UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Tianyu Yang

Identyfikacja i ocena fizykochemiczna lizozymu po jego termicznej modyfikacji promieniowaniem mikrofalowym w warunkach utleniających

Rozprawa doktorska wykonana
W Katedrze Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Promotor:
Prof. UPP dr hab. Grzegorz Leśnierowski

Poznań 2021

Streszczenie

Identyfikacja i ocena fizykochemiczna lizozymu po jego termicznej modyfikacji promieniowaniem mikrofalowym w warunkach utleniających

Występujący w przyrodzie lizozym natywny jest białkiem enzymatycznym o charakterze ochronnym obecnym w większości organizmów żywych. Jego biologiczna funkcja polega na niszczeniu bakterii Gram-dodatnich wskutek rozbicia wiązania glikozydowego β-1,4 występującego w błonie komórkowej bakterii. Wysoka przeciwbakteryjna efektywność działania enzymu przy jednoczesnym braku oddziaływań toksycznych sprawia, że lizozym wykazuje znaczny potencjał aplikacyjny, który już znalazł szerokie praktyczne wykorzystanie. Bakterie Gram-ujemne ze względu na specyficzną budowę swej ściany komórkowej nie są aż tak wrażliwe jak Gram-dodatnie na działanie natywnego enzymu. Jednak można to zmienić w wyniku różnego rodzaju jego modyfikacji. Opracowane dotąd metody modyfikujące enzym, głównie chemiczne i fizykochemiczne, umożliwiają zwiększenie skuteczności jego przeciwdrobnoustrojowego działania, ale potencjał lizozymu jest zdecydowanie większy stąd nadal poszukuje się nowych rozwiązań pozwalających na jego uwolnienie.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wykorzystanie promieniowania mikrofalowego do opracowania nowej termicznej metody modyfikacji lizozymu w warunkach utleniających oraz ocena wybranych właściwości fizykochemicznych preparatów otrzymanych po modyfikacji. Założono także przeprowadzenie testów przeciwbakteryjnego działania zmodyfikowanego enzymu.

Prezentowana rozprawa doktorska stanowi cykl pięciu jednorodnych tematycznie publikacji, w którego skład wchodzą:

(1) Leśnierowski G., Yang T. Lysozyme and its modified forms: a critical appraisal of selected properties and potential. Trends in Food Science & Technology, 107, 333-342. (IF: 12.563, Punkty wg MEiN: 200)

(2) Yang, T., Leśnierowski, G. Thermal modification of hen egg white lysozyme using microwave treatment. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 19(2), 149–157. (Punkty wg MEiN: 40)

(3) Yang, T., Leśnierowski, G. Changes in selected physicochemical properties of lysozyme modified with a new method using microwave field and oxidation. PLoS ONE 14(2). (IF: 2.766, MES /MEiN point: 100)

(4) Yang, T., Leśnierowski, G. Microwave Modification as an Excellent Way to Produce

Unique Lysozyme with Potential for Food and Human Health. Foods, 10, 1319.
(IF: 4.350, Punkty wg MEiN: 70)

(5) Leśnierowski, G., Yang, T., Cegielska-Radziejewska, R. Unconventional effects of long-term storage of microwave-modified chicken egg white lysozyme preparations. Scientific Reports 11, 10707 (2021).
(IF: 4.379, Punkty wg MEiN: 140)

Publikacja (1) stanowi wprowadzenie do badań, natomiast artykuły (2), (3) i (4) to publikacje przedstawiające wyniki podstawowych etapów badań obejmujących opracowanie mikrofalowej modyfikacji enzymu oraz ocenę właściwości fizykochemicznych otrzymanych preparatów, natomiast publikacja (5), przedstawia niekonwencjonalne zmiany jakie wystąpiły w tych preparatach po ich długotrwałym przechowywaniu w warunkach chłodniczych.

