

GRZEGORZ LEŚNIEROWSKI, ROBERT BOROWIAK

ZASTOSOWANIE REZORCYNY JAKO ŚRODKA OCHRONNEGO LIZOZYMU PODCZAS JEGO WYSOKOTEMPERATUROWEJ MODYFIKACJI

Streszczenie

Celem niniejszej pracy była ocena rezorcyny jako środka chroniącego lizozym podczas jego wysokotemperaturowej modyfikacji. Analizowano wpływ dodatku tego środka na zmianę aktywności hydrolitycznej zmodyfikowanego enzymu oraz stopień jego oligomeryzacji. Modyfikacja wysokotemperaturowa polegała na oligomeryzacji lizozymu w temperaturze 90 i 95 °C z udziałem substancji utleniającej w postaci H₂O₂ lub odczynnika Reciclean®. Uzyskane po modyfikacji próby poddano badaniom analitycznym obejmującym oznaczenie aktywności hydrolitycznej enzymu oraz określenie stopnia jego oligomeryzacji.

Dzięki zastosowaniu rezorcyny, jako środka chroniącego lizozym podczas jego wysokotemperaturowej modyfikacji, uzyskano efekt 75-procentowej ochrony aktywności hydrolitycznej enzymu. Ponadto obserwowano zwiększony udział oligomerycznych form lizozymu w preparatach uzyskanych po modyfikacji.

Słowa kluczowe: lizozym, rezorcyna, modyfikacja, oligomery, aktywność hydrolityczna

Wprowadzenie

Lizozym (N-acetylo-muramylohydrolaza E.C.3.2.1.17) jest niskocząsteczkowym enzymem hydrolitycznym wykazującym zdolność rozkładu specyficznych połączeń polisacharydów budujących ścianę komórkową bakterii. Jego działanie katalityczne polega na dezintegracji wiązania β-1,4-glikozydowego pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozoaminą w strukturze kompleksu polisacharydowo-peptydowego (peptydoglikanu) [4, 6, 10]. Lizozym w świecie istot żywych występuje powszechnie i jest składnikiem wielu wydzielin, płynów ustrojowych oraz tkanek organizmów roślinnych oraz zwierzęcych. Stwierdzono jego występowanie w komórkach bakterii i cząstkach wirusów. Podstawowe i bogate źródło enzymu sta-

nowi białko jaja kurzego, w którym pełni on funkcję naturalnej ochrony dla tworzącego i rozwijającego się zarodka [10, 21, 23]. Właściwości antybakteryjne lizozymu powodują znaczne zainteresowanie jego praktycznym wykorzystaniem.

Enzym izolowany z białka jaja znajduje obecnie szerokie zastosowanie m.in. w przemyśle spożywczym jako biokonserwant produktów żywnościowych, a także w medycynie i weterynarii, w terapii wielu chorób pochodzenia bakteryjnego i wirusowego [2, 7, 9, 14, 15].

Podstawową formą występowania lizozymu w przyrodzie jest monomer, który antybakteryjne działanie wykazuje głównie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich [11]. Zaobserwowano, że w określonych warunkach środowiskowych enzym uzyskuje zdolność do tworzenia dimeru i wyższych oligomerów, nabywając przy tym nowych cennych właściwości [8, 16, 22]. W postaci oligomerycznej charakteryzuje się zwiększoną aktywnością przeciwdrobnoustrojową oraz rozszerzonym spektrum działania, m.in. na bakterie Gram-ujemne i inne szczepy dotychczas odporne na monomer [1, 3, 5, 16]. Właściwości te znacząco zwiększają użyteczność enzymu, stwarzając w ten sposób możliwość szerszego praktycznego jego wykorzystania.

Wśród znanych metod modyfikacji enzymu dobry efekt oligomeryzacji uzyskano w wyniku zastosowania opracowanej w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu metody wysokotemperaturowej z użyciem środka utleniającego jako dodatkowego obok temperatury modyfikatora. Wykazano jednak, że modyfikacja ta powoduje znaczne obniżenie aktywności hydrolitycznej enzymu w otrzymanych preparatach w porównaniu z jej wielkością w monomerze niepoddanym procesowi [18].

Celem niniejszej pracy było zastosowanie rezorcyny jako środka chroniącego lizozym podczas jego wysokotemperaturowej modyfikacji i ocena wpływu tego dodatku na stopień oligomeryzacji enzymu i zmiany jego aktywności hydrolitycznej.

