

Kamil KOPEĆ, Anna LUTYŃSKA, Katarzyna DĄBKOWSKA

e-mail: k.kopec@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Intensyfikacja właściwości bakteriobójczych lizozymu na drodze jego termicznej modyfikacji

Wstęp

Lizozym jest bakteriobójczym enzymem posiadającym zdolność hydrolizy peptydoglikanu budującego ściany komórkowe bakterii. Ze względu na swoje właściwości oraz możliwość pozyskiwania z taniego surowca (białko jaja kurzego) lizozym znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [Chang i in., 2000].

Antybakteryjne działanie lizozymu nie wynika jedynie z aktywności enzymatycznej. Wykazano, że bakteriobójczy jest również zdenaturowany enzym oraz niektóre peptydy powstałe w wyniku jego hydrolizy [Pellegrini i in., 1997].

Na działanie lityczne lizozymu wrażliwe są przede wszystkim bakterie Gram-dodatnie. Rozszerzenie jego antybakteryjnych właściwości także w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, do których należą liczne bakterie patogenne, osiągnąć można poprzez proces modyfikacji lizozymu, który polega na konwersji natywnie występujących monomerów enzymu w formy oligomeryczne [Borowiak i Leśnierowski, 2012].

Wśród opracowanych technik modyfikacji lizozymu wyróżnić można metody: termiczne, termochemiczne, chemiczne i membranowe [Cegielska-Radziejewska i in., 2008].

Celem niniejszej pracy jest dobór warunków procesu termicznej modyfikacji lizozymu (*pH*, temperatura, czas) pod kątem zwiększenia jego właściwości bakteriobójczych przeciwko bakteriom *E. coli* (Gram-ujemne), przy jednoczesnym zachowaniu aktywności przeciwko bakteriom Gram-dodatnim. Wpływ warunków termicznej modyfikacji lizozymu na jego aktywność był co prawda dotychczas badany, jednak porównanie otrzymanych wyników jest trudne ze względu na stosowanie przez autorów odmiennych warunków procesowych i/lub różnych metod analizy właściwości antybakteryjnych otrzymanych oligomerów przeciwko bakteriom Gram-ujemnym.

Materiały i metody

Materiały

Lizozym z białka jaja kurzego ($\geq 30\ 000$ FIP-U/mg) został zakupiony w firmie Merck (Niemcy). Szczepy bakterii *Micrococcus luteus* (PCM 525) i *Escherichia coli* [PCM 2561] uzyskano z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Bulion odżywczy, agar wzbogacony oraz odczynniki do sporządzenia buforów zakupiono w firmie POCh (Polska).

Termiczna modyfikacja lizozymu

10 ml roztworu lizozymu o stężeniu 5 mg/ml w odpowiednim buforze umieszczano w kolbach o objętości 50 ml i wytrząsano przy 140 obr/min w stałej temperaturze. Zarówno skład i odczyn *pH* buforu, jak też czas i temperatura prowadzenia procesu zależały od badanego wariantu modyfikacji termicznej. Następnie kolby chłodzono przez 10 min w wodzie z lodem. W przypadku zaobserwowania mętności roztworów próbki filtrowano na sączkach o średnicy porów 0,2 μm . Lizozym poddawano następnie procesowi liofilizacji w urządzeniu *Alpha 1-4* (CHRIST, Niemcy). Tak otrzymany liofilizat wykorzystywano do kolejnych oznaczeń.

W celu doboru odczynu *pH* dla termicznej modyfikacji lizozymu, proces przeprowadzono w warunkach najczęściej opisywanych w literaturze. Jako środowisko reakcji zastosowano mianowicie 10 mM bufor fosforanowy o *pH* 7,20 lub 10 mM bufor octanowy o *pH* 4,40. Proces prowadzono w temperaturze 80°C przez 20 min.

W celu doboru czasu termicznej modyfikacji lizozymu, proces prowadzono przy *pH* 4,40 i w temperaturze 80°C przez czas 5, 10, 15, 20

lub 25 minut. W celu zbadania wpływu temperatury na termiczną modyfikację lizozymu, proces prowadzono przez 15 min w *pH* 4,40, gdyż w tych warunkach uzyskano najlepsze wyniki w poprzednich etapach badań oraz w temperaturach 60, 70, 80, 90 lub 95°C.

Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych lizozymu – posiew powierzchniowy

Inokulum bakterii *E. coli* (Gram-ujemne) i *M. luteus* (Gram-dodatnie) przygotowywano poprzez zaszczepienie 30 ml bulionu odżywczego bakteriami ze skosu agarowego i inkubacją przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Następnie zawiesinę bakterii rozcieńczano z użyciem 0,1% (w:v) roztworu NaCl w 20 mM buforze fosforanowym o *pH* 7,0 tak, aby uzyskać zawiesiny bakterii o stężeniu z zakresu $3\div 5\cdot 10^3$ CFU/ml w przypadku *E. coli* i $1\div 2\cdot 10^6$ CFU/ml dla *M. luteus*. W kolejnym kroku 1 ml tak przygotowanej zawiesiny mieszano z 1 ml roztworu odpowiednio zmodyfikowanego lizozymu w tym samym buforze i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 25°C lub 37°C z mieszaniami co 10 minut. W przypadku inkubacji z *E. coli* stosowano stężenie lizozymu równe 5 mg/ml, natomiast w przypadku *M. luteus* badano stężenia 5; 1; 0,1 oraz 0,05 mg/ml. Jako próbę kontrolną sporządzono mieszaninę 1 ml zawiesiny bakterii i 1 ml buforu.

Po inkubacji wykonywano posiewy 0,1 ml poszczególnych próbek na szalkach *Petriego* z agarem odżywczym. Liczbę jednostek koloniotwórczych (CFU) zliczano po inkubacji szalek w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Wszystkie doświadczenia zostały wykonane w trzech powtórzeniach. Właściwości bakteriobójcze lizozymu przeciwko bakteriom *E. coli* oznaczano dla każdego badanego wariantu modyfikacji jako wyznacznik skuteczności procesu. Aktywność bakteriobójczą przeciwko *M. luteus* oznaczano jedynie dla wyznaczonych najlepszych warunków procesowych termicznej modyfikacji enzymu, w celu potwierdzenia zachowania działania litycznego zmodyfikowanego enzymu w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Procent przeżycia bakterii wyznaczono na podstawie stosunku liczby CFU/ml badanej próby do liczby CFU/ml dla próby kontrolnej.

Oznaczenie aktywności enzymatycznej lizozymu

Aktywność enzymatyczną lizozymu oznaczano stosując metodę turbidymetryczną zaproponowaną przez Shugara [1952]. Metoda ta wykorzystuje spadek absorbancji w czasie przy długości fali 450 nm na skutek lizy bakterii *M. luteus* pod wpływem lizozymu. Jako jednostkę aktywności enzymatycznej (U) przyjęto ilość enzymu, która powoduje spadek absorbancji przy długości fali 450 nm o 0,001 w ciągu 1 minuty w temperaturze pokojowej.

W celu wykonania oznaczeń przygotowano zawiesinę bakterii *M. luteus* w 0,1% (w:v) NaCl w 20 mM buforze fosforanowym o *pH* 7,00. Użyto takiej ilości mikroorganizmów, aby absorbancja zawiesiny zawierała się w przedziale 0,600÷0,700 (jako próbę ślepą zastosowano czysty bufor).

Po inkubacji przez 10 minut w temperaturze pokojowej, 2,98 ml zawiesiny bakterii umieszczano w kuwecie pomiarowej. Do kuwety dodawano następnie 0,02 ml odpowiednio rozcieńczonego roztworu lizozymu. Za pomocą spektrofotometru GENESYS™ 20 (Thermo Scientific, USA) mierzono spadek absorbancji (A) co 15 sekund przez 1 minutę.

Aktywność względną wyznaczono jako wyrażony w procentach stosunek aktywności lizozymu modyfikowanego do aktywności lizozymu niemodyfikowanego. Wszystkie pomiary wykonano w 5 powtórzeniach. Aktywność lizozymu na 1 ml próbki obliczono według wzoru:

$$\text{aktywność} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{-aD}{0,001 \cdot 0,02} \quad (1)$$

gdzie:

a – współczynnik kierunkowy prostej $A = f(t)$,

D – rozcieńczenie próbki.

