



INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Maciej Szpak

Ocena aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny
białka jaja kurzego.

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Adam Malicki, prof. nadzw. UP

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta

Wrocław 2013



INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Praca wykonana w ramach realizacji projektu nr POIG
01.03.01-00-133/08 pt.: "Innowacyjne technologie produkcji
biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA)"
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju
Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna
Gospodarka.

SPIS TREŚCI

I.WSTĘP	1
1. Wprowadzenie	1
2. Cystatyna białka jaja	8
3. Bezpieczeństwo żywności	16
II.CEL PRACY	21
III.MATERIAŁ I METODY	22
IV.WYNIKI	27
1. Minimalne stężenie hamujące (MIC)	27
2. Krzywe przeżycia szczepów testowych	37
V. ANALIZA STATYSTYCZNA	82
VI.DYSKUSJA	92
1. Minimalne stężenie hamujące (MIC)	92
2. Krzywe przeżycia szczepów testowych	98
VII. WNIOSKI	102
VIII. STRESZCZENIE	103
IX. SUMMARY	107
X. DOKUMENTACJA PRACY	111
1. Spis tabel	111
2. Spis rycin	112
XI. BIBLIOGRAFIA	116

I. WSTĘP

1. Wprowadzenie

Jaja są elementem rozrodczym umożliwiającym rozwój ptaków poza organizmem rodzicielskim. Jaja zawierają informację genetyczną oraz substancje niezbędne do rozwoju zarodka, takie jak: białka, tłuszcze, związki mineralne i witaminy. Warstwowa budowa jaj chroni je przed zagrożeniami środowiska zewnętrznego oraz przed rozwojem drobnoustrojów. Funkcję ochronną jaj pełnią skorupka z kutikulą, błony podskorupkowe, białko jaja i błona witelinowa. Warstwowa budowa jaj wspomaga również naturalne mechanizmy ochronne poprzez kontrolę migracji drobnoustrojów w treści jaj oraz umożliwia dyfuzję związków i energii pomiędzy komórką jaja i środowiskiem zewnętrznym.

Jaja ptaków są istotnym elementem diety człowieka. Jako środek spożywczy, stanowią źródło składników odżywczych, takich jak białka, fosfolipidy, witaminy, związki mineralne i kwasy tłuszczowe, w tym nienasycone kwasy tłuszczowe z grupy omega-3 i omega-6. Jajo kurze jako produkt pochodzenia zwierzęcego kojarzone jest głównie jako prosty, wręcz archaiczny składnik pożywienia. Intensywny rozwój procesów przetwórstwa jaja umożliwił wyizolowanie poszczególnych jego składników w formie aktywnych związków lub półproduktów do ich otrzymania. W celach tych wykorzystuje się najczęściej techniki oparte na metodach chromatografii, reakcjach enzymatycznych lub innych metodach biologii molekularnej. Jaja kurze są dzięki temu źródłem wielu związków biologicznie aktywnych, tj. substancji o właściwościach regulujących procesy metaboliczne w komórkach ludzkich i zwierzęcych. Związki te, do których należą m.in. białka, peptydy, lipidy, witaminy, enzymy oraz hormony, charakteryzują się szeroko pojętym działaniem nutraceutycznym i prozdrowotnym, obejmującym m.in. aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwnowotworową oraz immunomodulacyjną (Kovacs-Nolan i wsp., 2005). Podjęto również próby włączenia ich w profilaktykę chorób cywilizacyjnych i metabolicznych (Mine, 2007). Aktywne biologicznie związki pochodzące z jaj znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, m.in. w farmacji, medycynie, biotechnologii oraz mikrobiologii.

Do najważniejszych substancji o takim działaniu zalicza się lizozym, owomukoid, owoalbuminę, awidynę, owotransferynę, immunoglobuliny, fosfolipidy oraz cystatynę.

1.1. Aktywne związki jaj

Główne źródło aktywnych związków pochodzących z jaj stanowią białka oraz peptydy. Ze względu na dostępność surowca, metody ekstrakcji i dobrą rozpuszczalność, białka jaja są dobrze poznane (Gołąb i Warwas, 2005). Białka jaj pełnią wiele funkcji. Odpowiedzialne są za utrzymywanie struktury jaja, wiązanie i transport witamin oraz mikroelementów (Stevens, 1991). Do białek jaj należą również inhibitory proteaz, enzymy proteolityczne oraz immunoglobuliny. Białka jaja posiadają również wysoką wartość odżywczą i uważane były za standard w ocenie jakości białek innych produktów spożywczych (Trziszka, 2000). Intensywny rozwój nauk przyrodniczych pozwolił na poznanie składu jaj. Ze względu na budowę i skład chemiczny jaja, jego białka dzieli się na proteiny części białkowej oraz białka żółtka. Białko jaja posiada niejednorodną, warstwową budowę, tworząc koloidalną mieszaninę polipeptydów i wody. Wśród jego substancji bioaktywnych na uwagę zasługują owoalbumina, która stanowi 54% protein białka jaja, konalbumina (13%), owomukoid (11%), globiliny (8%), lizozym (3,5%) oraz cystatyna (0,05%). Żółtko natomiast zawiera szereg substancji odżywczych niezbędnych dla rozwoju zarodka. Pod względem strukturalnym żółtko to układ zemulgowanych kompleksów białkowo – lipidowych.

Opracowanie innowacyjnych technik izolacji z jaj poszczególnych związków aktywnych umożliwiło zastosowanie ich w aspektach innych niż kulinarne. W związku z powyższym jaja ptaków stały się źródłem istotnych biologicznych substancji mogących znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny. Jednak tylko nieliczne z nich produkowane są na skalę przemysłową. Spowodowane jest to najczęściej skomplikowanymi i kosztownymi procesami wyodrębniania aktywnych biologicznie związków z jaja, co sprawia, że wiele z nich otrzymywanych jest wyłącznie na skalę laboratoryjną. Dzięki rozwojowi technik molekularnych, polegających na trawieniu poszczególnych części białkowych, istnieje możliwość modyfikacji funkcji poszczególnych aktywnych peptydów (Pellegrini i wsp., 2004).

Do aktywnych związków jaja kurzego należy lizozym. Jest to dobrze poznane białko globularne o wysokiej aktywności enzymatycznej. Występuje powszechnie w tkankach ludzkich, zwierzęcych i roślinnych, w płynach ustrojowych i bakteriofagach. Obecny jest w ślinie, łzach, mleku oraz jajach kurzych. Związek odkryty przez Fleminga w 1922 roku jest jednym z czynników nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Lizozym to związek o masie cząsteczkowej 14,4 kDa, który zbudowany jest z 129 aminokwasów.

