

Jagoda Ambrozik-Haba*

Karolina Semeriak**

Anna Zimoch***

Andrzej Jarmoluk****

Badania nad wykorzystaniem bioaktywnych substancji izolowanych z jaj jako przeciwutleniacze i konserwanty

Wstęp

Przemysł spożywczy co roku ponosi milionowe, jeśli nie miliardowe, straty generowane w wyniku psucia się produktów żywnościowych. Wzrost świadomości konsumentów natomiast skutkuje ich sprzeciwem wobec dodatku substancji syntetycznych do żywności, co znacznie zawęża producentom wybór asortymentowy wśród substancji konserwujących i antyoksydantów. Dlatego poszukiwane są alternatywne źródła konserwantów i przeciwutleniaczy w postaci naturalnych substancji przedłużających okres przydatności do spożycia oraz zapewniających wysoki stopień bezpieczeństwa żywności i zdrowia konsumenta.

Jajo jest największą komórką zawierającą wszystkie niezbędne substancje do rozwoju nowego życia. Od tysięcy jaja stanowią ważne źródło pożywienia. Dlatego już we wczesnym etapie rozwoju biochemii starano się zidentyfikować skład jaja i poznać funkcje poszczególnych jego komponentów. Zainteresowanie tą tematyką nie minęło do dzisiaj.

* Mgr inż., Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, jagoda.ambrozik@up.wroc.pl

** Mgr inż., Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ksemeriak@gmail.com

*** Dr inż., Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, anna.zimoch@up.wroc.pl

**** Dr hab. inż., Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, andrzej.jarmoluk@up.wroc.pl

Jaja kurze są źródłem wielu cennych substancji biologicznie aktywnych, w tym m.in. lizozymu i cystatyny. Lizozym (muramidaza) jest to białko globularne, o punkcie izoelektrycznym 10,7-11,0 i masie 14,4 kDa [Ratajczak, 2004, s. 40]. Wykazuje działanie destrukcyjne na ścianę komórkową bakterii, gdyż rozkłada wiązania glikozydowe między N-acetylloglukozaminą, a kwasem N-acetylmuraminowym w polisacharydach budujących ściany komórkowe bakterii, co czyni go substancją bakteriobójczą. Działanie lityczne lizozymu prowadzi do powstawania antygenowych fragmentów glikopeptydowych, które inicjują kształtowanie się immunoglobulin, co znalazło zastosowanie przy produkcji szczepionek. Poza tym muramidaza posiada zdolność tworzenia nierozpuszczalnych kompleksów z DNA wirusów, przez co zachodzi ich inaktywacja. Lizozym wykazuje silne działanie neutralizujące wobec kwaśnych substancji wytwarzanych w procesach zapalnych [Trziszka, 2000, s. 159; Dembrzyński, 2009, s. 5]. Cystatyna jest białkiem termo- i pH-stabilnym, charakteryzującym się niską masą cząsteczkową (12,7kDa). Jest pierwszym i najlepiej poznanym inhibitorem proteaz cysteinowych rodziny papainowej. Cystatyna chroni przed bakteryjnymi i wirusowymi proteazami cysternowymi, hamując ich aktywność [Gołąb, 2005, s. 1001].

Celem badań było określenie oraz porównanie aktywności przeciwutleniającej i antydrobnoustrojowej czystego lizozymu oraz mieszaniny lizozym-cystatyna.

1. Materiały i metodyka badań

Oceniono właściwości biologiczne następujących preparatów: lizozymu o aktywności wyjściowej 1680 U/mg białka (OVOPOL) oraz mieszaniny lizozym-cystatyna odpowiednio o aktywnościach: lizozym – 1410 U/mg białka, cystatyna – 3,77 U/mg białka.

Układ doświadczenia stanowiły wodne roztwory eksperymentalnych preparatów na czternastu poziomach zmienności: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4% oraz 5% (m/m).

