

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Przeciwbakteryjna aktywność modyfikowanego lizozymu wobec bakterii *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas fluorescens*

RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, TOMASZ SZABLEWSKI, GRZEGORZ LEŚNIEROWSKI, JACEK KIJOWSKI

UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Zarządzania Jakością Żywności

STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena aktywności przeciwbakteryjnej modyfikowanego lizozymu w stosunku do bakterii Gram-ujemnych *Pseudomonas fluorescens* i *Proteus mirabilis*. Porównano antybakteryjne działanie monomeru lizozymu i jego preparatu uzyskanego w wyniku modyfikacji termiczno-chemicznej. W otrzymanym preparacie lizozymu oznaczono udział form oligomerycznych, aktywność hydrolityczną i hydrofobowość.

Stwierdzono wzrost inhibującego działania lizozymu po modyfikacji w porównaniu z monomerem lizozymu i próbą bez dodatku enzymu w stosunku do badanych bakterii. Wykazano, że modyfikowany preparat lizozymu wykazujący aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii gramujemnych, charakteryzuje się wyższym udziałem form oligomerycznych jak również wyższą hydrofobowością powierzchniową.

Antibacterial activity of modified lysozyme against bacteria *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas fluorescens*

ABSTRACT

The aim of the study was to assess the antibacterial activity of modified lysozyme in relation to Gram-negative bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Proteus mirabilis*. Antibacterial action of lysozyme monomer and its preparation produced as a result of thermo-chemical modification were compared. In the obtained lysozyme preparation the proportion of oligomeric forms, hydrolytic activity and hydrophobicity were determined.

An increase was found in the inhibitory action of lysozyme after modification in comparison with lysozyme monomer and the sample without an addition of the enzyme in relation to the analysed bacteria. It was shown that the modified lysozyme preparation exhibiting antibacterial activity against Gram-negative bacteria is characterised by a higher proportion of oligomeric forms, as well as higher surface hydrophobicity.

1. WPROWADZENIE

Lizozym (N-acetylo-muramylohydrolaza E.C. 3.2.1.17) jest niskocząsteczkowym enzymem (14400 Da), szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Szczególnie bogate źródło lizozymu stanowi białko jaja kurzego, w którym stanowi on 3,5% udziału wszystkich występujących w nim białek. Lizozym charakteryzuje się zdolnością hydrolizy wiązań glikozydowych β (1-4), pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym (NAM) i N-acetylglukozyaminą (NAG) w warstwie peptydoglikanu, wchodzącego w skład ściany komórkowej bakterii. Antybakteryjna aktywność monomeru lizozymu dotyczy przede wszystkim bakterii gramododatnich. W przypadku bakterii gramujemnych dostęp enzymu do warstwy peptydoglikanu jest utrudniony, ze względu na obecność w ścianie komórkowej polipeptydów, lipoproteidów i lipopolisacharydów [1, 2, 3].

Lizozym będący naturalnym związkiem o właściwościach antybakteryjnych wykorzystywany jest jako środek utrwalający mleko i jego przetwory, mięso, produkty z mięsa, ryby, owoce i warzywa [4, 5, 6]. Zastosowanie lizozymu w połączeniu z innymi czynnikami utrwalającymi, jak pakowanie w atmosferze modyfikowanej, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, użycie nizyny, mleczanu sodu, fosforanu trójsodowego czy EDTA pozwala przedłużyć okres trwałości wielu produktów [7, 8, 9].

Szersze wykorzystanie lizozymu możliwe jest również poprzez zastosowanie modyfikacji, których efektem są zmiany struktury cząsteczki enzymu i powstanie form oligomerycznych. Wzrost efektywności antybakteryjnej lizozymu stwierdzono zarówno w wyniku przeprowadzenia modyfikacji membranowej, genetycznej jak również termicznej i chemicznej [10, 11, 12, 13].