Dzięki obecności mostków siarczkowych w cząsteczce, lizozym jest enzymem termostabilnym, którego działanie utrzymuje się przez 1-2 minuty w temperaturze 100°C przy pH nie wyższym od 8,5. Działanie lizozymu (N-acetylmuramylohydrolazy) polega na hydrolizie wiązań beta-glikozydowych pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą peptydoglikanu w ścianach komórek bakterii Gram-dodatnich, czego rezultatem jest rozpad komórki bakteryjnej (Kowalska, 1989). Bakterie Gram-ujemne, ze względu na budowę struktur ściennych, są bardziej odporne na jego działanie. Dodatek czynników chelatujących, dezintegrujących lipopolisacharydową strukturę błony komórkowej, umożliwia skuteczne działanie lizozymu na komórki bakterii Gram-ujemnych (Pellegrini i wsp., 1992). Uzyskuje się to również poprzez skojarzone działanie lizozymu z niziną, laktoferyną, glicyną oraz kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) (Yuste i wsp., 2000). Aktywność przeciwbakteryjna lizozymu wobec bakterii Gram-ujemnych wzrasta także poprzez skojarzone działanie enzymu z działaniem wysokiej temperatury oraz ciśnienia. Wykazano też przeciwwgrzybiczą aktywność lizozymu wobec *Candida albicans*, co może stanowić alternatywę dla innych środków przeciwwgrzybiczych (Węsierska, 2006). Lizozym wykorzystywany jest także jako czynnik przeciwwirusowy i przeciwnowotworowy. Opisano jego udział w ochronie błon komórkowych przed transformacją nowotworową (Trziszka, 2000). Przeciwwirusowa aktywność N-acetylmuramylohydrolazy, polega na inaktywacji wirusów poprzez ich precypitację oraz na stymulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez syntezę interferonu (Trziszka, 2000). Właściwości te wykorzystywane są w leczeniu skórnych zakażeń wirusowych (opryszczka, ospa wietrzna). W medycynie weterynaryjnej dimer lizozymu stosowany jest powszechnie jako stymulator układu odpornościowego oraz wspomaganie antybiotykoterapii. Zastosowanie lizozymu w leczeniu z wykorzystaniem chemioterapeutyków zapobiega pojawianiu się endotoksyn we krwi w przypadku posocznicy leczonej antybiotykami (Gołąb i Warwas, 2005). Ze względu na niską masę cząsteczkową i związaną z tym możliwość przenikania lizozymu przez bariery nerek, podjęto próby jego zastosowania jako substancji pomocniczej w celowanym transporcie leków do nerek. Oczekuje się, że rozwiązanie to może umożliwić w przyszłości leczenie innych schorzeń zależnych od filtracji nerkowej, w tym chorób sercowo – naczyniowych (Trziszka, 2000; Kopeć i wsp., 2005).

Cenne źródło lizozymu stanowi białko jaja kurzego, gdzie lizozym stanowi ok. 3,5% jego suchej masy. Na skalę przemysłową lizozym wykorzystywany jest w Japonii do konserwacji mięsa i produktów mięsnych, ryb i ich przetworów, mleka i produktów mleczarskich, świeżych owoców i warzyw, owoców morza, wina i sake. Lizozym stosowany jest również przy produkcji piwa, gdzie odpowiada za kontrolę wzrostu drobnoustrojów (Silvetti i wsp., 2010).

Pozostałe, istotne ze względu na biologiczną aktywność proteiny białka jaja kurzego, tj. owoalbumina, owotransferyna (konalbumina), owoinhibitor, owomucyna i awidyna, stanowią przedmiot aktualnych badań naukowych. Pełnią funkcje transportowe, stabilizujące, stanowią źródło peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wykorzystywane są w testach diagnostycznych i transporcie leków (Trziszka, 2000; Mine, 2008).

Owoalbumina (OVA) stanowi ponad połowę wszystkich protein białka jaja kurzego (Sugimoto i wsp., 1999). Pomimo iż białko to zostało jako jedno z pierwszych wyizolowane z jaja kurzego, jego biologiczna funkcja pozostaje nieznana (Huntington i Stein, 2001). Znajduje zastosowanie w badaniach laboratoryjnych jako modelowe białko wywołujące odpowiedź immunologiczną. Wykazano aktywność antymutagenną owoalbuminy poddanej denaturującemu działaniu ciepła (Vis i wsp., 1998). Poprzez trawienie owoalbuminy za pomocą trypsyny, zsyntetyzowano peptydy o silnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym wobec *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* oraz *Candida albicans* (Pellegrini i wsp., 2004).

Owotransferyna jest głównym składnikiem systemu obrony przeciwbakteryjnej jaja kurzego poprzez wiązanie jonów żelaza, które stają się nieprzyswajalne dla niektórych drobnoustrojów, np. z rodzaju *Pseudomonas*. Owotransferyna posiada również właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Wykazano jej aktywność przeciw wirusowi choroby Mareka (Giansanti i wsp., 2002) oraz przeciw grzybom z rodzaju *Candida* (Valenti i wsp., 1985). Owotransferyna, dzięki właściwościom chelatowania jonów żelaza, wydaje się być ważnym czynnikiem w przełamywaniu oporności na cefalosporyny. Stwierdzono jej aktywność przeciwbakteryjną wobec *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Salmonella enteritidis* (Abdallah i Chahine 1999).

Wyosobniony z niej peptyd OTAP92 wykazał aktywność przeciwbakteryjną wobec *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli* (Ibrahim, 2000).

Glikopeptydy powstałe z owomucyny białka jaja wykazują właściwości przeciwnowotworowe wobec komórek guza u myszy (Watanabe i wsp., 1998). Owomucyna odpowiada za utrzymanie struktury i lepkości białka jaja, co zapobiega rozprzestrzenianiu się w nim drobnoustrojów (Lyndrup, 1973). Udowodniono również przeciwwirusową aktywność owomucyny wobec wirusa choroby Newcastle, rotawirusa bydła i ludzkiego wirusa grypy (Mine i Kovacs-Nolan, 2005).

Awidyna to kolejne białko o interesującej funkcji biologicznej. Podobnie jak cystatyna, awidyna stanowi zaledwie 0,05% wszystkich protein jaja kurzego. Awidyna posiada zdolność wiązania biotyny. Jest to jedna z najsilniejszych interakcji między białkiem i ligandem. Hamuje zatem rozwój bakterii, których wzrost uzależniony jest od obecności biotyny.

Prowadzone są obecnie badania nad możliwością wykorzystania naturalnych peptydów jaj kurzych jako potencjalnych leków (Gołąb i Warwas, 2005; Mine, 2008). Owomukoid testowany jest jako związek pomocniczy w doustnej aplikacji leków białkowych i polipeptydowych, np. insuliny, co w przyszłości może stanowić alternatywę dla aplikacji insuliny drogą iniekcyjną (Gołąb i Warwas, 2005).

Właściwości przeciwbakteryjne białka jaja kurzego potwierdziły badania, w których wykazano hamowanie wzrostu bakterii Gram-dodatnich wprowadzonych do białka jaja kurzego. Skuteczność przeciwbakteryjna białka jaja zależy jednak od liczby wprowadzonych komórek bakteryjnych. Wykazano, że białko jaja kurzego hamuje rozwój wprowadzonych bakterii Gram-dodatnich w temperaturze 7°C przez 1-3 miesiące, w temperaturze 20°C przez 1-2 miesiące, natomiast efekt hamujący w temperaturze 37°C utrzymywał się 1-4 tygodnie (Malicki, 2000).

Żółtko jaja również zawiera szereg substancji biologicznie aktywnych. Należą do nich lipoproteiny, a wśród nich fosfolipidy, głównie fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina. Fosfatydylocholina (lecytyna) bierze udział w regulacji stężenia cholesterolu we krwi zmniejszając ryzyko wystąpienia chorób serca i miażdżycy. Lecytyna żółtka jaja kurzego, ze względu na skład chemiczny, w tym obecność życiodajnych długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, jest bardziej wartościowa od lecytyn pochodzenia roślinnego, które pozbawione są tych kwasów.

Kwas arachidonowy (AA) wpływa na stabilność błon komórkowych, natomiast kwas dokozaheksaenowy (DHA) niezbędny jest do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Obecnie prowadzone są badania nad możliwością zastosowania lecytyny w leczeniu indukowanych chorób układu sercowo - naczyniowego u świń, z czym wiąże się nadzieje na wykorzystanie preparatów zawierających cystatynę w leczeniu chorób serca u ludzi (Nicpoń i wsp., 2013a).

