

ALEKSANDRA GRASZKIEWICZ, MAŁGORZATA KAŻMIERSKA,
JOANNA NIEDBALSKA

WPLYW DODATKU PREPARATÓW MINERALNO-HUMINOWYCH ORAZ PRZECIWUTLENIACZY DO PASZY NIOSEK NA AKTYWNOŚĆ LIZOZYMU I CYSTATYNY W BIAŁKU JAJ

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu żywienia niosek paszą standardową, wzbogaconą preparatami mineralno-huminowymi oraz przeciwutleniaczami (wit. A i E) na aktywność lizozymu i cystatyny. Materiałem doświadczalnym były jaja pochodzące od trzech grup niosek linii Tetra SL, które skarmiano: A (grupa kontrolna) paszą standardową zawierającą 17% białka, 2700 kcal/kg; B z dodatkiem witamin A i E (kolejno: 10 000 j/kg i 20 mg/kg paszy); C z dodatkiem 2% humobentofetu (HB) i humokarbowitu (HK) oraz witamin A i E (w ilościach jw.). Doświadczenie przeprowadzono na jajach świeżych oraz przechowywanych przez 4 tygodnie w temperaturze 15°C. Aktywność lizozymu oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc zmiany absorbancji roztworu bakterii *Micrococcus lysodeicticus* podczas enzymatycznej reakcji lizozymu. Inhibitorową aktywność cystatyny oznaczano metodą Nishida i wsp. oraz Siewińskiego.

Zróżnicowane żywienie istotnie wpłynęło na poziom aktywności cystatyny w świeżym białku jaja. W wariancie A, stanowiącym grupę kontrolną, aktywność cystatyny była najwyższa i osiągnęła wartość 421 j/100 mg białka. W wariantach B i C, będących grupą statystycznie jednorodną, w których nioski skarmiano paszami wzbogaconymi, uzyskano niższe poziomy inhibitorowej aktywności cystatyny. W grupie C aktywność ta była niższa o 26,2%, a w grupie B o 26% w odniesieniu do próby kontrolnej. Białko to nie wykazało stabilności przechowalniczej. Podczas 4-tygodniowego okresu przechowywania jaj aktywność cystatyny znacznie się obniżyła w obrębie wszystkich badanych grup. Najwyższy spadek aktywności cystatyny oznaczono w wariancie A, poziom ten obniżył się o 35% w porównaniu z białkiem świeżym.

Wzbogacanie diety niosek korzystnie wpłynęło na aktywność lizozymu w białku jaj. Poziomy aktywności enzymu w grupach B i C były wyższe niż w grupie kontrolnej. Najwyższą wartość aktywności lizozymu otrzymano w białku jaj pochodzących od kur skarmianych paszą z dodatkiem witamin A i E (wariant B).

Słowa kluczowe: nioski, jaja, cystatyna, lizozym, inhibitory proteinaz cysteinowych, humobentofet, humokarbowit

Mgr inż. A. Graszkwicz, dr inż. M. Kaźmierska, mgr J. Niedbalska, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

Wprowadzenie

Jajo jest największą komórką, która zawiera informację genetyczną oraz wiele substancji niezbędnych do rozwoju nowego życia. Jest więc ono biologiczną kompozycją, w skład której wchodzi substancje odżywcze, takie jak: białka, tłuszcze witaminy i związki mineralne oraz biologicznie aktywne białka pełniące funkcję ochronną przed drobnoustrojami rozwijającego się zarodka [4, 9]. Wśród tych ostatnich należy wymienić lizozym, owomukoid, owoinhibitor, cystatynę i awidynę. Szczególnie interesujące są: lizozym i cystatyna. Lizozym jest zasadowym białkiem globularnym o masie cząsteczkowej 14 300 Da. U różnych gatunków ptaków zidentyfikowano odmienne formy tego białka, różniące się masą cząsteczkową oraz pochodzeniem gatunkowym ptaka. Lizozym typu c występuje w jajach ptaków grzebiących i kaczek, natomiast lizozym typu g w jajach gęsi i dzikiego ptactwa [4]. Lizozym wykazuje aktywność muramidazy i chitynazy, przez co ma właściwości bakteriobójcze. Białko to charakteryzuje się zdolnością flokulacyjną w wyniku oddziaływania elektrostatycznego do ujemnie naładowanej ściany komórkowej bakterii [10]. Lizozym ma zdolność inaktywacji wirusów poprzez wiązanie się z ich DNA. Dzięki trawieniu pozostałości ścian uszkodzonych bakterii lizozym prowadzi do powstania antygenowych fragmentów glikopeptydowych, które inicjują formowanie się przeciwciał [5, 6, 9, 12].