Materiał i metody badań

Jako surowiec do badań stosowano monomer lizozymu izolowany z białka jaja kurzego w warunkach przemysłowych przez firmę Belovo (Belgia) o aktywności hydrolitycznej wynoszącej 21252 U/mg.

Lizozym do modyfikacji przygotowano w postaci 5 % (m/v) wodnego roztworu, którego pH ustalono na poziomie $4,0 \pm 0,2$. Próby modyfikowano dodatkiem 0,03 % (m/v) rezorcyny, 2 % (v/v) H_2O_2 oraz 0,2 % (v/v) odczynnika RECICLEAN® holenderskiej firmy Kemira Chemicals BV, którego składnikiem aktywnym jest kwas nadmrowkowy. Próba odniesienia była próba bez dodatku rezorcyny. Proces prowadzono 30 min w temp. 90 oraz 95 °C, wykorzystując reaktor analityczny Syncore Analyst firmy Büchi (Szwajcaria). Po zakończonej modyfikacji badane próby schładzano do temp. ok. 0 °C, zamrażano, a następnie suszono liofilizacyjnie przy użyciu liofilizatora

GT3 firmy LEYBOLD-HARAEUS. Otrzymane liofilizaty umieszczano w szczelnych pojemnikach, a następnie poddawano badaniom analitycznym.

Analizę elektroforetyczną prowadzono metodą z SDS-PAGE [9, 15] z wykorzystaniem aparatu SE-600 firmy Hoefer Scientific Instruments (USA). Elektroforezę prowadzono w żelu poliakrylamidowym o stężeniu 6 % przy natężeniu prądu 60 mA (żel zagęszczający) oraz 12,5 % przy natężeniu 90 mA (żel rozdzielający), na który наносzono 10 µl próby. Po zakończonym rozdziale żel utrwalano przez 60 min w roztworze utrwalającym (kwas octowy, metanol, woda destylowana w stosunku 1 : 5 : 4), a następnie barwiono przez 24 h w 10 % roztworze kwasu octowego z dodatkiem błękitu Coomassie Brilliant R-250. Wybarwione żele odbarwiano, wykorzystując 10 % kwas octowy. Odbarwione żele skanowano, a ich obrazy przechowywano jako pliki komputerowe. Określenie ilościowego udziału poszczególnych form oligomerycznych lizozymu w badanych preparatach prowadzono densytometrycznie z wykorzystaniem programu komputerowego TotalLab TL 100 firmy Nonlinear Dynamics Ltd (USA).

Aktywność hydrolityczną lizozymu oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem zjawiska zmniejszania zmętnienia zawiesiny bakteryjnej *Micrococcus lysodeikticus* w wyniku dodania do niej enzymu [10]. W badaniach użyto spektrofotometru Stv VSU-28 firmy Carl Zeiss Jena (Niemcy). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm, w temp. 21 °C.

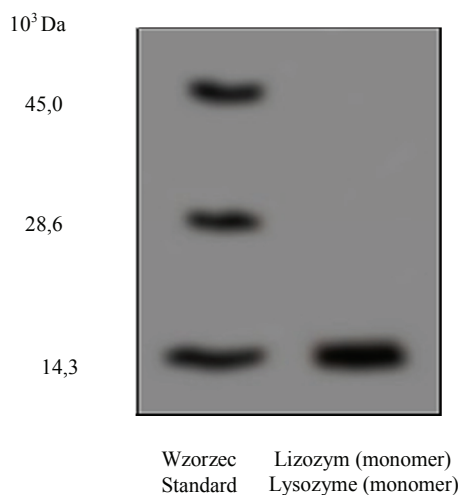
Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w pięciu powtórzeniach. Analizę statystyczną wyników badań przeprowadzono przy użyciu programu Statistica PL v.8.0. Wykonano podstawowe obliczenia statystyczne w przypadku każdej zmiennej, wyznaczając m.in. wartość średnią, odchylenie standardowe, błąd standardowy i przedział ufności. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Testowanie prowadzono na poziomie istotności nieprzekraczającym $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Opracowane w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu metody modyfikacji lizozymu pozwalają na uzyskanie enzymu w postaci zoligomeryzowanej. W zależności od zastosowanej metody w otrzymanych preparatach uzyskuje się zmienną ilość poszczególnych oligomerów. Lizozym zmodyfikowany termicznie zawiera do 30 % dimeru [12, 13] a zmodyfikowany metodą termiczno-chemiczną z nadtlaniem wodoru – 35 - 40 % [15, 17]. Z kolei zastosowanie metody wysokotemperaturowej (95 °C) z udziałem środka utleniającego jako substancji wspomagającej proces prowadzi do dalszej intensyfikacji zjawiska oligomeryzacji i w rezultacie można otrzymać preparaty zawierające ponad 82 % spolimeryzowanego enzymu, w tym ponad 30 % dimeru [18]. Przeprowadzone dotąd badania wykazały jednak występowanie w zmodyfikowanych próbach negatywnych zmian, będących wynikiem działania wysokiej temperatury oraz czynnika utleniającego. Obserwuje się