Cenne właściwości biologiczne posiada również frakcja liwetynowa żółtka jaja. W jej skład wchodzi Immunoglobulina Y (IgY) oraz szereg peptydów o potencjalnych właściwościach hamujących zmiany degeneracyjne układu nerwowego. IgY odpowiada za bierną odporność zarodka do momentu wykształcenia się jego układu immunologicznego. Dzięki rozwojowi technik immunizacji kur oraz metod oczyszczania immunoglobulin, możliwa stała się produkcja dużych ilości immunoglobuliny IgY, która znalazła zastosowanie w medycynie. Preparat immunoglobuliny otrzymywany jest z jaj kurzych w wyniku wcześniejszej immunizacji kur. Zwiększa to ilości uzyskiwanych przeciwciał, a sam proces jest bardziej opłacalny i mniej inwazyjny niż pozyskiwanie przeciwciał od immunizowanych myszy i szczurów. Immunoglobulina IgY wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe. Opisano próby jej zastosowania w leczeniu zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych. Wykazano jej aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Helicobacter pylori* (Hodek i Stiborowa, 2003). IgY znalazła również zastosowanie w immunologii, gdzie wykorzystywana jest w wielu testach diagnostycznych, np. w teście ELISA (Van Coillie i wsp., 2004).

W kontekście działania terapeutycznego, istotną rolę przypisuje się również ubocznym produktom pochodzącym z przetwórstwa przemysłowego jaj, jakimi są skorupy jaj z błonami podskorupowymi. Mogą one stanowić surowiec do produkcji wapniowych suplementów diety wykorzystywanych w leczeniu i profilaktyce osteoporozy (Sosnowska i wsp., 2011).

1.2. Znaczenie związków jaja w przemyśle spożywczym

Ze względu na liczne właściwości substancji zawartych w jajach oraz dynamiczny rozwój technik pozyskiwania i izolacji związków aktywnych z jaj, rozwija się gałąź przemysłu oparta na bioaktywnych substancjach o szerokim spektrum aplikacyjnym. Wiele z tych związków znalazło zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Białka jaja z powodzeniem stosowane są jako substancje wiążące w wyrobach cukierniczych. Zmodyfikowana albumina jaja hamuje niekorzystne zmiany lipooksydacyjne w produktach żywnościowych. Lizozym białka jaja kurzego, w połączeniu z innymi czynnikami przeciwbakteryjnymi, może być wykorzystywany jako naturalny środek konserwujący żywność. Udokumentowano rolę lizozymu w przedłużeniu trwałości mięsa drobiowego, przetworów mlecznych oraz rybnych, gdzie biopreparat lizozymu hamuje wzrost bakterii *Listeria monocytogenes* (Hughey i wsp., 1989). Komercyjny preparat mieszaniny lizozymu i glicyny w stężeniu 1,5% znalazł zastosowanie w przedłużeniu trwałości sałatki ziemniaczanej do 45 godzin w temperaturze 35-37°C (Trziszka, 2000). Lizozym znalazł także zastosowanie w biokonserwacji salami, kiełbas parzonych, mięsa mielonego i serów. Enzym ten wykorzystano również w procesach dojrzewania serów, gdzie poprzez lizę bakterii przyspieszał procesy dojrzewania serów. Udowodniono również skuteczność roztworów lizozymu w ochronie stabilności mikrobiologicznej surowego mięsa drobiowego podczas jego przechowywania (Malicki i wsp., 2011). Lizozym w połączeniu z octanem sodu redukował liczbę bakterii z grupy *coli* oraz *Escherichia coli* przedłużając tym samym trwałość mięsa drobiowego pakowanego próżniowo i przechowywano w warunkach chłodniczych (Malicki i wsp., 2010).

Lizozym białka jaja kurzego zastosowany również został jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy w opakowaniach żywności, gdzie chronił przed rozwojem drobnoustrojów w trakcie jej przechowywania (Kandemir i wsp., 2005).

Żółtko jaja jest również źródłem związków mających zastosowanie w przemyśle spożywczym. Lecytyna żółtka wykorzystywana jest do stabilizowania i emulgowania układów dyspersyjnych. Fosfityna posiada zdolności chelatowania jonów żelaza i miedzi ograniczając niepożądany wpływ procesów oksydacji na produkty spożywcze.

2. Cystatyna białka jaja

Cystatyna białka jaja kurzego jest dobrze poznanym białkiem, należącym do rodziny inhibitorów proteinaz cysteinowych (Bode i wsp., 1988). Cystatyny tworzą grupę białek szeroko rozpowszechnionych w komórkach ludzkich, zwierzęcych, a także w świecie roślin - fitocystatyny (Turk i wsp., 2008; Urwin i wsp., 2003). Inhibitory te występują w wielu tkankach i płynach ustrojowych, m.in. w osoczu krwi, mleku, łzach, ślinie, moczu oraz płynie mózgowo – rdzeniowym. Cystatyna występuje w białku i żółtku jaja. Po raz pierwszy została opisana w 1968 roku przez badaczy Fossum i Whitaker (Saxena i Tayyab, 1997). Jest pierwszym i najlepiej poznanym inhibitorem proteaz cysteinowych rodziny papainowej. Stanowi zaledwie 0,05% składu białka jaja. Cystatyny tworzą ewolucyjnie związaną ze sobą tzw. nadrodzinę cystatyn (Ochieng, Chaudhuri, 2010). Z uwagi na lokalizację oraz wielkość i strukturę łańcuchów polipeptydowych cystatyny możemy podzielić na trzy rodziny: I – Stefiny obecne głównie w cytozolu komórki, II – Cystatyny występujące w płynach ustrojowych, III – Kininogeny obecne w surowicy krwi, innych płynach ustrojowych, a także komórkach nowotworowych (Zavasnik-Bergant, 2008). Stefiny występują przede wszystkim wewnątrz komórek, zawierają około 100 reszt aminokwasowych (około 11 KDa). Druga podrodzina cystatyn, do której zaliczana jest cystatyna białka jaja kurzego, to białka występujące głównie w płynach ustrojowych i tkankach. Zawierają one około 120 aminokwasów (około 14 KDa). Obok kurzej cystatyny, do drugiej podrodziny zalicza się dobrze poznane ludzką cystatynę C oraz szczurzą cystatynę S. Trzecia podrodzina cystatyn – kininogeny to związki o większej masie cząsteczkowej około 60 -120 KDa.

Cystatyna składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zbudowanego ze 116 reszt aminokwasowych, o masie 13131Da oraz posiada dwa wiązania dwusiarczkowe. Zawiera trzy wysoce konserwatywne domeny, które warunkują właściwości inhibicyjne wobec proteinaz cysteinowych. Jest białkiem stabilnym w warunkach wysokiej temperatury i szerokiego zakresu pH (Žerovnik i wsp., 1997). Zasadniczym problemem jest izolacja cystatyny z białka jaja kurzego i zapewnienie jej trwałości. Cystatyna nie traci aktywności podczas 30 - minutowego ogrzewania w temperaturze 100°C, natomiast zamrażanie i liofilizacja powodują istotny spadek jej aktywności. Z tego powodu uzyskany z jaj preparat cystatyny stabilizuje się 20% glicerolem lub liofilizuje jego zbuforowany roztwór o pH 7,5.