Cystatyna wykazuje właściwości bakteriobójcze i antywirusowe [6]. Należy do rodziny endogennych inhibitorów proteinaz cysteinowych [13]. Białko to wykazuje silne działanie inhibitorowe w stosunku do ficyny i papainy, ponadto wykazuje zdolność inhibowania bromelainy i katepsyn: B, H i L. Szczególnie ważną funkcją cystatyny jest wewnątrzkomórkowa i zewnątrzkomórkowa kontrola rozkładu białek [1]. Stąd też cystatyna cieszy się dużym zainteresowaniem w klinicyście. Badania naukowe wskazują, że cystatyna wyizolowana z białka jaj kurzych, poprzez hamowanie ekspresji katepsyn B i L w inwazyjnych komórkach nowotworowych szczurów, może być rozważana jako alternatywa dla leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej [9, 12].

Synteza białek w jaju jest determinowana przez informację genetyczną zawartą w DNA [3]. Może ona jednak podlegać modelowaniu przez substancje dostarczone w diecie. Modyfikacja sposobu żywienia niosek wpływa więc na poziom syntezy poszczególnych białek. Przemysł żywnościowy ukierunkowany jest na poszukiwanie nowych czynników przedłużających trwałość produktów spożywczych. Lizozym i nystatyna, jako substancje o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i antywirusowych, mogą znaleźć zastosowanie jako środki ochronne w procesach utrwalania żywności oraz w preparatach farmaceutycznych [2, 14].

Celem przedstawionej pracy było określenie wpływu żywienia niosek paszą standardową wzbogaconą preparatami mineralno-huminowymi oraz przeciwutleniaczami (wit. A i E) na aktywność lizozymu i cystatyny.

Materiały i metody badań

Materiałem doświadczalnym były jaja pochodzące od trzech grup niosek linii Tetra SL skarmianych: A (grupa kontrolna) paszą standardową zawierającą 17% białka, 2700 kcal/kg; B z dodatkiem witamin: A i E (kolejno: 10 000 j/kg i 20 mg/kg paszy) i C z dodatkiem 2% humobentofetu (HB) i humokarbowitu (HK) oraz witamin A i E (w ilościach jw.). Eksperyment przeprowadzono na jajach świeżych oraz przechowywanych przez 4 tygodnie w temp. 15°C.

Aktywność lizozymu oznaczano metodą densymetryczną, mierząc zmiany absorbancji standardowej liofilizowanej zawiesiny ściany komórkowej bakterii *Micrococcus lysodeicticus* (Sigma) podczas reakcji z lizozymem. Reakcję prowadzono przez 6 min w temp. 25°C, mierząc absorbancję przy $\lambda=450$ nm, co 60 s w trakcie trwania reakcji. Jednostkę enzymatycznej aktywności lizozymu stanowiła zmiana absorbancji zawiesiny o wartość 0,0001 w ciągu 1 min.

Inhibitorową aktywność cystatyny oznaczano metodą Nishida i wsp. [7] oraz Siewińskiego [8]. Metoda ta polega na kolorymetrycznym pomiarze produktów powstałych w wyniku enzymatycznej reakcji papainy z BANA (N-bezoil-DL-arginyl- β -naphtylamide hydrochloride), będącym substratem. Reakcję prowadzono przez 20 min w temp. 37°C. Po tym czasie działanie enzymu hamowano roztworem 9,10-dimethyl-1,2-benzoantracenu w kwasie octowym. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 450$ nm. Za jedną jednostkę aktywności inhibitorowej cystatyny uznano ilość hamującą jedną jednostkę aktywności papainy, tj. taką ilość enzymu, która hydrolizuje 1,0 mmol substratu w ciągu 1 min w opisanych powyżej warunkach.

Analizę wyników przeprowadzono w programie Statistica wersja 6.0, przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA), na poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Modyfikacja składników paszy w żywieniu niosek wywarła znaczący wpływ na poziom aktywności cystatyny i lizozymu zarówno w świeżym, jak i przechowywanym białku jaja. Najwyższą aktywność cystatyny (421 j/100 mg) oznaczono w białku jaj od kur żywionych paszą standardową (grupę kontrolną tab. 1). Wzbogacenie paszy w witaminy A i E wraz z preparatami mineralno-huminowymi (wariant B) lub tylko w witaminy A i E (wariant C), spowodowało obniżenie poziomu inhibitorowej aktywności cystatyny o ok. 27%.