Wyniki i ich analiza

W ramach badań nad modyfikacją termiczną lizozymu dokonano porównania dwóch najczęściej stosowanych w tym celu buforów, różniących się odczynem pH . Modyfikację w buforze o pH 4,40 i 7,20 ($T = 80^\circ C$, $t = 20$ min) porównano pod kątem zwiększenia właściwości bakteriobójczych enzymu przeciwko *Gram*-ujemnym bakteriom *E. coli* oraz spadku jego aktywności enzymatycznej. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1. Podczas modyfikacji enzymu w buforze o pH równym 7,20 zaobserwowano wytrącanie się dużej ilości białka.

Tab. 1. Wpływ pH buforu stosowanego do modyfikacji termicznej lizozymu na jego właściwości antybakteryjne przeciwko *E. coli* oraz na jego aktywność enzymatyczną

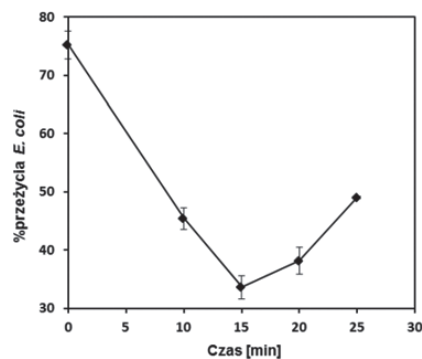
pH buforu	% przeżycia bakterii		Aktywność względna [%]
	Inkubacja w $25^\circ C$	Inkubacja w $37^\circ C$	
brak modyfikacji	$83,2 \pm 1,9$	$75,2 \pm 3,2$	100
4,40	$29,0 \pm 8,9$	$38,5 \pm 11,7$	83,7
7,20	$28,2 \pm 3,2$	$63,9 \pm 3,4$	0

Zastosowanie lizozymu poddanego termicznej modyfikacji w obu badanych buforach spowodowało spadek % przeżycia bakterii *E. coli* w porównaniu do lizozymu niemodyfikowanego. W przypadku inkubacji zawiesiny bakterii i lizozymu prowadzonej w temperaturze $25^\circ C$, pH buforu użytego do modyfikacji praktycznie nie ma wpływu na uzyskany wynik – % przeżycia bakterii wyniósł 29,0 i 28,2 odpowiednio dla buforu o pH 4,40 i 7,20. Gdy jednak inkubacja przebiegała w temperaturze $37^\circ C$ modyfikacja w buforze octanowym o pH 4,40 okazała się znacznie skuteczniejsza niż modyfikacja w buforze fosforanowym o pH 7,20 (uzyskano odpowiednio 38,5 i 63,9% przeżycia). Znaczenie temperatury inkubacji na działanie lityczne lizozymu prawdopodobnie związane jest z jednoczesnym wpływem dwóch czynników: największej aktywności enzymatycznej lizozymu w temperaturze $37^\circ C$ oraz największej efektywności metabolizmu bakterii *E. coli* również w tej temperaturze. Lizozym niemodyfikowany wykazał lepsze właściwości antybakteryjne w temperaturze $37^\circ C$. W przypadku, gdy modyfikacja powoduje spadek aktywności enzymatycznej, większego znaczenia nabiera czynnik związany z efektywnością metabolizmu bakterii. Stąd enzym modyfikowany wykazuje mniejsze działanie lityczne w temperaturze $37^\circ C$ niż $25^\circ C$. Największą różnicę w % przeżycia bakterii w zależności od temperatury inkubacji zaobserwowano w przypadku lizozymu modyfikowanego przy pH 7,20 (uzyskano odpowiednio 28,2 i 63,9% przeżycia), gdy utracił on całkowicie aktywność enzymatyczną.

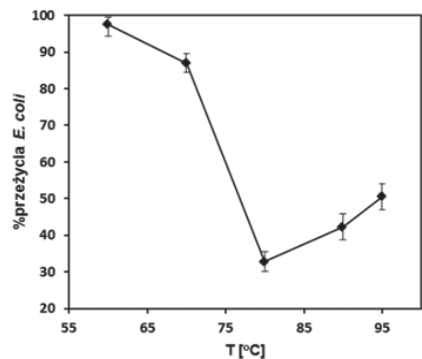
Do dalszych badań, tj. wyznaczenia najlepszych parametrów procesu termicznej modyfikacji lizozymu, stosowano bufor octanowy o pH 4,40 oraz inkubację zawiesiny bakterii i roztworów lizozymu w temperaturze $37^\circ C$. Wyniki oznaczeń właściwości antybakteryjnych przeciwko *E. coli* w zależności od czasu i temperatury procesu przedstawiono na rys. 1 i 2.