znaczne obniżenie aktywności hydrolitycznej lizozymu nawet o 87 % w stosunku do wartości początkowej oraz zjawisko trwałej, nieodwracalnej denaturacji części lizozymu poddanego modyfikacji. Niezbędna staje się więc ochrona aktywności enzymatycznej lizozymu oraz stabilizacja procesu jego oligomeryzacji. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki etapu badań dotyczącego zastosowania rezorcyny jako substancji chroniącej enzym w drastycznych warunkach wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu. W ostatnich latach wykazano, że niektóre związki z grupy fenoli, a w szczególności alkilohydroksybenzeny, do których należy rezorcyna, są dobrymi regulatorami aktywności lizozymu. Wykazano, że związki te ze względu na swoją chemiczną strukturę oraz rodzaj oddziaływania na cząsteczkę białka, modyfikują lizozym pochodzący z białka jaja kurzego [19, 20]. Zmodyfikowany lizozym wykazuje zmiany konformacyjne, obejmujące również centrum aktywne, którym towarzyszą zmiany właściwości fizykochemicznych enzymu. Stwierdzono, że lizozym modyfikowany z udziałem tego typu związków wykazuje wyższą odporność na denaturację termiczną niż jego natywna forma, czego efektem jest ochrona aktywności hydrolitycznej [20].

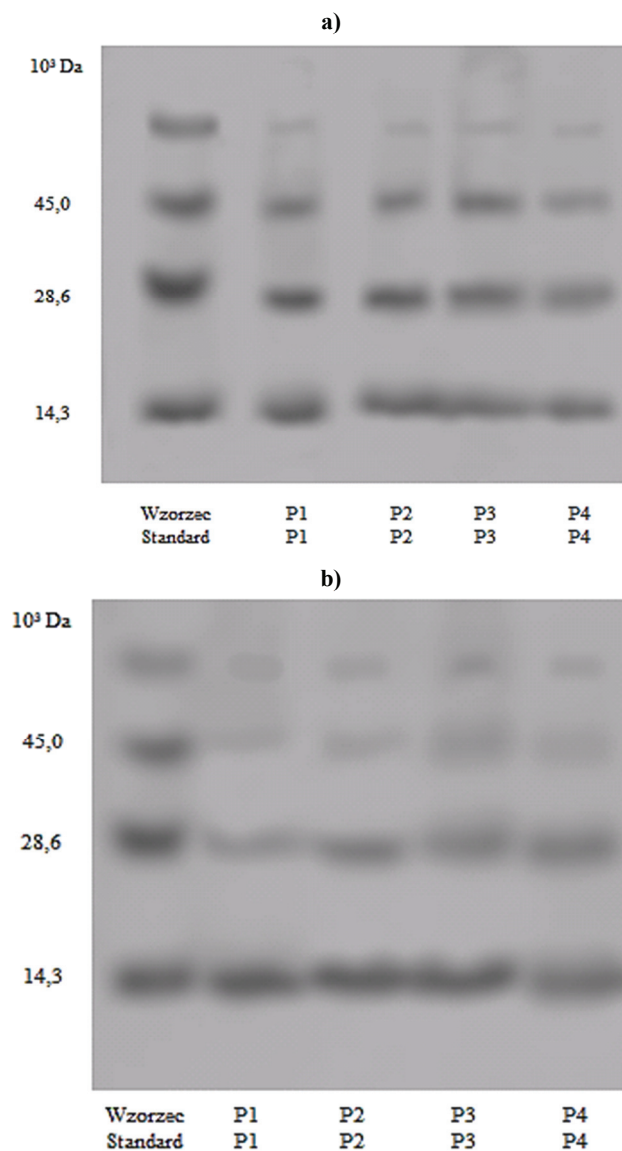
Modyfikowano monomer lizozymu o aktywności 21252 U/mg, którego obraz elektroforetyczny przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Obraz elektroforetyczny monomeru lizozymu.

