatura 40°C				
1	20,1±0,1	35,2±0,2	75,8±0,1	960±95
3	23,9±0,1	35,3±0,2	78,7±0,2	959±57
6	21,5±0,1	35,7±0,2	80,2±0,2	481±27

Alkaliczna modyfikacja enzymu (pH 10,0) dla każdej badanej temperatury dawała stały, statystycznie istotny wzrost ilości oligomerów w preparatach otrzymanych po określonym czasie procesu, tj. po 1, 3 i 6 dobach jego trwania. Dla dimeru zależność ta była słabsza, jednak tendencja wzrostowa była zachowana prawie dla wszystkich interwałów temperaturowych. Oceniając wpływ temperatury modyfikacji na efektywność oligomeryzacji, wykazano wzrost ilości dimeru w zakresie temperatury od –25°C do 10°C (maksimum), a w kolejnym zakresie temperaturowym (20–40°C) stopniowe, choć bardzo nieznaczne, zmniejszanie się jego zawartości w preparacie. Zależności te intensyfikowały się w miarę stosowania dłuższego czasu reakcji i maksymalna ilość formy dimerycznej dla 10°C wynosiła wówczas 36% po 1 dobie, 37,1% po 3 dobach i 38,2% po 6 dobach modyfikacji. Jednocześnie obserwowano stały wzrost sumy oligomerów,

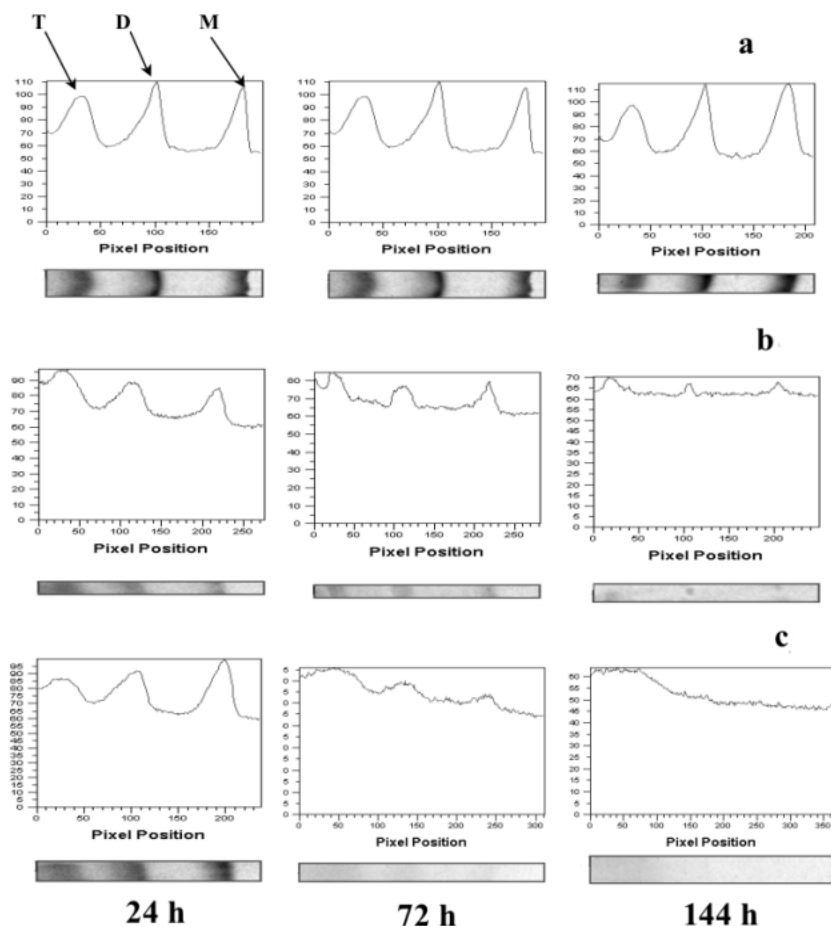


Rys. 4. Średnia zawartość form oligomerycznych w preparatach lizozymu zmodyfikowanego w niskich temperaturach przy pH równym 4,0 i 10,0
 Fig. 4. Mean contents of oligomeric forms in lysozyme preparations modified at low temperatures at pH of 4.0 and 10.0

których średnia ilość w preparacie wynosiła 68, 72 i 75% po 1 dobie, 73, 75 i 78% po 3 dobach oraz 75, 78 i 80% po 6 dobach modyfikowania odpowiednio w temperaturze -25 , 10 i 40°C .