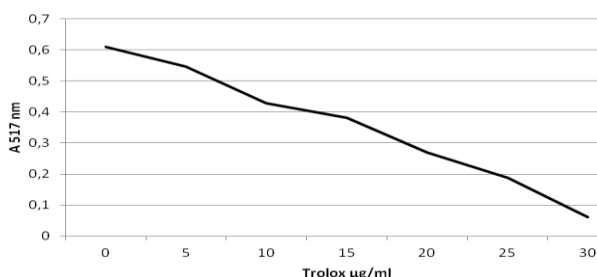
1.1. Oznaczenie właściwości przeciwutleniających jako zdolności wymiatania wolnych rodników DPPH (Yamaguchi i wsp., 1998 – modyfikacja własna)

Zdolność wymiatania wolnych rodników oznaczono wykorzystując etanolowy roztwór rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH). Do 2-krotnie rozcieńczonego w wodzie destylowanej roztworu eksperymen-

talnych preparatów, dodawano 0,15 mM roztwór alkoholowego DPPH, w proporcji 1:1. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 517$ nm.

Aktywność przeciwutleniającą wyliczano z krzywej wzorcowej, wyrażonej w [μg Troloxu] niezbędnych do neutralizacji 0,15 mM roztworu wolnych rodników DPPH (rys. 1). Właściwości antyoksydacyjne wyrażono w μg Troloxu na ml badanego roztworu [Yamaguchi, 1998, s. 1201].

Rysunek 1. Zależność wartości absorbancji przy długości fali 517 nm od zawartości Troloxu [$\mu\text{g}/\text{ml}$]



Źródło: Opracowanie własne.

1.2. Oznaczenie aktywności antydrobnoustrojowych wobec bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus*, bakterii Gram-ujemnych *Pseudomonas fluorescens*

50 μl zawiesiny drobnoustrojów o gęstości 1×10^7 kom./ml wprowadzono do studzienki w płytce do mikrotestów zawierającej 250 μl roztworu eksperymentalnych preparatów. Następnie mierzono gęstość optyczną (OD) próbek, przy długości fali 550nm, przez 72h w 20 minutowych odstępach czasu. Oznaczenie wykonano przy wykorzystaniu aparatu Bioscreen C. Przy wyznaczaniu gęstości optycznej dokonuje się pomiaru zmętnienia zawiesiny bakteryjnej. Aparat Bioscreen C mierzy światło tracone na skutek rozproszenia przez drobnoustroje zawarte w naczynku pomiarowym. Ilość światła rozproszonego jest proporcjonalna do liczby komórek.

Wyniki badań poddano analizie wariancji jednoczynnikowej, stosując program Statistica wersja 6.0. Wyznaczono grupy jednorodne dla efektów głównych, wykorzystując średnie brzegowe (test Duncana) dla $p \leq 0,05$.

2. Omówienie i dyskusja wyników

W przypadku obu ocenianych preparatów aktywność antyoksydacyjna znacznie rosła wraz ze wzrostem stężenia lizozymu lub mieszaniny lizozym-cystatyna w roztworze (tab. 1).

Tablica 1. Wpływ dawki białka na zmienność aktywności przeciwutleniającej [µg Trolox/ml]

Stężenie białka [%]	Lizozym	Lizozym-cystatyna
0,1	6,038 ^a	5,975 ^a
0,2	7,233 ^b	6,478 ^b
0,3	8,868 ^c	7,107 ^c
0,4	10,440 ^d	7,862 ^d
0,5	11,447 ^e	9,497 ^e
0,6	11,792 ^f	10,755 ^f
0,7	12,233 ^g	12,260 ^g
0,8	12,673 ^h	12,893 ^h
0,9	13,176 ⁱ	14,214 ⁱ
1,0	14,245 ^j	15,283 ^j
2,0	15,849 ^k	21,635 ^k
3,0	21,761 ^l	24,403 ^l
4,0	23,050 ^m	24,906 ^m
5,0	24,560 ⁿ	39,874 ⁿ