Celem pracy była ocena przeciwbakteryjnego działania modyfikowanego lizozymu wobec bakterii Gram-ujemnych *Pseudomonas fluorescens* i *Proteus mirabilis*.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. Modyfikacja lizozymu

Lizozym otrzymano z białka świeżych jaj kur niosek ASTRA S metodą chromatograficzną z użyciem wymiennicza jonowego [14] a następnie poddano modyfikacji termiczno-chemicznej. Roztwór lizozymu o pH 4,0 ogrzewano przez 15 minut w temperaturze 70°C w łaźni wodnej (typ 1083 by Gesellschaft fur Labor-technik). Po schłodzeniu dodano taką ilość H_2O_2 , żeby w roztworze uzyskać jego stężenie na poziomie 2% i przechowywano w warunkach chłodniczych w temperaturze $8 \pm 2^\circ C$ przez okres 6 dni. Preparat uzyskany na drodze modyfikacji termiczno-chemicznej oznaczono jako LTC. Po modyfikacji preparat lizozymu poddano liofilizacji przy wykorzystaniu liofilizatora GT3 firmy Leybold-Heraeus. W otrzymanym preparacie oceniono aktywność hydrolityczną i udział form polimerycznych. Oznaczono również hydrofobowość powierzchniową monomeru i modyfikowanego lizozymu. Parametry lizozymu po modyfikacji przedstawiono w Tabeli 1.

2.2. Oznaczenie aktywności hydrolitycznej

Aktywność hydrolityczną lizozymu wykonano metodą spektrofotometryczną, polegającą na wykorzystaniu zjawisku lizy ścian komórkowych bakterii *Micrococcus lysodeicticus* bacteria. Aktywność hydrolityczną określono przez monitorowanie spadku zmętnienia zawiesiny komórek bakterii *Micrococcus lysodeikticus* przy długości fali 450 nm [15].

2.3. Określenie ilościowego udziału form lizozymu

Analizę elektroforetyczną przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu SE-600 (Hoefer Scientific Instruments) metodą z SDS-PAGE [14, 16]. Zastosowano żel poliakrylamidowy o stężeniu 6% (żel zagęszczający) i 12,5% (żel rozdzielający). Jako standard mas cząsteczkowych stosowano lizozym 14,6 kDa (Sigma), Lydium KLP 28 kDa (Nika Health Product) i albuminę jaja kurzego 45 kDa (Sigma). Ilościowy udział poszczególnych form lizozymu określono densytometrycznie z zastosowaniem programu TotalLab firmy Nonlinear Dynamics Ltd.

Tabela 1. Charakterystyka modyfikowanego preparatu lizozymu

Preparat lizozymu	Aktywność hydrolityczna (U/mg)	Powierzchniowa hydrofobowość	Udział monomeru (%)	Udział dimeru (%)	Udział trimeru (%)
Monomer	17730 ^a	877 ^b	100 ^a		
LTC	1060 ^b	40520 ^a	30,6 ^b	36,2 ^a	33,2 ^a

2.4. Oznaczenie hydrofobowości powierzchniowej

Oznaczenie hydrofobowości powierzchniowej wykonano przy użyciu ANS (kwas 8- anilino 1-naftaleno-sulfonowy) Sigma stosując Luminiscence Spectrometer LS 55 (Perkin Elmer), przy długości fali wyjścia $\lambda=390$ nm i fali emitera $\lambda=470$. Roztwory lizozymu (0.01%) i jego rozcieńczenia przygotowano w buforze fosforanowym o pH 6,0. Z każdego z rozcieńczeń pobrano 3 ml i dodano 15 μ l ANS rozpuszczonego w metanolu. Po upływie 15 s mierzono intensywność fluorescencji. Wartość oznaczonej hydrofobowości powierzchniowej jest równa współczynnikowi nachylenia prostej wyrażającej zależność intensywności fluorescencji od stężenia białka.