Fig. 1. Electrophoretic image of lysozyme monomer.

Modyfikację lizozymu przeprowadzono zgodnie z podaną wcześniej metodyką i w jej efekcie otrzymano preparaty, które w zależności od sposobu modyfikacji oznaczono symbolami P1, P2, P3 i P4. Analiza elektroforetyczna wykazała, że preparaty te zawierały obok monomeru także oligomery lizozymu w postaci dimeru, trimeru, a także tetrametu (rys. 2).



P1 – próba zmodyfikowana bez udziału substancji dodatkowych / sample modified without supplementary substances added; P2 – próba zmodyfikowana z 0,03 % udziałem rezorcyny / sample modified with 0.03% of resorcin; P3 – próba zmodyfikowana z 0,03 % udziałem rezorcyny i 2 % udziałem H_2O_2 / sample modified with 0.03% of resorcin and 2% of H_2O_2 ; P4 – próba zmodyfikowana z 0,03 % udziałem rezorcyny i 0,2 % udziałem odczynnika Reciclean® / sample modified with 0.03% of resorcin and 0.2% of Reciclean® reagent.

Rys. 2. Obraz elektroforetyczny preparatów lizozymu otrzymanych w wyniku jego modyfikacji z zastosowaniem rezorcyny w temperaturze 90 °C (a) i 95 °C (b).

Fig. 2. Electrophoretic image of lysozyme samples produced as a result its modification with the use of resorcin at a temperature of 90 °C (a) and 95 °C (b).

T a b e l a 1

Średni udział form oligomerycznych lizozymu w preparatach otrzymanych w temperaturze 90 °C.
Mean content of oligomeric forms of lysozyme in preparations produced at a temperature of 90 °C.

Próba Sample	Dodatek rezorcyiny Added Resorcin [%]	Stężenie H ₂ O ₂ Concentration of H ₂ O ₂ [%]	Stężenie Reciclean® Concentration of Reciclean® [%]	Udział monomeru Content of Monomer [%]	Udział dimeru Content of Dimer [%]	Udział trimeru Content of Trimer [%]	Udział tetrameru Content of Tetramer [%]	Suma oligomerów Oligomers in total [%]
P1	0,00	0,0	0,0	36,4 ^d	27,5 ^a	27,8 ^d	8,2 ^a	63,6 ^a
P2	0,03	0,0	0,0	33,9 ^e	31,0 ^b	19,7 ^a	15,4 ^c	66,1 ^b
P3	0,03	2,0	0,0	28,4 ^a	31,4 ^b	24,3 ^c	15,9 ^d	71,6 ^d
P4	0,03	0,0	0,2	30,9 ^b	32,2 ^c	22,4 ^b	14,5 ^b	69,1 ^c

Objaśnienie: / Explanatory note:

a-c – wartości średnie oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in the columns and denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0,05$.

T a b e l a 2

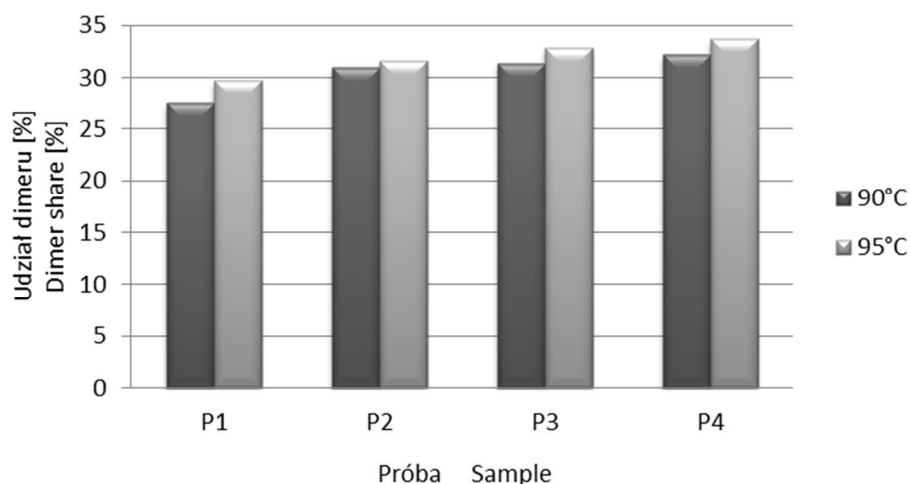
Średni udział form oligomerycznych lizozymu w preparatach otrzymanych w temperaturze 95 °C.
Mean content of oligomeric forms of lysozyme in preparations produced at a temperature of 95 °C.