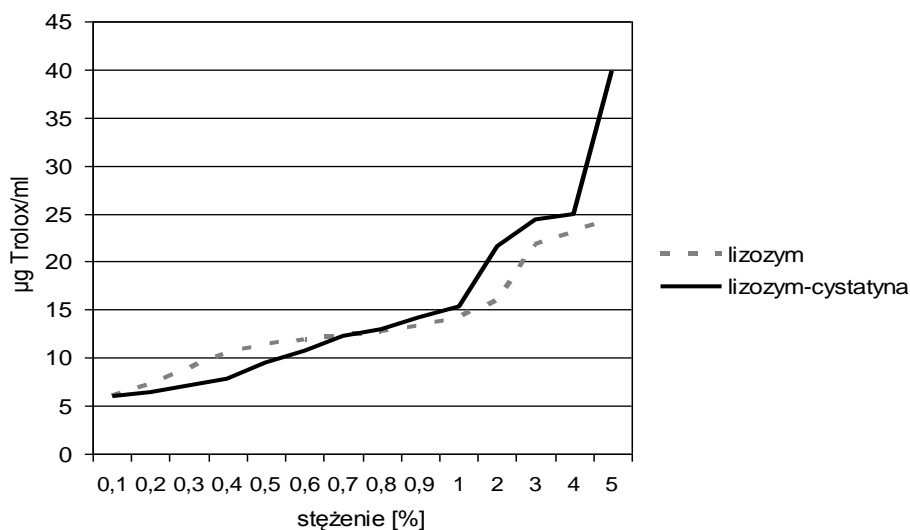
Źródło: Opracowanie własne.

Zauważono, że w wyższych stężeniach (0,9% - 5%) wyższą aktywnością przeciwutleniającą charakteryzował się czysty lizozym. Przy poziomie 0,8% obserwowano wyrównanie zdolności do wymiatania wolnych rodników DPPH dla eksperymentalnych preparatów. Zaś w niższych stężeniach (0,7%-0,1%) aktywność mieszaniny lizozym-cystatyna odpowiadała większej ilości Troloxu w porównaniu oznaczanej dla próbek z czystym lizozymem (rys. 2).

W przypadku oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec *Staphylococcus aureus* wyznaczono minimalne stężenia hamujące (MIC) badanych preparatów. MIC definiujemy jako najmniejsze stężenie substancji bakteriobójczej, wyrażone w mg/l, hamujące wzrost drobnoustrojów. Dla czystego lizozymu MIC wobec *Staphylococcus aureus* wynosi 2000mg/l, a mieszaniny lizozym-cystyna 3000mg/l. Zaobserwowano również, że faza

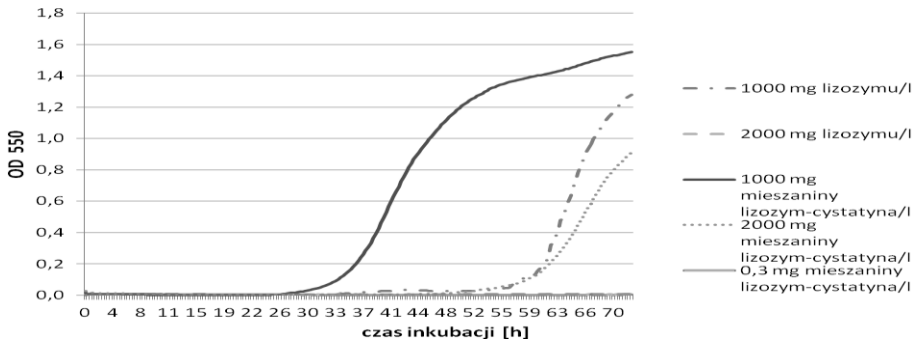
intensywnego wzrostu drobnoustrojów (trofofaza) przy zastosowaniu mieszanki lizozym-cystatyna rozpoczęła się już w 27 godzinie inkubacji, przy dodatku preparatu w ilości 1000mg/l. Natomiast w przypadku zastosowania czystego lizozymu, w tej samej ilości, czyli 1000mg/l, początek trofofazy przypadł na 35 godzinę procesu (rys. 3). Bera i wsp. stwierdzili działanie inhibujące wobec *Staphylococcus aureus* roztworu lizozymu o stężeniu 4mg/ml [Bera, 2007, s. 280]. Natomiast Pellegrini z zespołem na podstawie swoich badań wywnioskowali o braku wpływu lizozymu na wzrost *Staphylococcus aureus* nawet przy zastosowaniu tego białka na poziomie 10mg/ml [Pellegrini, 1997, s. 372]. Węsierska i wsp. badając działanie antagonistyczne czystej cystatyny (500mg/l) wobec *Staphylococcus aureus* zaobserwowali całkowite zahamowanie wzrostu tej bakterii [Węsierska, 2005, s. 50].