2.5. Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej lizozymu

W badaniach mikrobiologicznych zastosowano bakterie Gram-ujemne, *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 /NCTC 3756/ i *Proteus mirabilis* PCM 543 /NTCT/ pochodzące z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Z 24 godzinnej hodowli bulionowej przygotowano zawiesinę bakterii w NaCl 0,85% Medium (Biomérieux), o gęstości 0,5 w skali McFarlanda przy zastosowaniu aparatu Densimat (Biomérieux). Roztwory lizozymu 5 mg/mL przygotowano w sterylnej wodzie. Do probówek zawierających 4 ml bulionu i 5 ml roztworów monomeru lub modyfikowanych preparatów lizozymu dodano 1ml rozcieńczenia zawiesiny bakteryjnej tak, że wyjściowa liczba bakterii wynosiła 10^4 jtk/ml. Próby inkubowano w temperaturze 30°C i 37°C przez okres 48 godzin. Podczas inkubacji, w wyznaczonych odstępach czasowych (wyjściowo – 0, 1, 6, 24 i 48 godzinach) oznaczono liczbę badanych bakterii klasyczną metodą zalewową na podłożu *Pseudomonas* Agar Base i McConkey (Oxoid). Wyniki podano w jtk/ml. Kontrolę stanowiły próby pozbawione roztworów lizozymu.

2.6. Analiza statystyczna

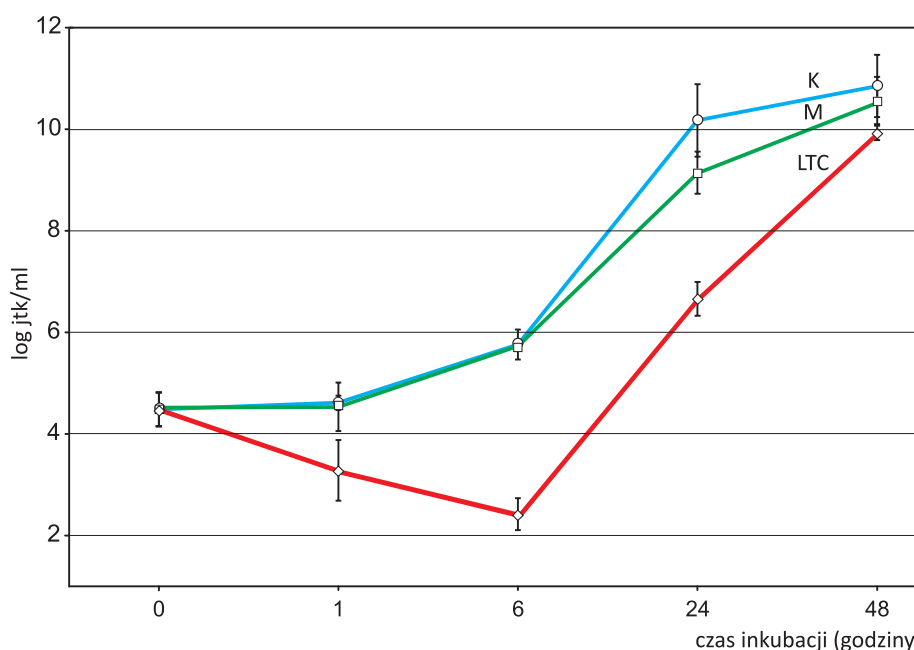
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu programu STATISTICA PL v. 7,0. Zastosowano analizę wariancji ANOVA.

3. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

W badaniach porównano efektywność przeciwbakteryjnego działania monomeru lizozymu i jego preparatu uzyskanego w wyniku modyfikacji termiczno-chemicznej w stosunku do bakterii gram-ujemnych. Charakterystykę modyfikowanego enzymu przedstawiono w Tabeli 1, gdzie podano aktywność hydrolityczną, hydrofobowość powierzchniową oraz udział form oligomerycznych.

Preparat uzyskany w wyniku modyfikacji termiczno-chemicznej charakteryzował się znacznie niższą aktywnością hydrolityczną w porównaniu z monomerycznym lizozymem. Obniżenie aktywności hydrolitycznej lizozymu obserwowano również w badaniach dotyczących modyfikacji termicznej i membranowej enzymu [10, 17, 18]. Przeprowadzona elektroforeza wykazała udział w modyfikowanym preparacie lizozymu form oligomerycznych, w tym dimeru lizozymu (36,2%). Stanowi to potwierdzenie rezultatów wcześniejszych badań, wskazujących na powstawanie form oligomerycznych, w wyniku przeprowadzonych modyfikacji enzymu. W badaniach dotyczących modyfikacji termicznej lizozymu wykazano, że udział formy dimerycznej w modyfikowanym enzymie zależy od warunków modyfikacji, takich jak pH i temperatura jak i koncentracji enzymu [17].