W przypadku modyfikacji lizozymu w środowisku kwaśnym, podobnie jak w środowisku zasadowym, w zakresie temperatur od -25 do 10°C obserwowano powolny wzrost ilości oligomerów. Zależność ta była zachowana dla każdego okresu modyfikacji, tj. dla 24, 72 i 144 h prowadzenia procesu. Tu także maksymalną ilość dimeru (35,7%) uzyskano w temperaturze 10°C po 6-dobowej modyfikacji enzymu. Po przekroczeniu temperatury 10°C skuteczność oligomeryzacji się zmniejszała i w 20°C ilość dimeru była mniejsza o 1,2% od wartości maksymalnej, a w temperaturze 30°C – o kolejne 3,2%.

Ekstremalne zmiany wystąpiły w wyniku podniesienia temperatury procesu do 40°C . W przypadku modyfikacji alkalicznej, pomimo bardzo dużej zawartości oligomerów w preparatach otrzymanych po 6 dobach jej prowadzenia, całkowita ilość lizozymu wyraźnie się zmniejszała, o czym świadczą zanikające pasma białkowe na rozdzielach elektroforetycznych (rys. 5 b). Takie warunki modyfikacji powodowały bowiem rozpoczęcie procesu hydrolizy białka prowadzącego w efekcie do jego zniszczenia. Dla modyfikacji kwaśnej natomiast (pH 4,0), w preparatach po 1 i 3 dobach trwania procesu nadal obserwowano tworzenie się oligomerów, ale już po 144 h modyfikowania enzymu preparaty nie zawierały żadnej z jego form. Okazało się, że długotrwałe działanie stosowanej temperatury wywoływało tym razem kwaśną hydrolizę białka. Jej efekty dobrze są widoczne na rozdzielach elektroforetycznych (rys. 5 c), na których obserwujemy



Rys. 5. Rozdziały elektroforetyczne i densytogramy wybranych preparatów chemicznie zmodyfikowanego lizozymu w temperaturze: a) -10°C , pH 4,0, b) 40°C , pH 10,0, c) 40°C , pH 4,0; T – trimer, D – dimer, M – monomer

Fig. 5. Electrophoretic separations and densitograms of selected preparations of lysozyme modified at specific temperatures: a) -10°C , pH 4.0, b) 40°C , pH 10.0, c) 40°C , pH 4.0; T – trimer, D – dimer, M – monomer

kolejne etapy degradacji enzymu. Po 24 h modyfikacji występowały trzy piki odpowiadające monomerowi, dimerowi i trimerowi lizozymu, po 3 dobach modyfikacji wysokość pików znacznie się obniżyła, a po 6 dobach nastąpiło całkowite wyplaszczanie krzywej. Przeprowadzone doświadczenie wykazało więc, że w określonych warunkach oddziaływanie na lizozym silnego utleniacza może go inaktywować, a nawet doprowadzić do całkowitej jego degradacji. Dla badanych warunków wykazano, że po 6 dobach prowadzenia modyfikacji w temperaturze 40°C następowała całkowita hydroliza białka w środowisku kwaśnym oraz częściowa w środowisku zasadowym. Bezpiecznie zatem można ją prowadzić jedynie w temperaturze do 30°C . Dalsze podwyż-

szanie temperatury prowadziło bowiem do ponad 50-procentowej denaturacji białka w środowisku alkalicznym i całkowitej jego hydrolizy w środowisku kwaśnym.