Rysunek 2. Zależność aktywności przeciwutleniającej od stężenia lizozymu i mieszanki lizozym-cystatyna



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 3. Zależność gęstości optycznej od dawki lizozymu i mieszaniny lizozym-cystatyna oraz czasu inkubacji wobec *Staphylococcus aureus*



Źródło: Opracowanie własne.

Tablica 2. Zależność gęstości optycznej od poziomu dodatku lizozymu oraz czasu inkubacji wobec *Pseudomonas fluorescens*

Stężenie lizozym [%]	Czas inkubacji [h]				
	1	12	24	48	72
1	0,122 ^a	0,749 ^a	0,927 ^a	1,137 ^a	1,142 ^a
2	0,119 ^a	0,786 ^b	0,914 ^b	0,995 ^b	1,013 ^b
3	0,121 ^a	0,771 ^c	0,896 ^c	0,975 ^c	1,069 ^c
4	0,121 ^a	0,753 ^d	1,000 ^d	1,184 ^d	1,216 ^d
5	0,142 ^b	0,762 ^e	0,889 ^e	0,916 ^e	0,963 ^e

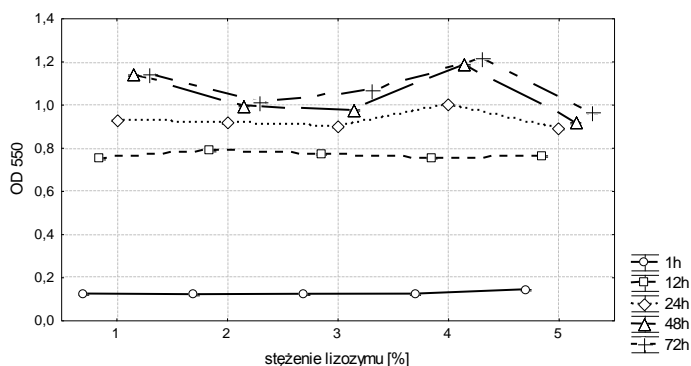
a, b, c, d, e – grupy jednorodnie przy poziomie istotności $p < 0,05$

Źródło: Opracowanie własne.

Odnotowano wpływ poziomu dodatku lizozymu na gęstość optyczną, a co za tym idzie na liczbę komórek *Pseudomonas fluorescens*. Jedynie po pierwszej godzinie inkubacji w próbkach zawierających lizozym w stężeniu od 1% do 4% nie wykazano zmienności (tab. 2). Na podstawie wielkości średnich ważonych można zaobserwować większą liczbę bakterii przy 1% i 4% dodatku lizozymu w odniesieniu do pozostałych próbek. Natomiast warianty sporządzane z 5% zawartością lizozymu cechowała stosunkowo niższa gęstość optyczna. W miarę upływu czasu inkubacji wzrastała ilość oznaczanych komórek *Pseudomonas fluorescens*. Różnice w kolejnych odczy-

tach gęstości optycznej były coraz mniejsze wraz z postępowaniem procesu (rys. 4). Pellegrini i wsp. stwierdzili, że lizozym na poziomie 10mg/ml powoduje dwukrotne zmniejszenie liczby komórek *Pseudomonas fluorescens* [Pellegrini, 1997, s. 372]. Natomiast Payne i wsp. odnotowali, że lizozym w stężeniach (100 -200 µg/ml) nie ma wpływu na wzrost bakterii *Pseudomonas fluorescens* [Payne, 1994, s. 62].