W białku jaja cystatyna występuje w dwóch immunologicznie identycznych formach: ufosforylowanej o pI 5,6 i nieufosforylowanej o pI 6,5. Udział procentowy obu form wynosi odpowiednio: cystatyna o pI 6,5 = 63%, cystyna o pI 5,6 = 37%. Cystatyna białka jaja kurzego zaliczana jest do białek podlegających procesowi oligomeryzacji poprzez zjawisko wymiany domen, tzw. 3D domain swapping. W wyniku procesu wymiany domen dochodzi do powstania dimerów, a następnie polimerów cystatyny o właściwościach amyloidu, co powoduje utratę jej właściwości biologicznych (Gołąb i wsp., 2012). Cystatyna zaliczana jest do białek występujących w jajach w niewielkich ilościach. Dlatego do jej wyodrębniania wykorzystuje się specyficzne techniki, takie jak ultrafiltracja, chromatografia powinowactwa oraz ogniskowanie izoelektryczne. Zawartość cystatyny w białku jaj kurzych zmienia się wraz z kolejnymi etapami rozwoju zarodka. Jej średnie stężenie wynosi około 80 mg/l. Znacznie mniejsza koncentracja cystatyny występuje w surowicy kurcząt oraz komórkach mięśniowych kur, gdzie jej stężenie wynosi około 1 mg/l. Zmniejsza się również zawartość cystatyny podczas przechowywania jaj, co jest wynikiem uczestnictwa inhibitorów proteinaz cysteinowych w mechanizmach ochronnych żółtka jaja. Koncentracja cystatyny jest wyższa białka jaj niezapłodnionych niż w jajach zapłodnionych. Na aktywność cystatyny wpływa również rodzaj paszy i sposób żywienia niosek (Graszkiewicz i wsp., 2007). Trziszka i wsp. (2004a; 2004b) badali wpływ wieku kur, warunki przechowywania jaj i obróbki termicznej białka na aktywność cystatyny. Najniższą aktywność cystatyny stwierdzono w jajach kur niosek poniżej 30. tygodnia życia lub powyżej 60. tygodnia życia. Najwyższą z kolei stwierdzono w jajach kur niosek w wieku od 40 do 50 tygodni. Aktywność cystatyny zmniejszyła się o 4-12% w jajach przechowywanych w temperaturze 15°C przez 28 dni. Czynnikiem obniżającym tę aktywność był również proces pasteryzacji jaj kurzych.

Główną funkcją cystatyn jest ochrona organizmu przed niekontrolowaną produkcją proteaz cysteinowych. Zdolności inhibicyjne cystatyny wobec proteaz cysteinowych po raz pierwszy zostały opisane dla cystatyny białka jaja kurzego (Gołąb i Warwas, 2005). Proteazy cysteinowe (nazywane także tiolowymi lub sulfhydrylowymi) to enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe z udziałem czynnej reszty cysteinowej w centrum katalitycznym. Rozszczepiają one polipeptydy, biorąc udział w obrocie metabolicznym wielu białek endo i egzogennych.

Cystatyna białka jaja, zaliczana do rodziny endogennych inhibitorów proteaz cysteinowych, wykazuje silne działanie inhibitorowe w stosunku do ficyny i papainy, bromelainy i katepsyn (Mine, 2008).

Cystatynie przypisuje się zdolność wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej kontroli rozkładu białek. Wykazuje silne właściwości inhibicyjne wobec enzymów produkowanych przez bakterie niszczące treść jaja. Główną jej funkcją jest ochrona jaja przed bakteryjnymi lub wirusowymi peptydazami cysteinowymi. Bakteryjne proteiny cysteinowe, jako aktywne proteolityczne enzymy pozakomórkowe, są bardzo istotnymi czynnikami zjadliwości bakterii.

Potencjalne zastosowanie cystatyny jako naturalnej substancji o działaniu prozdrowotnym związane jest z wykorzystaniem jej zdolności inhibitorowych w stosunku do lizosomalnych proteaz cysteinowych, w szczególności katepsyn B, H, K, L i S (Anastasi i wsp., 1983). Prawidłowa regulacja aktywności proteaz cysteinowych jest niezbędna w wielu procesach fizjologicznych, takich jak aktywacja prekursorów białek, prezentacja antygenów, przebudowa kości, różnicowanie keratynocytów, apoptoza, prezentacja antygenów (Sosnowska i wsp., 2011; Mine, 2008). Zaburzenia równowagi proteaza/inhibitor są m.in. przyczyną wielu chorób człowieka, m.in. nowotworów złośliwych, choroby Alzheimera, reumatoidalnego zapalenia stawów, dystrofii mięśni, osteoporozy, stwardnienia rozsianego i przewlekłych stanów zapalnych (Gołąb i wsp., 2012).

2.1. Aktywność cystatyny przeciw drobnoustrojom

Potencjalne zastosowanie cystatyny jako naturalnej substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym związane jest z wykorzystaniem jej zdolności inhibitorowych. Cystatyna występująca w białku oraz w niewielkiej ilości w żółtku jaja uczestniczy w procesach regulacyjnych podczas rozwoju zarodka, a także pełni funkcję ochronną przed bakteryjnymi i wirusowymi proteazami cysteinowymi, które zaangażowane są w mechanizm penetracji tkanek przez bakterie.

Cystatyna białka jaja okazała się być skutecznym środkiem przeciwbakteryjnym w stosunku do wybranych bakterii jamy ustnej. Badano jej aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych występujących w jamie ustnej, m.in.: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, oraz *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Gołąb i Warwas, 2005).

Jej działanie polega na łagodzeniu przebiegu stanów zapalnych przyzębia na drodze kompetycyjnego hamowania bakteryjnych tkankowych proteinaz cysteinowych (Warwas i wsp., 2000; Jankowska i wsp., 2007). Inaktywując proteiny z *Porphyromonas gingivalis*, cystatyna białka jaja kurzego już w stężeniu 1 μ M hamuje w 50% wzrost tych bakterii (Blankenvoorde i wsp., 1996). Bobek i wsp., 1991, stwierdzili odwrotną zależność między stężeniem cystatyny a głębokością kieszonek przyzębnych u pacjentów z zapaleniem przyzębia. Wzorując się na strukturze centrum aktywnego ludzkiej cystatyny C, zsyntetyzowano peptyd o nazwie Cystapep 1, który wykazywał aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do opornych na metycylinę szczepów *Staphylococcus aureus* oraz wieloopornych, koagulazoujemnych szczepów *Staphylococcus* (Jasir i wsp., 2003 i 2004). Cystatyna wyizolowana z hemocytów stawonogów posiada aktywność przeciwbakteryjną w stężeniu 80-100 μ g/ml wobec Gram-ujemnych bakterii *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* (Dickinson, 2002). Cystatyny są także skutecznym inhibitorem replikacji koronawirusów, które mogą powodować ostre zapalenie żołądka i jelit (Collins i Grubb, 1998). Cystatyna białka jaja kurzego posiada aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus spp.* należących do grupy A oraz *Salmonella typhimurium* (Mine i Kovacs-Nolan, 2004).

Cystatyna wykazuje również aktywność przeciwwirusową. Z tą cechą cystatyny wiąże się potencjalna możliwość zastosowania jej jako czynnika hamującego rozwój wirusa HIV (Kovacs-Nolan i wsp., 2005; Trziszka i wsp. 2004b). Cystatyna ludzka i kurza hamują proteazy stymulowane przez wirusa polio (wirus paralizu dziecięcego), co daje również nadzieję na wykorzystanie tego faktu w leczeniu chorób wirusowych (Arai i wsp., 1995).

Duże nadzieje wiąże się z potencjalną możliwością wykorzystania przeciwdrobnoustrojowych właściwości cystatyny w przemyśle spożywczym. Doniesienia na temat aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny białka jaja kurzego wobec drobnoustrojów odpowiedzialnych za psucie się żywności są nieliczne (Wesierska i wsp., 2005). Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na realną możliwość zastosowania cystatyny jako naturalnej substancji konserwującej żywność. Podjęto próby oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny białka jaja kurzego wobec drobnoustrojów występujących w żywności, jednak rezultaty tych badań nie są jednoznaczne.

Literatura przedstawia przykłady hamującego wpływu cystatyny na wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Streptococcus pyogenes* (Jasir i wsp., 2003).

Istnieją doniesienia na temat aktywności przeciwwgrzybiczej cystatyny białka jaja kurzego. Kołaczewska i wsp., 2010, z powodzeniem zastosowali cystatynę białka jaja kurzego w inhibicji wzrostu drożdży *Candida albicans* na podłożach mikrobiologicznych, wykazując ponadto jej większą aktywność wobec szczepów *Candida albicans* opornych na stosowane powszechnie chemioterapeutyki.