Innym rozwiązaniem stosowanym zamiast termicznych i chemicznych sposobów modyfikowania lizozymu jest metoda, w której wykorzystuje się procesy membranowe. Podstawą jej opracowania były obserwacje dokonane podczas wcześniejszych prac nad lizozymem, kiedy to zauważono, że w czasie jego izolowania z białka jaja kurzego technikami membranowymi w sprzyjających warunkach tworzyły się niewielkie ilości spolimeryzowanego enzymu (LEŚNIEWSKI 1997, LEŚNIEWSKI i KIJOWSKI 2000, CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA i IN. 2003). W metodzie tej wykorzystano zjawiska fizykochemiczne zachodzące podczas procesu membranowego prowadzonego w określonych warunkach ciśnienia (15-30 bar), temperatury (20-50°C) i kwasowości środowiska (pH 7-10). Pomimo dużego zróżnicowania, zwłaszcza w ilościach uzyskanego dimeru, wyniki zestawione w tabeli 4 potwierdzają możliwość wykorzystania technik membranowych do oligomeryzacji lizozymu. Analiza statystyczna wykazała, że największego udziału oligomerów należy się spodziewać w wyniku modyfikacji prowadzonej przez okres od 3,0 do 4,5 h przy ciśnieniu od 22 do 26 bar.

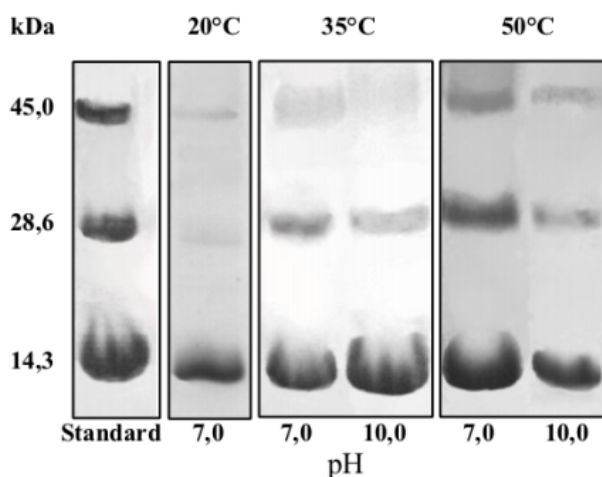
Tabela 4. Charakterystyka preparatów lizozymu uzyskanych z zastosowaniem technik membranowych

Table 4. Characteristics of lysozyme preparations modified by membrane method

Próba	pH	Ciśnienie (bar)	Temp. (°C)	Czas (h)	Udział monomeru (%)	Udział dimeru (%)	Suma oligomerów (%)	Aktywność hydrolityczna (U/mg)
1	7,0	15	20	1,0	74,1 ⁿ	16,5 ^a	26,0 ^a	11 440 ^o
2	7,0	15	20	2,0	73,0 ^m	16,6 ^a	27,1 ^b	10 050 ⁿ
3	7,0	15	20	5,0	72,1 ^l	17,6 ^c	27,9 ^c	6 840 ⁱ
4	7,0	20	20	1,0	69,2 ^k	17,5 ^b	30,9 ^d	7 920 ^m
5	7,0	20	20	2,0	67,9 ^h	17,8 ^{cd}	32,1 ^f	7 090 ^c
6	7,0	20	20	5,0	67,5 ^h	18,1 ^d	32,6 ^g	6 120 ^g
7	7,0	30	20	1,0	69,0 ^k	17,2 ^b	31,3 ^d	6 950 ^k
8	7,0	30	20	2,0	68,2 ⁱ	17,5 ^{bc}	31,7 ^e	6 060 ^g
9	7,0	30	20	5,0	67,7 ^h	17,7 ^c	32,3 ^{fg}	5 910 ^f
10	7,0	20	35	2,0	58,1 ^d	23,0 ^g	41,7 ^l	6 960 ^k
11	8,0	20	35	2,0	59,3 ^e	22,7 ^g	40,4 ^k	6 730 ^h
12	9,0	20	35	2,0	60,8 ^f	22,0 ^f	39,1 ⁱ	5 465 ^d
13	10,0	20	35	2,0	61,5 ^g	21,1 ^e	38,5 ^h	4 550 ^b
14	7,0	20	50	2,0	46,7 ^a	33,2 ^l	53,3 ^p	5 940 ^f
15	8,0	20	50	2,0	48,9 ^b	31,3 ^k	51,1 ^o	5 770 ^e
16	9,0	20	50	2,0	54,9 ^c	29,4 ⁱ	48,0 ⁿ	4 995 ^c
17	10,0	20	50	2,0	54,7 ^c	27,5 ^h	45,3 ^m	4 095 ^a

Różne litery w kolumnach oznaczają różnicę istotną dla wartości średnich przy $p \leq 0,05$.