Podczas 4-tygodniowego przechowywania jaj aktywność cystatyny znacznie obniżyła się, szczególnie w jajach grupy kontrolnej (o ok. 35% w porównaniu z białkiem świeżym). Ujemny wpływ procesu przechowywania jaj na inhibitorową aktywność cystatyny stwierdzono w badaniach wykonanych przez Kopcina i wsp. [6], w których aktywność cystatyny podczas 2-tygodniowego przechowywania jaj, pochodzących od

niosek skarmianych paszą standardową, obniżyła się o 7,4%, a po 4 tygodniach odnotowano dalszy spadek aktywności o 88,6%. Badania te mogą wskazywać na słusność teorii, według której inhibitory proteinaz cysteinowych uczestniczą w mechanizmach ochronnych żółtka stanowiącego rezerwuuar substancji odżywczych oraz rozwijającego się zarodka, a ich zawartość zmniejsza się podczas przechowywania jaj [11].

W przypadku lizozymu wzbogacenie paszy standardowej w witaminy wykazujące właściwości przeciwutleniające korzystnie wpłynęło na jego aktywność w jajach świeżych (tab. 2). Najwyższy poziom aktywności lizozymu, wynoszący 123383 j/100 mg, oznaczono w białku jaj pochodzącym od kur skarmianych paszą z dodatkiem witaminy A i E (wariant B). Natomiast wprowadzenie do paszy substancji mineralno-huminowych nie wpłynęło istotnie na poziom aktywności enzymu. Wyższe poziomy aktywności lizozymu otrzymane w białku jaj, podczas dostarczania nioskom witamin A i E, mogą być wynikiem ochronnego działania tych przeciwutleniaczy w stosunku do substancji tłuszczowych uczestniczących w przemianach metabolicznych, których wynikiem jest obecność estrogenów w serum krwi ptaka. Z kolei estrogeny wpływają na różnicowanie się komórek jajowodu produkujących albuminy i lizozym białka [9, 15].

Tabela 1

Aktywność cystatyny w białku jaj świeżych i przechowywanych w zależności od modyfikacji żywienia. Cystatin activity in fresh and stored egg white in relation to hens feed modification.

Warianty doświadczenia Experiment variants	Parametr statyst. Statistical parameter	Inhibitorowa aktywność cystatyny [j/100 mg białka] Cystatin activity [units/100 mg protein]	
		jaja świeże fresh eggs	jaja przechow. 4 tyg. stored for 4 weeks eggs
A (grupa kontrolna) (control)	\bar{x} SD	421 ^d 14,4	251 ^a 19,1
B (wit. A + E) (vitamins A+E)	\bar{x} SD	306 ^c 19,5	274 ^b 53,1
C (2% humobentofet (HB), humokarbowit (HK), wit. A + E) (2% humobentofet, humocarbovite vitamins A+E)	\bar{x} SD	310 ^c 21,1	288 ^{b,c} 17,7

Objaśnienia: / Explanatory notes:

x – wartość średnia / mean value; SD- odchylenie standardowe / standard deviation;

a, b, c, d – grupy statystycznie jednorodne przy poziomie istotności $p = 0,05$ / the same letter in indices of mean values shows no significant differences at $p = 0.05$.

Tabela 2

Aktywność lizozymu w białku jaj świeżych i przechowywanych w zależności od modyfikacji żywienia.
Lysozyme activity in fresh and stored egg white in relation to hens feed modification.

Warianty doświadczenia Experiment variants	Parametr statyst. Statistical parameter	Inhibitorowa aktywność lizozymu [j/100 mg białka] Inhibitorial Lysozyme activity [units/100 mg protein])	
		jaja świeże fresh eggs	jaja przechow. 4 tyg. stored for 4 weeks eggs
A (grupa kontrolna) (control)	\bar{X} SD	109 750 ^e 4 548	116 483 ^{f,g} 6 294
B (wit. A + E) (vitamins A+E)	\bar{X} SD	123 383 ^h 4 826	119 975 ^{g,h} 2 831
C (2% humobentofet (HB), humokarbowit (HK), wit. A + E) (2% humobentofet, humocarbovite vitamins A+E)	\bar{X} SD	113 592 ^{e,f} 6 705	110 692 ^e 4 270

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Lizozym wykazał większą stabilność podczas przechowywania niż cystatyna. Najniższą aktywność tego białka po 4 tygodniach przechowywania uzyskano w przypadku jaj pochodzących od niosek skarmianych paszą wzbogaconą w HB i HK z wit. A i E (wariant C).

Wnioski

1. Dodatek humobentofetu, humokarbowitu i witamin A i E do pasz wpłynął na obniżenie poziomu aktywności cystatyny w jajach świeżych.
2. W trakcie 4-tygodniowego przechowywania jaj następował spadek aktywności cystatyny w białku, szczególnie jeśli nioski były żywione paszą standardową.
3. Obecność witamin A i E w diecie niosek wpłynęła korzystnie na poziom aktywności lizozymu w białku jaj.