Cystatyna białka jaja kurzego z łańcuchem polimannozowym, który zwiększa jej odporność termiczną, wykorzystywana jest do poprawy jakości potrawy Surimi. Proteazy cysteinowe powodują degradację miozyny w mięśniach ryb podczas gotowania, pogarszając tym samym cechy organoleptyczne potrawy. Zastosowanie cystatyny pozwala na poprawę jakości organoleptycznej potrawy Surimi (Jiang i wsp., 2002; Li i wsp., 2007).

Przeprowadzone dotychczas nieliczne próby zastosowania cystatyny białka jaja kurzego jako substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym skłaniają do dalszych badań w tym zakresie. Istnieje potrzeba usystematyzowania wiedzy na temat aktywności cystatyny przeciw drobnoustrojom poprzez zastosowanie standardowych metod badawczych wykorzystywanych w diagnostyce laboratoryjnej. Wydaje się, że dzięki tym zabiegom wzrośnie znaczenie cystatyny białka jako naturalnego czynnika przeciwdrobnoustrojowego, szczególnie w przemyśle spożywczym.

2.2. Inne właściwości cystatyny

Cystatyna jaja kurzego wykorzystywana jest do badań modelowych w medycynie ze względu na duże podobieństwo strukturalne do ludzkiej cystatyny C (Sosnowska i wsp., 2011; Paraoan i Grierson, 2007). Podstawową funkcją inhibitorów enzymów proteolitycznych jest regulacja reakcji biologicznych związanych z proteolizą. Prowadzone są jednak badania nad wykazaniem szeregu innych właściwości inhibitorów proteaz. Czynniki przeciwnowotworowe, właściwości protekcyjne, funkcje obronne i odstraszające, regulacja procesów biologicznych, to tylko niektóre właściwości inhibitorów enzymów proteolitycznych, których potencjalne zastosowanie możliwe jest w diagnostyce, profilaktyce, terapii i regulacji licznych zjawisk i procesów biologicznych (Turk i Bode, 1991).

Cystatyna białka jaja kurzego, oprócz opisanych powyżej właściwości przeciwdrobnoustrojowych, wykazuje aktywność przeciwnowotworową (Cox, 2009; Cegnar, 2004). Przeciwdziałanie rozwojowi procesów nowotworowych przez cystatynę stanowi obecnie przedmiot dużego zainteresowania badaczy. W procesach metastazji komórek nowotworowych biorą udział proteazy cysteinowe, zaangażowane w nowotworową kaskadę proteolityczną. Proteazy cysteinowe biorą również udział w procesach inwazji oraz metastazji komórek nowotworowych. Niszczą one struktury błon i macierzy pozakomórkowej, umożliwiając komórkom nowotworu migrację poza jego obręb (Kennedy, 1993). W związku z właściwościami inhibicyjnymi cystatyny wobec proteaz cysteinowych, pokładane są nadzieje na uczestnictwo cystatyny w hamowaniu nowotworowej kaskady proteolitycznej, co zaowocować może ograniczeniem bądź powstrzymaniem nowotworowych procesów przerzutowych (Kos i wsp., 2000). Wykazano również, że preparat cystatyny z białka jaj kurzych, dzięki właściwościom inhibicyjnym wobec katepsyn B i L w inwazyjnych komórkach nowotworowych szczurów, może stanowić alternatywę lub wspomagać terapię przeciwnowotworową. U szczurów z wszczepionymi komórkami raka sutka, u których zastosowano kurzą cystatynę jako wspomaganie terapii przeciwnowotworowej, zaobserwowano dłuższy czas ich przeżycia (Saleh i wsp., 2001). Prowadzone są również badania nad stworzeniem rekombinowanych inhibitorów łączących funkcję hamowania proteaz cysteinowych oraz hamowania reakcji urokinazowego aktywatora plazminogenu z jego receptorem. Powstanie rekombinowanych inhibitorów prowadzi, w badaniach *in vitro*, do zmniejszenia inwazji komórek raka jajnika (Gołąb i Warwas, 2005; cyt. za Krol i wsp., 2003). W chorobach nowotworowych zaobserwowano wzrost poziomu aktywności proteaz cysteinowych oraz spadek poziomu cystatyny (Konduri, 2002). Wydaje się, że niedobór ten może być uzupełniany preparatami pozyskiwanymi z białka jaj kurzych i przepiórczych. Poprzez syntezę czynnika TNF- α (tumor necrosis factor- α) i interleukiny 10, cystatyna może indukować nekrozę guzów nowotworowych (Verdot i wsp., 1999).

Przypuszcza się, że cystatyna może cechować się działaniem wspomagającym w leczeniu chorób otępiennych układu nerwowego. Istnieją dane na temat potencjalnej roli cystatyny w leczeniu choroby Alzheimera, co daje wielką nadzieję na włączenie cystatyny w terapię chorób cywilizacyjnych (Shah i Bano, 2009). Syntetyzowana jest przez komórki

glejowe w odpowiedzi na obecność złogów amyloidowych, co sugeruje, że może pełnić ochronną rolę w patogenezie choroby Alzheimera, jednak niektórzy badacze skłonni są do stwierdzenia, że jest ona raczej mediatorem uszkodzenia w przebiegu tego schorzenia (Levy, 2008). Przekonanie, że cystatyna może być istotnym markerem w chorobach neurodegeneracyjnych jest fakt, iż jej poziom zmienia się w stanach padaczkowych, niedokrwiennych i pourazowych mózgu (Pirttilä i wsp., 2005). Obecnie, w ramach projektu Ovocura, prowadzone są na szczurach testy aktywności biologicznej i biomedycznej cystatyny, w których oczekuje się wykazania wpływu dodatku cystatyny w paszy na procesy kojarzeniowe i funkcjonowanie układu nerwowego ssaków.

Interesująca, ze względu na pożądanie przez konsumentów produktów naturalnych, wydaje się być możliwość zastosowania cystatyny w przemyśle kosmetycznym. Wskazują na to badania, w których myszy pozbawione cystatyny wykazywały zaburzenia w tworzeniu warstwy rogowej naskórka i mieszków włosowych, a tym samym do upośledzenia bariery naskórkowej (Zeeuwen i wsp., 2004). Wyniki eksperymentów pokazały, że u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i łuszczycą ekspresja cystatyny jest zmniejszona (Cork i wsp., 2009). Cystatyna białka jaja kurzego znalazła również zastosowanie w dermatologii weterynaryjnej. Prowadzone są obecnie badania dotyczące możliwości zastosowania biopreparatu w terapii zmian skórnych u psów, m.in. w leczeniu atopowego zapalenia skóry (Nicpoń i wsp, 2013b).

Cystatyna uważana jest również za czuły marker funkcji nerek. W ostatnich latach wyraźnie wzrosło zainteresowanie cystatyną w diagnostyce nefrologicznej. Parametr ten szczególnie przydatny okazuje się być w wykrywaniu stanów subklinicznych bądź ostrych niewydolności nerek jako czuły wskaźnik filtracji kłębuszkowej nerek (GFR) (Bodnar i wsp., 2008; Larsson i wsp., 2004). Wykazano również przydatność cystatyny w diagnozowaniu przewlekłej choroby nerek u osób starszych (Imiela i Lewandowicz, 2007). W badaniach prowadzonych na ludziach podkreśla się udział cystatyny jako markera stanu funkcji nerek, szczególnie u osób z chorobami autoimmunologicznymi lub po transplantacji nerki (Filler i wsp., 2005).

Zainteresowanie cystatyną jako czynnikiem prognostycznym chorób sercowo – naczyniowych wzrosło po udowodnieniu spadku stężenia i aktywności inhibitorów proteaz cysteinowych w osoczu krwi u chorych z tętniakiem aorty (Lutgens i wsp., 2007; Gacko i wsp., 2003).