Na efektywność procesu w sposób istotny wpływały także temperatura i kwasowość środowiska. Fakt ten potwierdzają rozdziały elektroforetyczne zmodyfikowanego lizozymu, na których intensywność pasm białkowych odpowiadająca dimerowi zmieniała się w zależności od wielkości tych parametrów (rys. 6). Podwyższeniu temperatury modyfikacji z 20 do 50°C towarzyszył wzrost udziału formy dimerycznej o ponad 80%. Symultaniczne prognozowanie wyników wskazuje, że dalsze podwyższenie temperatury do poziomu 70-80°C jeszcze korzystniej wpłynęłoby na efekt modyfikacji. Jednak wysokość stosowanej temperatury ograniczona była warunkami prowadzenia procesów filtracyjnych. Dla użytego modułu ultrafiltracyjnego i stosowanych membran przekroczenie temperatury 50°C powodowało nasilenie występowania niekorzystnych zjawisk, takich jak wzrost polaryzacji stężeniowej czy oporów transportu, co w rezultacie prowadziło do zmniejszenia wydajności procesu membranowego i ostatecznie do jego całkowitego zahamowania. Zjawiska te dodatkowo pogłębiała alkalizacja środowiska. Prowadzenie modyfikacji przy dużych wartościach pH, zbliżonych do wartości punktu izoelektrycznego enzymu, zmniejszało nie tylko efektywność jego oligomeryzacji, ale także zdecydowanie wydajność procesu w wyniku szybkiego wzrostu polaryzacji stężeniowej i zapychania membran. Prezentowane wyniki wskazują, że przy doborze warunków modyfikacji lizozymu metodą membranową należy zatem, oprócz czasu i ciśnienia, zawsze uwzględniać czynnik termiczny i kwasowość środowiska i w miarę możliwości stosować jak najwyższą temperaturę (ale nie przekraczającą 50°C), a pH roztworów utrzymywać na poziomie około 7,0 (tab. 4).



Rys. 6. Przykłady rozdziałów elektroforetycznych zmodyfikowanego lizozymu w wybranych warunkach pH i temperatury prowadzenia procesu membranowego (jako standardy użyto lizozym (14,3 kDa) i albuminę z jaja kurzego (45,0 kDa) firmy Sigma oraz Lydium KLP (28,6 kDa) firmy Nika)

Fig. 6. Examples of electrophoretic separations of modified lysozyme at selected pH values and temperatures of the membrane process (standards used: lysozyme (14.3 kDa) and hen egg albumin (45.0 kDa) by Sigma, and Lydium KLP (28.6 kDa) by Nika)

Podsumowanie

W świetle przedstawionych wyników badań można stwierdzić, że prezentowane w pracy metody modyfikowania lizozymu dają możliwość jego efektywnej polimeryzacji. Średnia zawartość oligomerów w preparatach otrzymanych w wyniku zastosowania tych metod wynosiła od 29 do 69% (tab. 5).

Tabela 5. Porównawcza ocena średnich zawartości oligomerów w preparatach lizozymu otrzymanych z wykorzystaniem stosowanych w pracy metod modyfikacji enzymu

Table 5. Comparative analysis of mean oligomer contents in lysozyme preparations modified by analysed methods

Metoda modyfikacji	Udział dimeru (%)	Suma oligomerów (%)
Termiczna	29,1	29,1
Termiczno-chemiczna	36,4	48,3
Chemiczna	34,5	69,6
Membranowa	24,6	42,3