Próba Sample	Dodatek rezorcyiny Added Resorcin [%]	Stężenie H ₂ O ₂ Concentration of H ₂ O ₂ [%]	Stężenie Reciclean® Concentration of Reciclean® [%]	Udział monomeru Concentration of Monomer [%]	Udział dimeru Concentration of Dimer [%]	Udział trimeru Concentration of Trimer [%]	Udział tetrameru Concentration of Tetramer [%]	Suma oligomerów Oligomers in total [%]
P1	0,00	0,0	0,0	32,6 ^d	29,7 ^a	28,6 ^c	9,1 ^a	67,4 ^a
P2	0,03	0,0	0,0	30,7 ^c	31,6 ^b	27,1 ^b	10,6 ^b	69,3 ^b
P3	0,03	2,0	0,0	23,4 ^a	32,9 ^c	27,3 ^b	10,4 ^b	76,6 ^d
P4	0,03	0,0	0,2	29,9 ^b	33,7 ^d	25,7 ^a	10,7 ^b	70,1 ^c

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Analiza densytometryczna umożliwiła określenie średniego udziału poszczególnych form lizozymu w badanych preparatach. Wyniki analizy przedstawiono w tab. 1. i 2.

Na ilość otrzymanych oligomerów największy wpływ miała temperatura, w której prowadzono proces modyfikacji enzymu. Stwierdzono, że bez udziału dodatków chemicznych uzyskano ponad 63 % oligomerów w temp. 90 °C i około 67,5 % w temp. 95 °C. Zastosowanie chemicznych substancji wspomagających zwiększyło wydajność procesu o 2 - 3 % w przypadku samej rezorcyny oraz nawet o 13 % w przypadku jednoczesnego zastosowania rezorcyny i preparatu Reciclean® (próba P4, temp. 95 °C). W tej próbie uzyskano także największą ilość dimeru (33,7 %), który stanowił główną formę oligomeryczną wszystkich preparatów zmodyfikowanego lizozymu (tab. 1 i 2). Jego udział wynosił w nich od 27 do 33 % (rys. 3).



Rys. 3. Udział dimeru lizozymu w preparatach otrzymanych w określonych warunkach modyfikacji.

Fig. 3. Content of lysozyme dimer in preparations produced under specific conditions of modification process.

Dotychczasowe badania wykazały, że właśnie forma dimeryczna zmodyfikowanego lizozymu decyduje o nowym, zdecydowanie skuteczniejszym przeciwdrobnoustrojowym działaniu [2, 5, 6, 14, 17]. Przedstawiony w pracy sposób modyfikacji lizozymu pozwolił zatem na uzyskanie preparatów zawierających znaczną ilość oligomerów, których większość stanowił bardzo pożądaný i cenny dimer.

Obok stopnia oligomeryzacji bardzo ważną cechą zmodyfikowanego lizozymu jest wielkość jego aktywności hydrolitycznej. W wyniku zastosowania wszystkich dotąd znanych modyfikacji lizozymu w otrzymanych preparatach zawsze obserwowano obniżenie, czasami nawet znaczne, jego aktywności hydrolitycznej [3, 12, 13, 18].

Pomimo utraty tej aktywności zmodyfikowany enzym nadal działa na bakterie Gram-dodatnie, a dodatkowo wykazuje aktywność antybakteryjną wobec bakterii Gram-ujemnych. Aktywność tę przypisuje się nowym właściwościom zmodyfikowanego lizozymu, odmiennym od jego hydrolitycznego działania. Zjawisko to nie jest jeszcze do końca poznane i obecnie prowadzi się szereg badań dotyczących wyjaśnienia mechanizmu działania zmodyfikowanego lizozymu i pojawienia się „nowej” przeciwdrobnoustrojowej jego aktywności [3, 15, 16, 17, 18].

Tabela 3

Średnia aktywność hydrolityczna lizozymu zmodyfikowanego w temperaturze 90 °C.

Average hydrolytic activity of lysozyme modified at a temperature of 90 °C.