Wynikiem przeprowadzonej modyfikacji termiczno-chemicznej była również zmiana właściwości hydrofobowych enzymu. Ibrahim i in. [10] podaje, że w czasie modyfikacji termicznej następuje zmiana struktury cząsteczki enzymu, rozpad wiązań dwusiarczkowych, pojawienie się wolnych grup sulfhydrylowych i wyeksponowanie na zewnątrz



Rysunek 1. Wpływ lizozymu i czasu inkubacji na wzrost bakterii *Pseudomonas fluorescens*

cząsteczki reszt tryptofanowych a w efekcie wzrost hydrofobowości powierzchniowej.

W przeprowadzonych badaniach wykazano zróżnicowane działanie monomeru i modyfikowanego lizozymu wobec bakterii *Pseudomonas fluorescens* (Rys. 1). Nie obserwowano efektywnego przeciwbakteryjnego działania monomeru lizozymu w stosunku do badanego szczepu *Pseudomonas fluorescens*. Zarówno w próbie z dodatkiem monomeru lizozymu, jak również w próbie bez dodatku enzymu w czasie inkubacji obserwowano stopniowy wzrost bakterii z poziomu 10^4 jtk/ml do 10^{11} jtk/ml. W badanym okresie nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy liczbą komórek bakterii w próbie z dodatkiem monomeru lizozymu i próbie kontrolnej (Tab. 2). W próbie z dodatkiem modyfikowanego lizozymu w początkowym okresie inkubacji stwierdzono obniżenie liczby bakterii do poziomu 10^2 jtk/ml

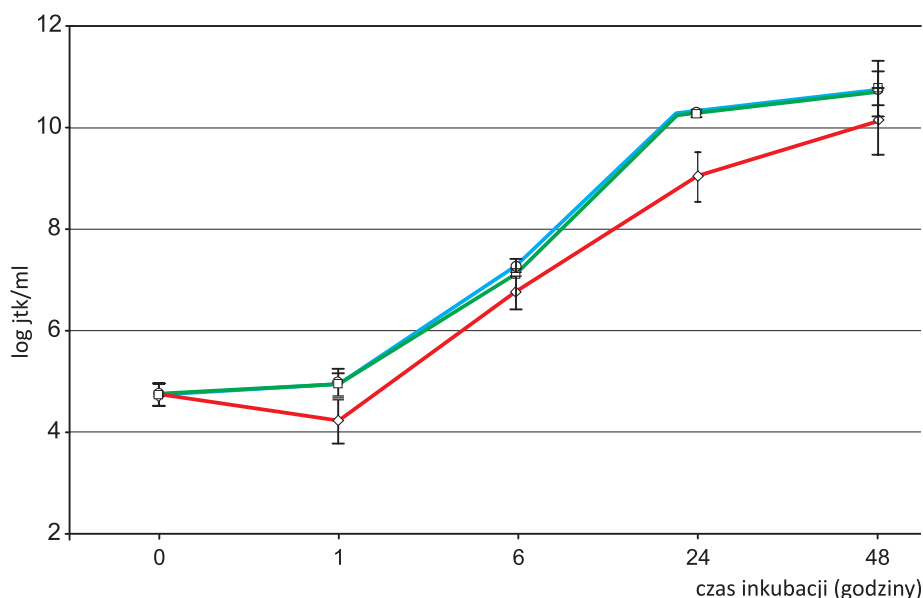
a następnie obserwowano istotny wzrost liczby bakterii. Po 6 godzinach inkubacji liczba bakterii w próbie z dodatkiem modyfikowanego enzymu była o 3,4 cyklu logarytmicznego niższa w porównaniu z liczbą bakterii w próbie kontrolnej (Tab. 2).

Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują również na zróżnicowany wpływ poszczególnych form lizozymu na wzrost bakterii *Proteus mirabilis*. W badanym okresie inkubacji we wszystkich próbach stwierdzono wzrost liczby bakterii, najszybszy w próbie bez dodatku enzymu (Rys. 2). W próbie z dodatkiem modyfikowanego enzymu, po 1 godzinie inkubacji stwierdzono obniżenie liczby bakterii z poziomu 10^5 jtk/ml do 10^4 jtk/ml. Po 24 godzinnej inkubacji próby zawiesiny bakterii z dodatkiem modyfikowanego enzymu, liczba komórek bakterii wynosiła 10^8 jtk/ml i była niższa o 1,03 cyklu logarytmicznego w porównaniu z liczbą bakterii w próbie kontrolnej. W badanym okresie in-

Tabela 2. Wpływ działania monomeru i modyfikowanego lizozymu na wzrost *Pseudomonas fluorescens* i *Proteus mirabilis*

Próba	Log jtk/ml \pm SD									
	0 godz.		1 godz.		6 godz.		24 godz.		48 godz.	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>										
K	4,49 ^{aA}	$\pm 0,21$	4,62 ^{bA}	$\pm 0,09$	5,76 ^{bB}	$\pm 0,18$	10,18 ^{cC}	$\pm 0,45$	10,18 ^{bD}	$\pm 0,39$
M	4,49 ^{aA}	$\pm 0,21$	4,54 ^{bA}	$\pm 0,30$	5,73 ^{bB}	$\pm 0,03$	9,15 ^{bC}	$\pm 0,26$	10,55 ^{bD}	$\pm 0,30$
LTC	4,49 ^{aA}	$\pm 0,21$	3,29 ^{aB}	$\pm 0,38$	2,42 ^{aC}	$\pm 0,20$	6,66 ^{aD}	$\pm 0,21$	9,95 ^{aE}	$\pm 0,10$
<i>Proteus mirabilis</i>										
K	4,68 ^{aA}	$\pm 0,13$	4,89 ^{bB}	$\pm 0,17$	7,08 ^{cC}	$\pm 0,08$	9,91 ^{bD}	$\pm 0,04$	10,37 ^{bE}	$\pm 0,32$
M	4,68 ^{aA}	$\pm 0,13$	4,87 ^{bB}	$\pm 0,13$	6,95 ^{bC}	$\pm 0,05$	9,88 ^{bD}	$\pm 0,03$	10,37 ^{bE}	$\pm 0,20$
LTC	4,68 ^{aA}	$\pm 0,13$	4,18 ^{aA}	$\pm 0,26$	6,58 ^{aC}	$\pm 0,19$	8,73 ^{aD}	$\pm 0,29$	9,76 ^{aE}	$\pm 0,39$

a-c, A-E różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie dla wartości średnich przy $p \leq 0.05$



Rysunek 2. Wpływ lizozymu i czasu inkubacji na wzrost bakterii *Proteus mirabilis*

kubacji nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy liczbą bakterii w próbie kontrolnej i próbie z dodatkiem monomeru lizozymu. Można stwierdzić, że wrażliwość badanego szczepu *Proteus mirabilis* na działanie modyfikowanego enzymu jest niższa, aniżeli *Pseudomonas fluorescens*.

Uzyskane wyniki potwierdzają ograniczone inhibujące działanie antybakteryjne monomeru lizozymu na wzrost bakterii gramujemnych. Aktywność antybakteryjna natywnej formy lizozymu związana jest z aktywnością enzymatyczną i skierowana przede wszystkim w stosunku do bakterii gramododatnich [3, 7]. Przeprowadzone badania wskazują, że pomimo znacznego obniżenia aktywności hydrolitycznej enzymu po modyfikacji, w porównaniu z monomere lizozymu, wykazuje efektywniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii gramujemnych. Wcześniejsze badania wskazują, że wzrost aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do bakterii gramujemnych nie jest związany ze spadkiem aktywności wobec bakterii gramododatnich [10]. Można stwierdzić, że antybakteryjne działanie lizozymu oparte jest na zróżnicowanych mechanizmach, zależne nie tylko od aktywności hydrolitycznej, ale