Wykorzystując metodę termiczną, uzyskiwano preparaty zawierające w swym składzie średnio 30% formy dimerycznej enzymu. Największa ilość dimeru występowała w preparatach pochodzących z modyfikacji termiczno-chemicznej, ale dodatkowo preparaty te zawierały w swym składzie trimer. Z kolei efektem modyfikacji chemicznej w niskich temperaturach był największy udział sumy oligomerów w otrzymanych próbach. Mimo że najmniej oligomerów (zarówno dimeru, jak i sumy dimeru i trimery) zawierały preparaty modyfikowane metodą membranową, to ten sposób modyfikacji lizozymu wydaje się interesującą alternatywą dla metod termicznych i chemicznych. Metoda ta może być szczególnie użyteczną w produkcji zmodyfikowanego lizozymu w przetwórnictwie, które w swej praktyce produkcyjnej wykorzystują techniki membranowe do innych celów, np. do zagęszczania białka jaja bądź izolowania z niego użytecznych składników. W takim przypadku niewielka modernizacja linii technologicznych umożliwiłaby prowadzenie bezpośredniej produkcji preparatu lizozymu o zwiększonym udziale form oligomerycznych.

Wnioski

1. Wykazano, że prezentowane metody modyfikowania lizozymu okazały się skutecznym sposobem jego polimeryzacji, w wyniku której uzyskano preparaty zawierające, oprócz pozostałości monomeru, także znaczne ilości dimeru bądź mieszaniny dimeru i trimery.

2. Czynniki determinującymi skuteczność dimeryzacji metodą termiczną były: stężenie lizozymu, pH roztworu oraz temperatura i czas trwania procesu. W optymalnych warunkach prowadzenia modyfikacji otrzymano preparaty zawierające w swym składzie ponad 34% dimeru.

3. Chemiczna modyfikacja preparatów uzyskanych metodą termiczną (modyfikacja termiczno-chemiczna) zwiększała efekt oligomeryzacji enzymu. Otrzymane preparaty zawierały w sumie ponad 57% oligomerów, w tym około 42,5% dimeru.

4. Wykazano, że niskotemperaturowe chemiczne modyfikowanie monomeru lizozymu z udziałem H_2O_2 w zakresie temperatur od -25° do $+40^\circ C$ w przedłużonym do 144 h procesie spowodowało zmiany strukturalne enzymu, w których efekcie otrzymano preparaty zawierające w swym składzie od 60 do 80% oligomerów.

5. Udowodniono zasadność zastosowania techniki diafiltracji do niskociśnieniowej, membranowej modyfikacji lizozymu, w której wyniku uzyskano preparaty zawierające ponad 53% spolimeryzowanego enzymu, w tym około 33% dimeru.

Literatura

- CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA R., LEŚNIEWSKI G., KIJOWSKI J., 2003. Antibacterial activity of lysozyme modified by the membrane technique. *Electr. J. Pol. Agric. Univ. Ser. Food Sci. Technol.* 6, 2.
- IBRAHIM H.R., 1998. On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen egg-white lysozyme: a conformation-dependent activity. *Nahrung* 42: 187-193.
- IBRAHIM H.R., 2003. Hen egg white lysozyme and ovotransferin: mystery, structural role and antimicrobial function. W: *Proceedings of Xth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*. Red. Y. Nys. Clement & Rouxel, ISPAIA, Saint-Brieuc, France: 350-365.
- IBRAHIM H.R., HIGASHIGUCHI S., JUNEJA L.R., KIM M., YAMAMOTO T., 1996 a. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1416-1420.
- IBRAHIM H.R., HIGASHIGUCHI S., KOKETSU M., JUNEJA L.R., KIM M., YAMAMOTO T., SUGIMOTO Y., AOKI T., 1996 b. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kill gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3799-3806.
- IBRAHIM H.R., KATO A., KOBAYASHI K., 1991. Antimicrobial effects of lysozyme against Gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2077-2080.
- JOLLES P., JOLLES J., 1984. What is new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* 63: 165-188.
- KIJOWSKI J., LEŚNIEWSKI G., FABISZ-KIJOWSKA A., 2000. Lysozyme polymer formation and functionality of residuals after lysozyme extraction. W: *Egg nutrition and biotechnology*. Red. J.S. Sim, S. Nakai, W. Guenter. CAB Int., Wallingford (UK): 269-285.
- LEŚNIEWSKI G., 1997. Otrzymywanie lizozymu z białka jaja kurzego metodami krystalizacji, ultrafiltracji oraz z użyciem wymiennicza jonowego. *Maszynopis. Katedra Technologii Produktów Drobiarskich AR, Poznań*.
- LEŚNIEWSKI G., KIJOWSKI J., 2000. Próba otrzymania dimeru lizozymu z białka jaja kurzego. W: *Materiały XXXI Sesji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, Poznań*. Prodruk, Poznań: 309-310.
- LEŚNIEWSKI G., KIJOWSKI J., 2007. Lysozyme. W: *Bioactive egg compounds*. Red. R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Amton, R. Schade. Springer, Berlin: 33-42.
- NOHARA D., MIZUTANI A., SAKAI T., 1999. Kinetic study on thermal denaturation of hen egg-white lysozyme. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 199-205.
- PN-73/A-82110 1973. Oznaczanie zawartości wody.
- PN-75/A-04018 1975. Oznaczanie zawartości azotu metodą Kjeldahla.