Próba Sample	Dodatek rezorcyny Added Resorcin [%]	Stężenie H ₂ O ₂ concentration of H ₂ O ₂ [%]	Stężenie Reciclean® Concentration of Reciclean® [%]	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]	Obniżenie aktywności hydrolitycznej* Decrease in hydrolytic activity* [%]
P1	0,00	0,0	0,0	7741 ^a	63,6 ^d
P2	0,03	0,0	0,0	15908 ^d	25,1 ^a
P3	0,03	2,0	0,0	10287 ^b	51,6 ^b
P4	0,03	0,0	0,2	11432 ^c	46,2 ^c

Objaśnienia: / Explanatory notes:

*w stosunku do monomeru lizozymu (21252 U/mg) / in relation to lysozyme monomer (21252 U/mg);

a-c – wartości średnie oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in the columns and denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

Tabela 4

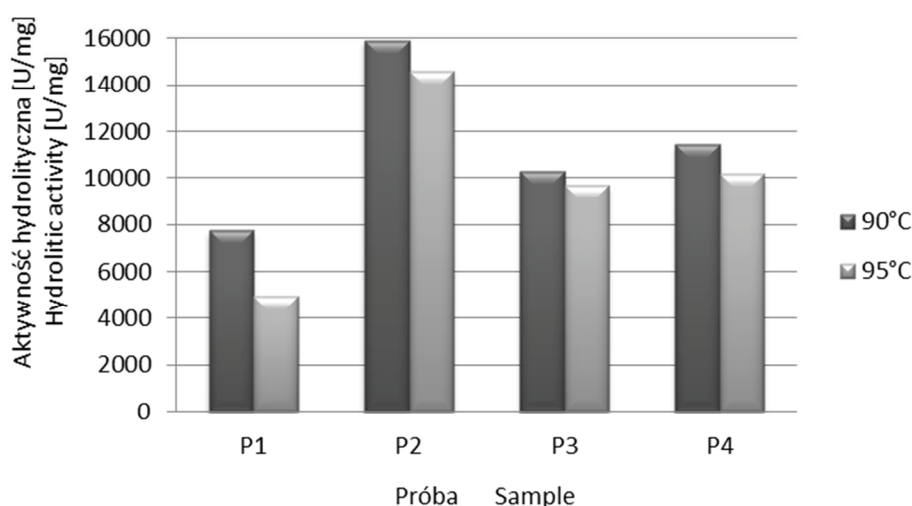
Średnia aktywność hydrolityczna lizozymu zmodyfikowanego w temperaturze 95 °C.

Mean hydrolytic activity of lysozyme modified at a temperature of 95 °C.

Próba Sample	Dodatek rezorcyny Added resorcin [%]	Stężenie H ₂ O ₂ concentration of H ₂ O ₂ [%]	Stężenie Reciclean® Concentration of Reciclean® [%]	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]	Obniżenie aktywności hydrolitycznej* Decrease in hydrolytic activity* [%]
P1	0,00	0,0	0,0	4956 ^a	76,7 ^a
P2	0,03	0,0	0,0	14603 ^d	31,3 ^a
P3	0,03	2,0	0,0	9691 ^b	54,4 ^c
P4	0,03	0,0	0,2	10180 ^c	52,1 ^b

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory note as in Tab. 3.

W przypadku przedstawionych w pracy modyfikacji również obserwowano znaczne obniżenie aktywności hydrolitycznej enzymu w otrzymanych preparatach. Średnią jej wartość oraz procentowe zmniejszenie w stosunku do niezmodyfikowanego monomeru zestawiono w tab. 3. i 4. W wyniku przeprowadzonych modyfikacji nastąpiło znaczne obniżenie swoistej aktywności enzymu, w porównaniu z aktywnością monomeru. Efekt ten wywołany był przede wszystkim działaniem radykalnych czynników modyfikujących tj. wysokiej temperatury oraz substancji utleniających, które powodowały znaczne zmiany w strukturze łańcucha polipeptydowego enzymu. Wcześniej wykazano, że zachodzące podczas modyfikacji procesy powodują rozfałdowanie białka, zwiększenie jego powierzchni hydrofobowej i w efekcie niszczenie centrum aktywnego enzymu [5, 12, 17]. Zmiany wielkości aktywności hydrolitycznej lizozymu spowodowane warunkami modyfikacji enzymu przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Aktywność hydrolityczna lizozymu w preparatach otrzymanych w określonych warunkach modyfikacji.

Fig. 4. Hydrolytic activity of lysozyme in preparations produced under specific conditions of modification process.