Najmniejszy % przeżycia bakterii zaobserwowano w przypadku użycia enzymu poddanego termicznej modyfikacji trwającej 15 minut. Dla porównania, w literaturze najlepsze wyniki uzyskiwano dla 20 minutowej modyfikacji [Borowiak, 2012]. W porównaniu do innych prac, w ramach niniejszych badań proces prowadzono na wytrząsarce co powodowało lepszą wymianę ciepła i szybsze osiągnięcie najlepszych właściwości modyfikowanego enzymu niż w przypadku inkubacji próbek bez mieszania.

Na podstawie otrzymanych danych doświadczalnych można także zauważyć, że najlepsza temperatura dla prowadzenia procesu termicznej modyfikacji wynosi $80^\circ C$. Wynik ten jest zgodny z doniesieniami literaturowymi. Warty odnotowania jest również fakt, że lizozym modyfikowany w 60 i $70^\circ C$ charakteryzował się jeszcze słabszymi właściwościami antybakteryjnymi przeciwko bakteriom *E. coli* niż lizozym niemodyfikowany.



Rys. 1. Wpływ czasu termicznej modyfikacji lizozymu (pH 4,40, $T = 80^\circ C$) na jego właściwości bakteriobójcze przeciwko *E. coli*



Rys. 2. Wpływ temperatury termicznej modyfikacji lizozymu (pH 4,40, $t = 15$ min) na jego właściwości bakteriobójcze przeciwko *E. coli*

W ostatnim etapie badań sprawdzono, czy termiczna modyfikacja lizozymu w ustalonych warunkach nie wpływa negatywnie na właściwości antybakteryjne enzymu przeciwko bakteriom *M. luteus* (*Gram*-dodatnie). Okazało się, że w badanych warunkach (stężenie bakterii $1 \div 2 \cdot 10^6$ CFU/ml, inkubacja w $37^\circ C$) % przeżycia bakterii wyniósł 0 nawet dla najniższego badanego stężenia lizozymu wynoszącego 0,05 mg/ml.

Wnioski

Termiczna modyfikacja lizozymu skutecznie zwiększa właściwości bakteriobójcze enzymu przeciwko *Gram*-ujemnym bakteriom *E. coli*. Ze względu na lepsze właściwości antybakteryjne i zdecydowanie mniejszy spadek aktywności enzymatycznej modyfikowanego enzymu, jako środowisko prowadzenia procesu modyfikacji wybrano bufor octanowy o pH 4,40. Dodatkowo modyfikacja w tych warunkach nie generowała strat produktu ze względu na wytrącanie się białka. Najlepsze wyniki uzyskano dla modyfikacji w czasie równym 15 minut i temperaturze wynoszącej $80^\circ C$.

Wykazano również, że zwiększenie właściwości bakteriobójczych przeciwko bakteriom *E. coli* nie spowodowało utraty właściwości antybakteryjnych przeciwko bakteriom *M. luteus* (*Gram*-dodatnim).

Planowane jest kontynuowanie badań w kierunku wykorzystania termicznie modyfikowanego lizozymu do wytworzenia antybakteryjnych materiałów do zastosowań biomedycznych.

LITERATURA

- Borowiak R., Leśniewski G., 2012. Próba zwiększenia funkcjonalności preparatów otrzymanych metodą wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu. *ŻYWNÓŚĆ Nauka Technologia Jakość*, nr 5 (84), 124-134
- Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J., 2008. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations - a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 58, nr 1, 5-10
- Chang H-M., Yang C-C., Yung C-C., 2000. Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 161-164. DOI: 10.1021/jf9902797
- Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Klauser S., Hunziker P., von Fellenberg R., 1997. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J. Appl. Microbiol.*, 82, 372-378. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1997.00372.x
- Shugar D., 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 8, 302-309. DOI: 10.1016/0006-3002(52)90045-0