Leśniewski G., 2009. Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 4, #130.

- SOPHIANOPOULOS A.J., 1969. Association sites of lysozyme in solution. *J. Biol. Chem.* 244, 3188-3193.
- THOMAS B.R., VEKILOV P.G., ROSENBERGER F., 1998. Effects of microheterogeneity in hen egg white lysozyme crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. D* 54: 226-236.
- TOMIZAWA H., YAMADA H., IMOTO T., 1994. The mechanism of irreversible inactivation of lysozyme at pH 4 and 100°C. *Biochemistry* 33: 1332-1336.
- TRZISZKA T., CLOSTERMANN G., 1993. Die Bestimmung der Lysozyme-Aktivität als Methode für die Eiquantitätsbeurteilung. *Arch. Geflügelkd.* 57: 22-26.
- YOUNG A.C.M., TILTON R.F., DEWAN J.C., 1994. Thermal expansion of hen egg-white lysozyme. *J. Mol. Biol.* 235: 302-317.

NEW WAYS OF PHYSICO-CHEMICAL MODIFICATION OF LYSOZYME

Summary. Lysozyme (E.C.3.2.1.17) is an enzymatic protein, found commonly in nature, exhibiting a number of highly useful properties, the most important one being its ability to hydrolyze specific polysaccharides making up the cell wall of bacteria. Modified from the monomeric to dimeric form, the enzyme has additional, valuable properties, including its enhanced bactericidal activity against Gram-negative bacteria, including numerous important pathogenic bacteria. Modified lysozyme is therefore of much interest not only for the food industry, where it is used for food presentation, but also for medicine, veterinary medicine, and pharmacology, where it is used for combating a variety of infections, as a natural antibiotic, and an immune stimulant. Thus, the incorporation of lysozyme modification methods in further studies on this enzyme is highly advisable, and as such – urgent, since the effects of these investigations are awaited by both science and practice. In this study the undertaken investigations aimed at developing methods (ways) of physico-chemical lysozyme modification causing its oligomerization, increasing the antibacterial activity of this enzyme. Out of the four original solutions of lysozyme modification, each may be successfully applied to generate its oligomerization. It was shown that using the thermal and thermo-chemical methods it was possible to produce preparations containing approximately 57% of oligomers, including 34-43% of dimer. The application of low temperatures during chemical modification of the enzyme at the simultaneous considerable prolongation of the process resulted in producing preparations which contained 60-80% of oligomers, including over 40% of dimer. Another solution yielding a good effect of enzyme polymerization was to apply membrane processes. As a result of such a modification run under appropriate pressure, temperature and acidity conditions, the preparations contained over 50% of oligomers. Upon slight adaptation of process lines, this method of enzyme modification could be successfully applied in plants using membrane systems in egg processing.

Key words: lysozyme, thermal, thermo-chemical, chemical modification of lysozyme, membrane processes, bactericidal activity

Leśniewski G., 2009. Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. Nauka Przyr. Technol. 3, 4, #130.

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Grzegorz Leśniewski, Katedra Zarządzania Jakością Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland, e-mail: lesnier@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

7.10.2009

Do cytowania – For citation:

Leśniewski G., 2009. Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. Nauka Przyr. Technol. 3, 4, #130.