Przedstawione wyniki stanowią fragment badań realizowanych w ramach projektu rozwojowego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr R1201401. Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

Literatura

- [1] Barrett A. J.: Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods Enzymol.*, 1981, **80**, 771-778.
- [2] Cunningham F. E., Proctor V. A., Goetsch S. J.: Egg white lysozyme as food preservative. An overview. *World's Poultry Sci. J.*, 1991, **47**, 141-163.
- [3] Grashorn M. A.: Enrichment of eggs and poultry meat with biologically active substances by feed modifications and effects on the final quality of the product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, SI 1, 15-20.
- [4] Kaźmierska M., Jarosz B., Korzeniowska M., Trziszka T., Dobrzański T.: Comparative analysis of fatty acid profile and cholesterol content of egg yolks of different bird species. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, SI 1, 69-73.
- [5] Kopeć W., Trziszka T.: Lizozym i jego charakterystyka. Cz. 2. Izolacja i możliwości praktycznego wykorzystania. *Przem. Spoż.*, 1997, **3**, 36-37.
- [6] Kopeć W., Skiba T., Korzeniowska M., Bobak Ł., Trziszka T.: Activity of protease inhibitors and lysozyme of hen's egg white depending on feed modification and egg storage. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, SI 1, 79-83.
- [7] Nishida Y., Sumi H., Mihara H.: A thiol protease inhibitor released from cultured human malignant melanoma cells. *Cancer Res.*, 1984, **44**, 3324-3329.
- [8] Siewiński M.: Method of purification of thiol proteinase inhibitors from human urine. *Cancer Biochem. Biophys.*, 1991, **12**, 33-44.
- [9] Trziszka T.: Budowa i skład chemiczny jaja. W: *Jajczarstwo, Nauka, Technologia, Praktyka* - red. T. Trziszka, Wyd. AR we Wrocławiu., 2000, s. 147-188.
- [10] Trziszka T.: Naturalne bariery obronne jaj kurzych. 2002, www.ppr.pl
- [11] Trziszka T., Saleh Y., Kopeć W., Siewiński M., Węsierska E.: Effect of hen's age on the level of cystatin in the chicken egg white. *Int. J. Poultry Sci.*, 2004, **3**, 471-477.
- [12] Trziszka T., Kopeć W., Skiba T., Dobrzański T.: Proteinases activity inhibitors in the egg white depending on various housing systems of egg layers. *Proc. XII Europ. Poultry Conference Verona-Italy WPSA 2006*, CD
- [13] Turk V., Bode W.: The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.*, 1991, **285**, 213-219.
- [14] Węsierska E., Saleh Y., Trziszka T., Kopeć W., Siewiński M.: Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. *World J. Biotechnol. Microbiol.*, 2005, **22**, 59-64.
- [15] Whitehead C. C., Bowman A. S., Griffin H. D.: Regulation of plasma oestrogen by dietary fats in the laying: relationships with egg weight. *Br. Poult. Sci.*, 1993, **34**, 999-1010.

THE EFFECT WITH MINERAL-HUMINE PREPARATIONS AND ANTIOXIDANTS ADDITION TO FEED ON THE ACTIVITY OF LYSOZYME AND CYSTATIN IN EGG WHITE

S u m m a r y

The aim of this paper was to recognise the effect of feed modification, with standard feeding enriched with mineral-humine preparations and antioxidants (vit. A + E) on the activity of lysozyme and cystatin.

Experimental materials were eggs from 3 groups of Tetra SL laying hens: A control group with standard feeding (17% protein, 2700 kcal/kg); B with addition vitamins A (10 000 unit/kg) and E (20 mg/kg); C with addition 2% humobentofet (HB), humocarbovit (HK) and vitamins A +E. Experiment occurred

fresh Eggs stored 4 weeks at 15°C. Lysozyme activity was analysed spectrophotometrically by measuring changes in optical density of *Micrococcus lysodeicticus* solution during enzymatic lysozyme reaction. Inhibitory activity of cystatin was measured according to Nishida *et al* [7] and Siewiński [8].

Differential feeding significantly affected the level of cystatin activity in fresh egg white. In control group (A) this activity was the highest (421 units/100 mg protein). Lower cystatin activity was estimated in eggs from groups B and C laid by hens with enriched feeding. In group C this activity was lower on about 26.2% and in group B on 26% in comparison to control group. This protein did not have storage stability. The activity of cystatin in all samples decreased during storage for 4 weeks. The highest decrease of cystatin activity (35% related to fresh egg white) was analysed in group A.

Feeding modification had a positive effect on lysozyme activity in fresh egg white. The level of lysozyme enzymatic activity was higher in groups B and C than in control group. The highest lysozyme activity was obtained in egg white derived from layers fed with vitamins A and E (group B).

Key words: laying hens, eggs, cystatin, lysozyme, cysteine protease inhibitors, humobentofet, humocarbovite ☒