System regulacji aktywności katepsyn poprzez cystatyny odgrywa ważną rolę u kobiet z powtarzającymi się poronieniami. U kobiet tych wykryto wyższe stężenia katepsyn i cystatyn w trofoblaście łożyska lub błonie doczesnej, co stwarza możliwość wczesnego wykrywania zagrożonej ciąży (Babay i wsp., 2005).

Cystatyna znalazła również zastosowanie w analityce laboratoryjnej, gdzie wykorzystywana jest jako czynnik wychwytyjący bądź blokujący w testach immunologicznych, np. w teście ELISA (Xunhui i wsp., 2004).

Cystatyna białka jaja kurzego posiada właściwości immunomodulujące. Sugerowano jej udział w odpowiedzi immunologicznej i procesach zapalnych. W stężeniach fizjologicznych cystatyna białka jaja stymuluje produkcję interleukin przez komórki fibroblastów dziąseł człowieka oraz mysie splenocyty (Kato i wsp., 2000). Cystatyna posiada również właściwości antygenowe. Przeciwciała otrzymano u zwierząt poprzez iniekcję domięśniową zemulgowanej i oczyszczonej cystatyny (Turk i wsp., 2008). W dostępnej literaturze przedstawia się również wpływ cystatyny na modulację układu odpornościowego poprzez ewentualny udział w przetwarzaniu kompleksów MHC klasy II oraz poprzez stymulację tlenku azotu (NO) w makrofagach, a także czynnika TNF (Tumor Necrosis Factor) i interleukiny 10 (Das i wsp., 2001). Dzięki zdolności cystatyny do indukcji syntezy tlenku azotu (NO) przez makrofagi, wykorzystano ją w leczeniu choroby kala-azar, wywoływanej przez wiciowca *Leishmania donovani* z rodzaju *Leishmania* (Mukherjee i wsp., 2007). Dzięki tym właściwościom cystatyna stała się obiecującym czynnikiem terapeutycznym chorób związanych z czynnością makrofagów (macrophage-associated diseases). Brand i wsp., 2004, wskazali na zaangażowanie cystatyny w procesy odwracalnego hamowania degradacji macierzy kostnej poprzez modulację degradacji kości przez osteoklasty.

3. Bezpieczeństwo żywności

3.1. Zagrożenia mikrobiologiczne związane z żywnością

Żywność jest źródłem składników niezbędnych do właściwego funkcjonowania i rozwoju organizmu. W czasach wysokich wymagań konsumentów, co do trwałości i jakości produktów spożywczych, zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności stanowi bardzo istotny problem. Główne zagrożenie stanowią drobnoustroje chorobotwórcze lub względnie chorobotwórcze. Potrzeba poszukiwania nowych trendów i rozwiązań w zakresie poprawy bezpieczeństwa żywności i surowców używanych do jej produkcji wydaje się być zrozumiała. Żywność stanowi doskonałe środowisko dla rozwoju drobnoustrojów, jest również wektorem w obiegu drobnoustrojów w przyrodzie. Środowisko surowców spożywczych sprzyja szybkiemu namnażaniu się drobnoustrojów powodując niekorzystne zjawisko psucia się żywności. Dodatkowym zagrożeniem dla potencjalnego konsumenta jest obecność chorobotwórczych lub względnie chorobotwórczych drobnoustrojów w żywności odpowiedzialnych m.in. za występowanie zatruc pokarmowych.

Zanieczyszczenie żywności drobnoustrojami następować może na drodze pierwotnej lub wtórnej. Bakterie, wirusy lub grzyby, wskutek zanieczyszczenia droga pierwotną dostają się do żywności bezpośrednio z surowców roślinnych i zwierzęcych. Zanieczyszczenia wtórne to takie, które pochodzą ze środowiska zewnętrznego w czasie produkcji, przechowywania lub przygotowywania do konsumpcji. Stanowią je woda, gleba, powietrze, ścieki, opakowania i dodatki do żywności, a także zabiegi związane z procesami produkcji, magazynowania i dystrybucji środków spożywczych.

Główne zagrożenie mikrobiologiczne żywności stanowią bakterie: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, a także *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*.

Zatrucia pokarmowe stanowią w Polsce poważny problem. Większość objawów zatruc pokarmowych jest stosunkowo łagodnych, jednak możliwe są ich ciężkie, zagrażające życiu powikłania. Według statystyk Państwowego Zakładu Higieny, co roku notuje się w Polsce ponad 20 tysięcy bakteryjnych zatruc pokarmowych. Na uwagę zasługuje również fakt zwiększającej się liczby zatruc pokarmowych wywołanych przez enterowirusy, rotawirusy oraz wirusy zapalenia wątroby typu A.

3.2. Czynniki warunkujące stan mikrobiologiczny żywności

Rozwój przemysłu spożywczego w zakresie higieny i technologii żywności poszukuje rozwiązań chroniących produkty spożywcze przed zanieczyszczeniem i rozwojem drobnoustrojów. Zabiegi te mają na celu zmianę środowiska surowca spożywczego i gotowego wyrobu w taki sposób, by stworzyć niekorzystne warunki dla rozwoju drobnoustrojów. Czynniki wpływające na stan mikrobiologiczny żywności możemy podzielić na czynniki środowiska zewnętrznego oraz wewnętrznego.

Temperatury wyższe od maksymalnych (hipermaksymalne) i subminimalne należą do czynników środowiska zewnętrznego. Temperatury hipermaksymalne to temperatury wyższe od maksymalnych dla możliwości wzrostu danych gatunków drobnoustrojów. Skutkiem ich działania jest śmierć form wegetatywnych lub/i przetrwalnikowych bakterii po osiągnięciu tzw. minimalnej temperatury letalnej. Procesy technologiczne wykorzystujące temperatury hipermaksymalne do redukcji liczby drobnoustrojów w żywności to pasteryzacja – wykorzystująca temperatury do 100°C i sterylizacja, w trakcie której stosuje się temperatury powyżej 100°C. Znane są również procesy upperyzacji, w których do redukcji drobnoustrojów wykorzystuje się szybkie ogrzanie produktu i natychmiastowe jego ochłodzenie. Tak przebiega np. proces technologicznej obróbki cieplnej mleka (HTST). Aplikacja subminimalnych temperatur, czyli temperatur niższych od minimalnych temperatur wzrostu dla danych gatunków drobnoustrojów, wykorzystywana jest w procesach chłodzenia i mrożenia żywności. Wpływ zabiegów termicznych nie zawsze i nie w pełni przyczynia się do redukcji drobnoustrojów w żywności, pogarszając dodatkowo jej właściwości organoleptyczne.

Peklowanie i wędzenie to metody zaliczane do czynników środowiska zewnętrznego wpływających na stan mikrobiologiczny żywności. Peklowanie to zabieg umożliwiający uzyskanie pożądanej jakości organoleptycznej produktów spożywczych. Hamuje on wzrost większości drobnoustrojów chorobotwórczych i odpowiedzialnych za psucie się żywności. Niebezpieczeństwo dla zdrowia konsumenta stanowią azotyny, które w reakcji z białkiem tworzą związki rakotwórcze. Największe zagrożenie dla człowieka stanowią dimetylonitrozoamina (DMNA) i dietylonitrozoamina (DENA).

Wędzenie jako skuteczna metoda konserwacji żywności traci obecnie na znaczeniu. Dym wędzarniczy to mieszanina wielu związków chemicznych takich jak kwasy organiczne, aldehydy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, które wykazują działanie rakotwórcze. Mimo, że dym wędzarniczy posiada właściwości przeciwdrobnoustrojowe, jego skuteczne działanie dotyczy jedynie drobnoustrojów na powierzchni produktu spożywczego.