Zastosowanie temp. 90 i 95 °C spowodowało obniżenie badanej aktywności odpowiednio o 64 i 77 %. Stwierdzono jednak, że dodatek rezorcyny, jako substancji chroniącej enzym, wpłynął stabilizująco na proces jego wysokotemperaturowej modyfikacji. Okazało się również, że obecność tego składnika hamowała obniżanie się aktywności hydrolitycznej w zmodyfikowanym enzymie. Wykazano, że w próbach, które modyfikowano w temp. 90 i 95 °C, do których dodano rezorcynę, aktywność hydrolityczna zmniejszyła się tylko o 25 - 31 %. Ochronne działanie rezorcyny było także

bardzo wyraźne w próbach, do których podczas modyfikacji dodano substancje wspomagające oligomeryzację enzymu, tj. nadtlenuk wodoru lub preparat Reciclean®. Jednak silnie destrukcyjne działanie modyfikatorów utleniających w połączeniu z wysoką temperaturą warunkowało jedynie 50-procentową ochronę aktywności hydrolitycznej enzymu. Stwierdzono zatem, że proces modyfikacji lizozymu korzystniej jest prowadzić w temperaturze 90 °C z dodatkiem 0,03 % rezorcyny i bez udziału modyfikatorów utleniających, bowiem otrzymane w tych warunkach preparaty zawierały 66 % oligomerów, w tym 31 % dimeru, a ich aktywność hydrolityczna chroniona była aż w 75 %. Natomiast podwyższenie temp. modyfikacji do 95 °C prowadziło już do tak znacznych zmian konformacyjnych w obrębie centrum aktywnego lizozymu, że otrzymane preparaty wykazywały zdecydowanie niższą katalityczną aktywność przeciwbakteryjną, mimo zastosowania środka ochronnego.

Przedstawione wyniki badań dowodzą, że zastosowanie rezorcyny, jako środka chroniącego lizozym podczas jego wysokotemperaturowej modyfikacji, w znacznym stopniu zabezpieczyło enzym przed niekorzystnymi zmianami wynikającymi z warunków procesu. Przeprowadzone badania wykazały, że rezorcyna wpłynęła na zwiększenie stopnia oligomeryzacji lizozymu, zapewniając jednocześnie wyraźną ochronę jego aktywności hydrolitycznej. Należy jednak zaznaczyć, że decydujący wpływ na stopień oligomeryzacji enzymu oraz udział poszczególnych jego form w uzyskanych preparatach miała temperatura procesu, a następnie dodatek substancji utleniających. Zastosowanie rezorcyny tylko nieznacznie polepszyło oligomeryzację lizozymu, natomiast istotnie wpłynęło na ochronę aktywności hydrolitycznej enzymu. W preparatach modyfikowanych w temp. 90 °C bez udziału modyfikatorów utleniających aktywność enzymatyczna lizozymu chroniona była w 75 %, uzyskując ostatecznie wartość 15908 U/mg. Podobnego efektu nie udało się uzyskać we wcześniejszych badaniach.

Wnioski

1. Wykazano, że wysokotemperaturowa modyfikacja lizozymu z wykorzystaniem 0,03-procentowego dodatku rezorcyny jest skutecznym sposobem oligomeryzacji enzymu.
2. Równoczesne działanie rezorcyny i stosowanych modyfikatorów w postaci nadtlenu wodoru i odczynnika Reciclean® powodowało zwiększenie sumarycznej ilości oligomerów w otrzymanych preparatach do 70 %.
3. Wykazano, że rezorcyna silnie chroniła aktywność hydrolityczną lizozymu modyfikowanego w temperaturze 90 °C. W preparatach modyfikowanych z jej udziałem aktywność ta obniżyła się o 30 %, podczas gdy w modyfikacji bez jej udziału obniżyła się o ponad 75 %.

4. Poziom ochrony i stopień oligomeryzacji enzymu w sposób statystycznie istotny zależały od warunków modyfikacji, tj. dodatku rezorcyny, rodzaju zastosowanego czynnika utleniającego, a w szczególności temperatury procesu.