Rysunek 4. Zmienność średnich ważonych gęstości optycznej w zależności od poziomu dodatku lizozymu i czasu inkubacji wobec *Pseudomonas fluorescens*



Źródło: Opracowanie własne.

Tablica 3. Zależność gęstości optycznej od poziomu dodatku mieszaniny lizozym-cystatyna oraz czasu inkubacji wobec *Pseudomonas fluorescens*

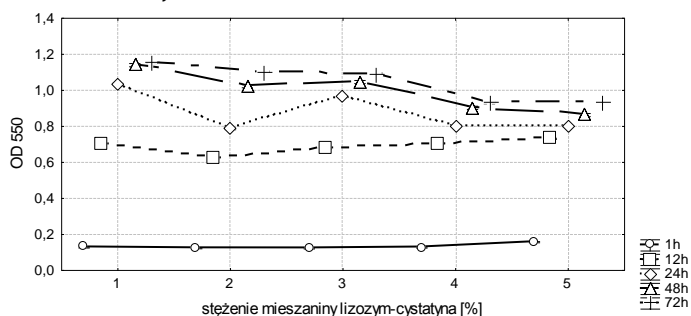
Stężenie mieszaniny lizozym-cystatyna [%]	czas inkubacji [h]				
	1	12	24	48	72
1	0,128 ^a	0,747 ^a	1,036 ^e	1,140 ^a	1,152 ^a
2	0,123 ^a	0,620 ^b	0,784 ^b	1,023 ^b	1,103 ^b
3	0,122 ^a	0,675 ^c	0,963 ^c	1,046 ^c	1,093 ^c
4	0,127 ^a	0,705 ^d	0,805 ^d	0,903 ^d	0,928 ^d
5	0,127 ^a	0,731 ^e	0,801 ^e	0,863 ^e	0,937 ^e

Źródło: Opracowanie własne.

Podobnie jak w przypadku lizozymu, poziom dodatku mieszaniny lizozym-cystatyna wpływa istotnie na zmienność gęstości optycznej próbek zoli zaszczipianych bakterią Gram-ujemną. Wyjątek stanowił jedynie od-

czyt po pierwszej godzinie inkubacji, gdzie nie zaobserwowano różnic pomiędzy próbkami zawierającymi różne stężenia eksperymentalnej mieszaniny (od 1% do 5%) (tab. 3). Analizując wielkości średnich ważonych gęstości optycznej [OD 550] można zauważyć, że najniższą liczbą komórek cechowały się próbki z najwyższą zawartością mieszaniny lizozym-cystatyna (LC) np. dla 48 godziny inkubacji OD 550 dla 5% roztworu wynosiło 0,863, zaś dla wariantu z 3% dodatkiem tej mieszaniny wielkość OD 550 = 1,046. Natomiast roztwór mieszaniny LC na poziomie 1% charakteryzował się największą liczbą komórek *Pseudomonas fluorescens* we wszystkich analizowanych czasach inkubacji.

Rysunek 5. Zmienność średnich ważonych gęstości optycznej w zależności od poziomu dodatku mieszaniny lizozym-cystatyna i czasu inkubacji wobec *Pseudomonas fluorescens*



Źródło: Opracowanie własne.

Zakończenie

Na podstawie przedstawionych wyników badań stwierdzono silne działanie przeciwartłeniające ocenianych preparatów. Nie wykazano różnic pomiędzy zdolnością wymiatania wolnych rodników oznaczanych dla zoli zawierających czysty lizozym lub mieszaniny lizozym-cystatyna. Badania potwierdziły większą zdolność inhibującą lizozymu wobec bakterii Gram-dodatnich niż bakterii Gram-ujemnych. Czysty lizozym charakteryzował się niższą wartością MIC (2000mg/l) wobec *Staphylococcus aureus* w porównaniu do mieszaniny lizozym-cystatyna (MIC 3000mg/l). W przypadku *Pseudomonas fluorescens* oceniane substancje bioaktywne i ich mieszanina nie wykazały zdolności całkowitego hamowania wzrostu tej bakterii, lecz jedynie zmniejszyły zdolność jej wzrostu.