O rozwoju poszczególnych gatunków drobnoustrojów decyduje również dostępność tlenu. Zdecydowana większość bakterii, pleśni i drożdży odpowiedzialnych za psucie się żywności to drobnoustroje tlenowe. Kontrolowanie ilości tlenu dostępnego dla bakterii pozwala na eliminację poszczególnych grup drobnoustrojów. Uzyskuje się to przez pakowanie lub przechowywanie produktów spożywczych w warunkach próżni lub zwiększonej zawartości dwutlenku węgla. Zabiegi te nie zabezpieczają jednak przed rozwojem drobnoustrojów beztlenowych i względnie beztlenowych, w tym laseczek jadu kiełbasianego. Środowisko próżni sprzyja rozwojowi licznych gatunków bakterii kwasu mlekowego, które wykorzystując zjawisko antagonizmu międzybakteryjnego, hamują wzrost bakterii chorobotwórczych. Nadmiar ich jednak może być przyczyną niekorzystnych zmian organoleptycznych produktu (skwaśnienie).

3.3. Nowe trendy w konserwacji żywności i naturalne substancje konserwujące żywność

W ostatnich latach przemysł spożywczy poszukuje nowych, innowacyjnych rozwiązań w zakresie bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Wzmożona niechęć konsumentów do tradycyjnych środków konserwujących oraz wzrastająca oporność organizmów na ich działanie skłaniają badaczy do poszukiwania nowych metod eliminacji drobnoustrojów. Tradycyjne metody utrwalania żywności powodują wiele niekorzystnych zmian w produktach. Wysoka temperatura powoduje utratę niektórych substancji odżywczych, denaturuje białka i pogarsza cechy organoleptyczne. Mrożenie produktów spożywczych powoduje spadek ich wartości odżywczych, szczególnie podczas długiego przechowywania. Oczekiwania konsumentów skupiły się w ostatnich latach na produktach naturalnych, nieprzetworzonych, wolnych od konserwantów, a jednocześnie bezpiecznych i przydatnych do spożycia przez jak najdłuższy czas. W związku z tym uwaga producentów, technologów i mikrobiologów żywności skupiła się na poszukiwaniu nowych rozwiązań w zakresie bezpieczeństwa żywności.

Zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych (HHP – High Hydrostatic Pressures), zwane również metodą konserwacji z zastosowaniem ciśnienia hydrostatycznego (HPP – Hydrostatic Pressure Processing), zyskuje w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie badaczy (Hać-Szymańczuk i Mroczek, 2006). Po raz pierwszy użyto wysokich ciśnień hydrostatycznych jako metody konserwacji żywności w Stanach Zjednoczonych, gdzie konserwacji poddawano mleko, soki owocowe, mięso oraz owoce. Natomiast pierwsze komercyjne produkty wyprodukowane z wykorzystaniem metody wysokich ciśnień hydrostatycznych wprowadzono na rynek w latach dziewięćdziesiątych w Japonii. Były to dżemy i soki owocowe. Podjęto również udane próby inaktywacji patogennych bakterii w mleku ludzkim, zastępując tym samym termiczną metodę jego pasteryzacji (Chawla i wsp., 2011).

Metoda pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF – Pulse Electric Field) polega na poddaniu produktów krótkotrwałym impulsom elektrycznym o wysokiej intensywności. Mechanizm przeciwbakteryjnego działania pulsacyjnego pola elektrycznego polega na zmianie potencjału elektrycznego w błonach komórek bakteryjnych, co skutkuje uszkodzeniem i śmiercią bakterii. Metoda ta znalazła zastosowanie w konserwacji soków owocowych, mięsa, warzyw i mleka, masy jajowej. Skuteczność metody PEF porównywana jest ze skutecznością obróbki cieplnej produktów spożywczych. Niewątpliwą zaletą metody jest zachowanie wartości odżywczej wyrobów.

Jedną z najwcześniej wdrożonych metod konserwacji żywności jest sterylizacja radiacyjna. Pierwsze próby jej zastosowania podjęto w latach sześćdziesiątych XX wieku w Stanach Zjednoczonych. W technologii tej metody wykorzystuje się zjawiska radapertyzacji, radycyzacji i raduryzacji, polegające na zastosowaniu różnych dawek promieniowania. Raporty WHO wskazują, że zastosowanie dawek promieniowania do 10 kGy zapewnia bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności i nie stanowi zagrożenia dla zdrowia ludzi (Molenda, 2007). Metodę tą wykorzystuje się obecnie w kilkudziesięciu krajach świata, m.in. w Stanach Zjednoczonych, Chinach i Francji. W Polsce dopuszcza się sterylizację radiacyjną przypraw suchych i suszonych warzyw. Mimo, iż sterylizacja radiacyjna żywności jest metodą skuteczną, zatwierdzoną przez Międzynarodową Komisję Kodeksu Żywnościowego działającą pod kuratelą WHO, stosowanie jej budzi wątpliwości i obawy konsumenta.

Wraz ze wzrostem wymagań konsumentów, co do jakości mikrobiologicznej i trwałości produktów spożywczych, wzrosła w ostatnich latach ilość badań nad poszukiwaniem i wykorzystaniem naturalnych substancji konserwujących żywność. Stosowanie chemicznych dodatków funkcjonalnych do żywności budzi obawy konsumentów, którzy uważają je za związki syntetyczne, nienaturalne, mogące być przyczyną reakcji alergicznych, zatruc i innych schorzeń. Stosowanie chemicznych dodatków do żywności, według opinii konsumentów, jest również celowym zabiegiem producentów dla ukrycia złej jakości produktów. Mimo, iż granica między „naturalnym” a „syntetycznym” dodatkiem do żywności jest umowna i ze względu na powstawanie nowych technologii coraz bardziej się zaciera, konsumenci mają zazwyczaj większe zaufanie do naturalnych metod utrwalania żywności. Sięgają chętniej po produkty konserwowane metodami naturalnymi, opartymi na tradycyjnych recepturach.

Naturalne substancje konserwujące stanowią zatem aktualny przedmiot zainteresowania badaczy, którzy coraz częściej poszukują nowych substancji, analizując możliwości ich zastosowania w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności.

Naturalne biokonserwanty to związki chemiczne pochodzące z tkanek roślinnych, zwierzęcych i mikroorganizmów, oraz ich metabolity. Substancje te zapobiegają rozkładowi produktów spożywczych w różny sposób. Mechanizm działania naturalnych konserwantów polega na hamowaniu wzrostu drobnoustrojów i niektórych reakcji enzymatycznych odpowiedzialnych za niepożądane zmiany w żywności. Naturalne związki konserwujące żywność zyskują w ostatnich latach na znaczeniu, ponieważ wywierają znikome, bądź nie wywierają żadnych skutków ubocznych dla konsumenta.

Zmiany preferencji konsumentów żywności wymuszają na jej producentach, pomimo wyższych kosztów produkcji, coraz powszechniejsze stosowanie naturalnych konserwantów. Istotą ich stosowania jest otrzymywanie produktów o wysokiej, niezmienionej wartości odżywczej, wolnej od szkodliwych, chemicznych substancji, a także bezpiecznej pod względem mikrobiologicznym. Naturalne biosubstancje stosuje się również w celach technologicznych, np. dla zahamowania niekorzystnych zmian koloru, konsystencji, smaku i poprawy innych parametrów organoleptycznych. Wydaje się, że również cystatyna białka jaja kurzego mogłaby spełniać wymagania w tym zakresie.

II. CEL PRACY

Z uwagi na coraz większe zainteresowanie naturalnymi substancjami pochodzącymi z jaj ptaków oraz dotychczasowymi wynikami badań wskazującymi na aktywność tych substancji przeciw drobnoustrojom, podjęto próbę doświadczalnej oceny wyżej wymienionej aktywności w odniesieniu do cystatyny. Istnieją nieliczne wyniki badań na temat aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny białka jaja kurzego. Dostępne źródła literaturowe pozwalają na uzasadnione przypuszczenie, że może ona wykazywać działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec drobnoustrojów związanych z przemysłem spożywczym (Węsierska i wsp., 2005).