Publikacja (1) zawiera podstawowe informacje o lizozymie. Dokonany przegląd literatury przedmiotowej przedstawiony w formie dyskusji charakteryzuje enzym natywny i zmodyfikowany, przedstawia jego strukturę, źródła występowania i możliwości produkcji, omawia sposoby i skutki modyfikacji lizozymu oraz jego potencjał aplikacyjny.

Pierwszy etap badań obejmował wstępne prace proceduralne dotyczące wykorzystania promieniowania mikrofalowego jako nowego źródła energii dla termicznej modyfikacji lizozymu. Opracowano bazowe warunki takiej modyfikacji i oceniono ich wpływ na efekt modyfikacji. Publikacja (2) przedstawia wyniki przeprowadzonych badań. Wykazano, że promieniowanie mikrofalowe skutecznie modyfikowało enzym. Obserwowano tworzenie się form oligomerycznych, głównie dimerycznej oraz zwiększanie się jego powierzchniowej hydrofobowości. Stwierdzono także wysoką rozpuszczalność otrzymanych preparatów co było kolejnym pozytywnym efektem tej modyfikacji. Na uwagę zasługiwały także inne zalety metody, takie jak wysoka wydajność i łatwość prowadzenia procesu oraz krótki czas jego trwania.

Wyniki tego etapu badań potwierdziły słuszność hipotezy zakładającej możliwość skutecznego wykorzystania potencjału mikrofalowego do termicznej modyfikacji lizozymu.

Drugi etap badań, którego wyniki przedstawiono w publikacji (3), obejmował rozwinięcie rozpoczętych w pierwszym etapie prac polegające na wprowadzeniu do procedury modyfikacyjnej procesu oksydacyjnego prowadzonego równolegle z procesem mikrofalowym. Oksydację skutecznie stosowano już we wcześniejszych pracach dotyczących termicznej i termochemicznej modyfikacji enzymu. Badania prowadzone w ramach tej pracy również wykazały, że takie udoskonalenie procedury daje pozytywny efekt. Otrzymane w rezultacie jej zastosowania preparaty charakteryzowały się zwiększoną

zawartością zarówno sumarycznej ilości oligomerów (maksymalnie do 58,9%) jak i formy dimerycznej lizozymu (do 38,5%) w porównaniu do efektów otrzymanych po modyfikacji stosowanej w pierwszym etapie badań. Zwiększyła się też ich powierzchniowa hydrofobowość. Pozostałe parametry tj. rozpuszczalność preparatów jak i ich aktywność hydrolityczna pozostawały nadal na bardzo wysokim poziomie co potwierdziło, że założenie polegające na połączeniu energii pola mikrofalowego z potencjałem oksydacyjnym było słuszne, bowiem uzyskano bardzo wysoką efektywność modyfikacji, a otrzymane preparaty charakteryzowały się wyższą jakością niż te otrzymane w pierwszym etapie badań.

Publikacja (4) przedstawia wyniki trzeciego etapu badań dotyczącego prac nad udoskonaleniem procesu modyfikacyjnego. Badano wpływ warunków środowiskowych, czasu trwania procesu oraz wykorzystania jako surowca wyjściowego ciekłego koncentratu lizozymu (LLC) zamiast stosowanego wcześniej wysuszonego, na efektywność modyfikacji i jakość otrzymywanych preparatów. Wykazano, że nowe zoptymalizowane warunki modyfikacji korzystnie wpłynęły na prowadzony proces. Otrzymano bardzo dobrze rozpuszczalne preparaty o większej niż to było wcześniej ilości oligomerów oraz korzystniejszych zmianach w hydrofobowości i aktywności hydrolitycznej. Ponadto w wyniku zastosowania płynnego koncentratu LLC jako surowca do modyfikacji proces został jeszcze bardziej uproszczony a czas jego trwania skrócony. Ten etap badań potwierdził, że proponowana metoda wykorzystująca promieniowanie mikrofalowe może być nowym atrakcyjnym sposobem otrzymywania zmodyfikowanego lizozymu alternatywnym do dotychczas stosowanych technik.