również właściwości hydrofobowych i kationowych enzymu [10, 11, 12]. Zastosowana modyfikacja pozwala rozszerzyć działanie lizozymu na bakterie gramujemne. Taki efekt działania enzymu uzyskano również w badaniach dotyczących wpływu modyfikacji membranowej, termicznej i chemicznej na działanie lizozymu [11, 19].

4. WNIOSKI

1. Efektem przeprowadzonej modyfikacji termiczno-chemicznej lizozymu jest obniżenie aktywności hydrolitycznej enzymu, wzrost hydrofobowości powierzchniowej i powstanie form oligomerycznych.
2. W wyniku modyfikacji uzyskano wzrost antybakteryjnego oddziaływania enzymu w stosunku do badanych szczepów bakterii gramujemnych: *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas fluorescens*.
3. Zmiana struktury i właściwości cząsteczki wpływa na przeciwbakteryjne działanie enzymu wobec bakterii gramujemnych: *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas fluorescens*.

LITERATURA

- [1] Nakamura S., Kato A., Kobayashi K.: New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. J. Agric. Food Chem., 39, 647-649, 1991.
- [2] Trziszka T., Kopeć W.: Lizozym i jego charakterystyka. Cz.1. Przem. Spoż., 1, 41-43, 1997.
- [3] Leśniewski G., Kijowski J.: Lysozyme W: Bioactive egg compounds. Berlin, Springer, 2007, 33-42.
- [4] Cunningham F.E., Proctor V.A., Goetsch S.J.: Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. World's Poult. Sci. J., 47, 141-163, 1991.
- [5] Gill A.O., Holley R.A.: Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees. Int. J. Food Microbiol., 80, 251-259, 2003.
- [6] Malicki A., Jarmoluk A., Brużewicz S.: Effect of sodium lactate used alone or in combination with lysozyme on the physico-chemical and microbiological properties of steamed sausage stored under refrigeration. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 48, 47-51, 2004.
- [7] Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E.G.R., Michiels C.W.: Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme derived peptides under high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol., 67, 339-344, 2001.
- [8] Nattres F.M., Baker L.B.: Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. Int. J. Food Microbiol., 85, 259-267, 2003.
- [9] Ntzimani A.G., Giatrakou V.I., Savvaidis I.N.: Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C. Microbiological and sensory evaluation. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 11, 180-196, 2010.
- [10] Ibrahim H.R., Higashiguchi S., Juneja L.R., Kim M., Yamamoto T.: A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. J. Agric. Food Chem., 44, 1416-1423, 1996.
- [11] Ibrahim H.R.: On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen egg-white lysozyme: A conformation-dependent activity. Nahrung, 42, 187-193, 1998.

- [12] Düring K., Porsch P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W.: The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. *FEBS Lett.* 449, 93-100, 1999.
- [13] Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of lysozyme modified by the membrane technique. *EJPAU, Ser. Food Sci. Technol.*, 6, 2, 2003.
- [14] Leśnierowski G.: Otrzymywanie lizozymu z białka jaja kurzego metodami krystalizacji, ultrafiltracji oraz z użyciem wymiennicza jonowego. Praca doktorska. AR, Poznań, 1997.
- [15] Leśnierowski G., Kijowski J.: Methods of investigating enzymatic activity and quantitative determination of lysozyme from hen egg white. *Przem. Spoż.*, 12, 476-481, 1995.
- [16] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-688, 1970.
- [17] Lesnierowski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.: Thermally and chemical thermally modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World's Poultry Sci. J.*, 60, 303-309, 2004.
- [18] Leśnierowski G., Kijowski J., Cegielska-Radziejewska R.: Ultrafiltration - modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44, 305-311, 2009.
- [19] Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.*, 228, 841-845, 2009.