Literatura

- [1] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of lysozyme modified by membrane technique. *EJPAU, Food Sci. Technol.*, 2003, **6** (2), 1-6.
- [2] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations - a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2008, **58** (1), 5-10.
- [3] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **228**, 841-845.
- [4] Cuningham F.E., Proctor V.A., Goetsch S.I.: Egg-white lysozyme as food preservative. *Poult. Sci.*, 1991, **47**, 142.
- [5] Ibrahim H.R., Higashiguchi S., Juneja L.R., Kim M., Yamamoto T.: A structural phase of heat – denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1416-1420.
- [6] Kiczka W.: Od monomeru do dimeru lizozymu. *Życie Wet.*, 1994, **4A**, 131-136.
- [7] Kijowski J., Leśniewski G.: Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności w diagnostyce medycznej i farmakologii. *Biotechnologia*, 1995, **2** (29), 130-140.
- [8] Kijowski J., Leśniewski G.: Lizozym z białka jaja naturalnym konserwantem żywności. *Mat. XXXI Sesji Naukowej KTChŻ PAN, Poznań 2000*, ss. 47-56.
- [9] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (5259), 680-685.
- [10] Leśniewski G., Kijowski J.: Aktywność enzymatyczna lizozymu i jej wykorzystanie do utrwalenia żywności. *Przem. Spoż.*, 1995, **4** (95), 116-119.
- [11] Leśniewski G., Kijowski J.: Budowa i ogólna charakterystyka lizozymu (muramidazy). *Żywność. Technologia. Jakość.*, 1996, **3** (8), 6-13.
- [12] Leśniewski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.: Antibacterial activity of thermally modified lysozyme. *EJPAU, Food Sci. Technol.*, 2001, **2**, 1-9.
- [13] Leśniewski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.: Thermally and chemical-thermally modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World Poult. Sci. J.*, 2004, **60**, 303-310.
- [14] Leśniewski G., Kijowski J.: Lysozyme. In: *Bioactive Egg Compounds*. Eds.: R. Huopalathi, R. Lopez, M. Anton, R. Schade. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2007, pp. 33-42.
- [15] Leśniewski G.: Fizykochemiczne metody modyfikacji i pomiaru aktywności lizozymu. *Rozpr. nauk. Wyd. AR w Poznaniu, Poznań 2007*, 387, ss. 1-104.
- [16] Leśniewski G., Kijowski J., Cegielska-Radziejewska R.: Ultrafiltration-modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **44**, 305-311.
- [17] Leśniewski G.: Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. *Nauka. Przyroda. Technologie*, 2009, **3** (4), 1-18.
- [18] Leśniewski G., Borowiak R.: Wysokotemperaturowa modyfikacja lizozymu. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 2010, **9** (2), 23-32.
- [19] Nikolaev, Yu.A., Loiko, N.G., Stepanenko, I.Yu., Shanenko, E.F., Martirosova, E.I., Plakunov, V.K., Kozlova, A.N., Borzenkov, I.A., Korotina, O.A., Rodin, D.S., Krupyanskii, Yu.F., El'-Registan, G.I.: Changes in physicochemical properties of proteins, caused by modification with alkylhydroxybenzenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **44**(2), 143-150.

- [20] Petrovskii A. S., Deryabin D. G., Loiko N. G., Mikhailenko N. A., Kobzeva T. G., Kanaev P. A., Nikolaev Yu. A., Krupyanskii Yu. F., Kozlova A. N., El'-Registan G. I.: Regulation of the functional activity of lysozyme by alkylhydroxybenzenes. *Microbiology*, 2009, **78** (2), 144-153.
- [21] Proctor V.A., Cunningham F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1988, **26** (4), 359-395.
- [22] Sophianopoulos A.J.: Association sites of lysozyme in solution. *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 3188-3193.
- [23] Trziszka T.: Właściwości funkcjonalne. W: Jajczarstwo. Wyd. AR we Wrocławiu, Wrocław 2000, ss. 219-230.

APPLYING RESORCIN AS LYSOZYME-PROTECTIVE AGENT IN THE COURSE OF ITS HIGH-TEMPERATURE MODIFICATION

S u m m a r y

The objective of the study was to assess the resorcin as an agent to protect lysozyme in the course of its high-temperature modification process. The impact of the added agent was analyzed on the change in the hydrolytic activity of the modified enzyme as was the level of its oligomerisation degree. The high-temperature modification process consisted in the oligomerisation of lysozyme at a temperature of 90 and 95 °C with either H₂O₂ or Reciclean® reagent added as an oxidizing substance. The samples produced during the modification process were analyzed; the analysis comprised the determination of the enzyme's hydrolytic activity and the assessment of its oligomerisation level.

The result of applying the resorcin as an agent to protect the lysozyme in the course of its high-temperature modification process was a 75 % protection level of the enzyme's hydrolytic activity. In addition, it was found that the number of lysozyme oligomeric forms increased in the samples produced during the modification process.

Key words: lysozyme, resorcin, modification, oligomers, hydrolytic activity 