Praca wykonana w ramach projektu pt. „Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA)”, finansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013.

Literatura

1. Bera A., Biswas R., Herbert S., Kulauzovic E., Weidenmaier C., Peschel A., Gotz F. (2007), *Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in Staphylococcus aureus*, "Journal of Bacteriology", nr 189/1.
2. Dembczyński R., Białas W., Jankowski T. (2009), *Wykorzystanie dwufazowej ekstrakcji wodnej do separacji lizozymu z białka jaja kurzego*, „ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość”, nr 5 (66).
3. Gołąb K., Warwas M. (2005), *Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania*, „Adv. Clin. Exp. Med.”, nr 14/ 5.
4. Payne K.D., Oliver S.P., Davidson P.M. (1994), *Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria*, "Journal of Food Protection", nr 57.
5. Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Klauser S., Hunziker P., von Fellenberg P. (1997), *Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme*, "Journal of Applied Microbiology" nr 82.
6. Ratajczak P., Białas W., Dembczyński R., Grajek W., Jankowski T. (2004), *Ekstrakcja dwufazowa lizozymu z białka jaja kurzego*, „ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość”, nr 3 (40).
7. Trziszka T. (2000), *Jajczarstwo – Nauka, Technologia, Jakość*, Wyd. AR, Wrocław.
8. Węsierska E., Saleh Y., Trziszka T., Kopeć W., Siewinski M., Korzekwa K. (2005), *Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin*, "World Journal of Microbiology & Biotechnology", nr 21.
9. Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao, J. (1998), *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*, "Bioscience, Biotechnology and Biochemistry", nr 62.

Streszczenie

Obecnie poszukiwane są naturalne substancje konserwujące, które pozwoliłyby, by obniżyć koszty ponoszone przez producentów żywności w wyniku psucia się produktów żywnościowych oraz zostałyby zaakceptowane przez konsumentów, którzy niejednokrotnie unikają towarów zawierających syntetyczne

dotatki. Surowiec jajczarski coraz częściej uwzględniany jest nie tylko jako składnik diety, ale również jako surowiec do pozyskiwania cennych substancji bioaktywnych, np. lizozymu lub cystatyny. W pracy przebadano czysty lizozym oraz mieszaninę lizozym-cystatyna pod kątem ich funkcji biologicznych, tj. aktywności przeciwutleniających i antydrobnoustrojowych. Właściwości przeciwutleniające oznaczono jako zdolność wymiatania wolnych rodników DPPH. O właściwościach przeciwdrobnoustrojowych natomiast wnioskowano na podstawie pomiaru gęstości optycznej. Stwierdzono silne i porównywalne działanie antyoksydacyjne obu ocenianych preparatów. Lizozym i mieszanka lizozym-cystatyna wykazały silniejsze działanie antagonistyczne wobec bakterii Gram-dodatniej *Staphylococcus aureus* niż bakterii Gram-ujemnej *Pseudomonas fluorescens*.

Słowa kluczowe

lizozym, cystatyna, aktywność przeciwutleniająca, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*

Antimicrobial and antioxidant properties of bioactive substances isolated from eggs (Summary)

Currently are looking for natural preservatives, which allowed to reduce the costs for food producers as a result of deterioration of products of food and would be accepted by consumers who often avoid products that contain synthetic additives. Eggs are taken into account, not only as a component of the diet, but also as a raw material for obtaining valuable bioactive substances such as lysozyme or cystatin. The study examined pure lysozyme and a mixture of lysozyme-cystatin in terms of their biological properties such as antioxidant and antimicrobial activity. Antioxidant activity was marked ability of as free radical scavenging DPPH. About antimicrobial properties claimed by measuring the optical density. Noted strong and comparable to the antioxidant activity of both tested preparations. Lysozyme and mixture lysozyme-cystatin showed larger antagonist activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* than Gram-negative bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

Keywords

lysozyme, cystatin, antioxidant properties, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*