W ostatniej części dysertacji przedstawiono wyniki dodatkowych, nie planowanych wcześniej badań będących efektem obserwacji dokonanych w trakcie realizacji trzech pierwszych etapów pracy. Okazało się, że w preparatach otrzymanych z surowca płynnego i pozostawionych w takiej postaci wraz z czasem przechowywania zaczęły uwidaczniać się istotne zmiany, przede wszystkim następowało ich ciemnienie z tendencją do pogłębiania się ciemniejszego odcienia barwy wraz z czasem trwania ich przetrzymywania. Obserwacje te były na tyle interesujące, że postanowiono zbadać to zjawisko stawiając hipotezę, że proces modyfikacyjny nie został zahamowany wraz z zakończeniem mikrofalowej modyfikacji lecz nadal trwał w innej formie i prowadził do dalszych zmian w już wcześniej zmodyfikowanym enzymie. Zaplanowano zatem dodatkowe badania, których celem było tak jak uprzednio, przeprowadzenie oceny zachodzących zmian dla wybranych właściwości fizykochemicznych preparatów mikrofalowo zmodyfikowanego lizozymu i przechowywanego przez rok w warunkach chłodniczych, a także przeprowadzenie testu ich przeciwdrobnoustrojowego

działania. Wyniki badań przedstawiono w publikacji (5).

Badania potwierdziły, że w trakcie przechowywania prób lizozym ulegał dalszej modyfikacji. Oprócz widocznej zmiany barwy systematycznie wzrastała zarówno ilość oligomerów jak i sukcesywnie zwiększała się powierzchniowa hydrofobowość enzymu. Największe zmiany stwierdzono po 12 miesiącach przechowywania prób kiedy to uzyskano najwyższą sumaryczną zawartość oligomerów wynoszącą 66,4%, a powierzchniowa hydrofobowość wzrosła do 72%. Ponadto testy aktywności przeciwbakteryjnej wykazały znaczące zwiększenie hamującego działania preparatów zarówno przeciwko Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym bakteriom.

Przedstawione w niniejszej dysertacji wyniki badań obejmujących obszar termicznych modyfikacji lizozymu oprócz wartości naukowej wykazują także walory aplikacyjne. Badania wykazały, że zastosowanie promieniowania mikrofalowego w procesie modyfikacyjnym było bardzo dobrym rozwiązaniem. Proponowana metoda modyfikacji enzymu cechuje się bardzo dobrą efektywnością procesu. Otrzymane preparaty zawierają wysoką ilość oligomerów lizozymu, w tym przede wszystkim dimeru, który uważany jest jak główny czynnik kształtujący specyficzną aktywność lizozymu skierowaną przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, której pozbawiony jest lizozym natywny. Drugim czynnikiem istotnie wzmacniającym tę specyficzną aktywność przeciwbakteryjną jest powierzchniowa hydrofobowość enzymu, która w wyniku mikrofalowej jego modyfikacji bardzo znacząco się zwiększyła. Przeprowadzone testy mikrobiologiczne potwierdziły rozszerzenie spektrum przeciwbakteryjnego działania otrzymanych preparatów na bakterie Gram-ujemne przy jednoczesnym zachowaniu aktywności przeciwko Gram-dodatnim bakteriom.

Bardzo wysoka jakość zmodyfikowanego lizozymu będącego efektem przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy modyfikacji, łatwość prowadzenia procesu modyfikacyjnego i krótki czas jego trwania oraz nowy znacznie poszerzony potencjał aplikacyjny, istotny przede wszystkim dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego oraz medycyny i weterynarii, dowodzi, że zastosowanie promieniowania mikrofalowego do termicznej modyfikacji lizozymu było bardzo interesującą i słuszną ideą. Otrzymane wyniki badań stanowią także bardzo ważny i inspiracyjny materiał do dalszych studiów nad enzymem i jego modyfikacjami.

Tianyu Yang

2021-11-10