Celem badań była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej biopreparatów cystatyny białka jaja kurzego poprzez zastosowanie metod oznaczania minimalnego stężenia hamującego (MIC) cystatyny oraz wyznaczania krzywych przeżycia bakterii w jej środowisku.

III. MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzone badania składały się z następujących etapów:

- określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) biopreparatów cystatyny,
- wyznaczenie krzywych przeżycia badanych szczepów testowych w środowisku płynnym z dodatkiem biopreparatów cystatyny.

Materiał badawczy

1. Roztwór cystatyny białka jaja kurzego

Do badań wykorzystano biopreparat cystatyny wyizolowany z białka jaja kurzego zmodyfikowaną metodą opartą na chromatografii powinowactwa w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

W badaniach wykorzystano następujące roztwory macierzyste cystatyny białka jaja kurzego:

- roztwór macierzysty cystatyny białka jaja kurzego w formie monomerycznej o stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ z dodatkiem 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) oraz z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS),
- roztwór macierzysty cystatyny białka jaja kurzego w formie dimerycznej o stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$ z dodatkiem 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) oraz z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS).

2. Szczepy testowe

Szczepy testowe wykorzystywane w badaniach pozyskano z kolekcji szczepów testowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Do badań wykorzystano następujące szczepy testowe:

- *Escherichia coli* ATCC 23811
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843
- *Proteus vulgaris* ATCC 6380
- *Proteus vulgaris* ATCC 13315

3. Podłoża mikrobiologiczne

Podłoża mikrobiologiczne wykorzystane w badaniach, oraz ich zastosowanie przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela1. Podłoża mikrobiologiczne wykorzystane w badaniach.

Podłoże mikrobiologiczne (producent)	Zastosowanie
<i>Chromocult® Coliform Agar</i> (Merck)	Odzyskiwanie szczepów testowych <i>E. coli</i> , oznaczanie liczby bakterii z grupy <i>coli</i>
Agar BGA z zielenią brylantową, czerwienią fenolową, laktozą i sacharozą (Merck)	Odzyskiwanie szczepów testowych <i>Salmonella enterica</i> , wykrywanie obecności pałeczek <i>Salmonella</i>
<i>Pseudomonas Selective Agar</i> (Merck)	Odzyskiwanie szczepów testowych <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Agar Baird – Parkera wybiórczy (Merck)	Odzyskiwanie szczepów testowych <i>Staphylococcus aureus</i> , wykrywanie obecności gronkowców koagulazo – dodatnich
Agar Muellera Hinton (Merck)	Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC)
Bulion Muellera Hinton (Merck)	Namnażanie szczepów testowych
Zbuforowana woda peptonowa (Merck)	Rozcieńczenia

Metody badawcze

1. Przygotowanie szczepów testowych

Szczepy testowe namnażano w 18 – godzinnej hodowli w bulionie Muellera Hinton w temperaturze 37°C, następnie trzykrotnie odwirowywano (3000 obrotów na minutę przez 15 minut) i przemywano płynem fizjologicznym. Komórki bakteryjne zawieszano w płynie fizjologicznym i standaryzowano ich liczbę do ok. 10^8 jtk x ml⁻¹. Następnie, przygotowując materiał do oznaczania minimalnego stężenia hamującego, rozcieńczano zawiesinę komórek bakteryjnych do odpowiednich koncentracji przyjętych dla oznaczania minimalnego stężenia hamującego oraz wyznaczania krzywych przeżycia drobnoustrojów.

2. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC)

Do oznaczenia minimalnego stężenia hamującego cystatyny białka jaja kurzego wykorzystano metodę rozcieńczeń biopreparatu w agarze.

Zestalone na poszczególnych szalkach Petriego podłoże agarowe Muellera – Hinton przygotowano tak, aby w 1 ml tego podłoża stężenie cystatyny wynosiło odpowiednio:

- 80 µg
- 100 µg
- 120 µg
- 150 µg
- 300 µg

Przygotowano zawiesinę komórek bakteryjnych o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Po dokładnym wymieszaniu, na uprzednio przygotowane szalki Petriego o różnym stężeniu cystatyny, наносono w sposób punktowy 2 µl zawiesiny poszczególnych szczepów bakteryjnych. Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Równocześnie prowadzono inkubację próbek kontrolnych, które stanowiły szalki Petriego z naniesionym *inoculum* bakteryjnym bez dodatku cystatyny w podłożu agarowym. Oznaczenia wykonano w 5 powtórzeniach dla każdego szczepu testowego. Po określonym czasie inkubacji dokonano oceny wzrostu poszczególnych szczepów testowych na podłożach

agarowych. Płytki agarowe bez dodatku biopreparatu cystatyny uznano za dodatnią próbę kontrolną.

Zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), za minimalne stężenie hamujące przyjęto najmniejsze stężenie biopreparatu cystatyny hamujące wzrost bakterii w badaniach *in vitro*.

3. Wyznaczanie krzywych przeżycia

Przygotowaną wcześniej zawiesinę szczepów testowych standaryzowano uzyskując liczbę komórek bakteryjnych ok. 10^4 jtk x ml⁻¹.

Do 8,9 ml płynnego podłoża Muellera-Hinton dodawano 1 ml roztworu macierzystego cystatyny (stężenie 1000 µg/ml) oraz 0,1 ml przygotowanej wcześniej zawiesiny komórek bakteryjnych o wystandaryzowanej liczbie ok. 10^4 jtk/ml. Próbkę kontrolną przygotowano podobnie, dodając do 9,9 ml płynnego podłoża Muellera-Hinton 0,1 ml zawiesiny komórek bakteryjnych o koncentracji 10^4 jtk/ml.

Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturach 20°C oraz 37°C wykonując jednocześnie oznaczenia liczby bakterii podczas inkubacji.

Oznaczenia liczby bakterii wykonywano w czasie 0 – bezpośrednio po ich wprowadzeniu do roztworu oraz po 2, 4, 8, 12 i 24 godzinach inkubacji w każdej z wymienionych temperatur. Oznaczenia liczby bakterii wykonywano poprzez odzyskiwanie ich na podłożach wybiórczych, odpowiednich dla danego szczepu bakteryjnego. Do oznaczeń tych wykorzystano metodę płytkową NPL (Burbianka i wsp., 1983). Oznaczenia wykonano w 7 powtórzeniach dla każdego szczepu testowego.

Na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń liczby bakterii wyznaczono krzywe przeżycia badanych szczepów testowych w środowisku płynnego podłoża Muellera-Hinton z dodatkiem roztworu macierzystego cystatyny białka jaja kurzego, zarówno w postaci monomeru, jak i dimeru cystatyny.

IV. WYNIKI

1. Minimalne Stężenie Hamujące (MIC)

Oznaczono minimalne stężenie hamujące (MIC) następujących macierzystych roztworów cystatyny:

1. roztwór macierzysty cystatyny białka jaja kurzego w formie monomerycznej o stężeniu 1000 µg/ml z dodatkiem 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) oraz z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS),
2. roztwór macierzysty cystatyny białka jaja kurzego w formie dimerycznej o stężeniu 1000 µg/ml z dodatkiem 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) oraz z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS).

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń minimalnego stężenia hamującego (MIC) za pomocą metody rozcieńczeń biopreparatu cystatyny w agarze przedstawiono w tabelach 2-23. Za minimalne stężenie hamujące przyjęto minimalne stężenie cystatyny powodujące redukcję liczebności badanych szczepów testowych. W zależności od zastosowanego roztworu oraz przyjętego stężenia cystatyny, po 24 godzinach doświadczenia, uzyskano efekt zahamowania wzrostu wszystkich szczepów testowych w środowisku cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej, z wyjątkiem bakterii z rodzaju *Proteus sp.* (Tabele 11-12 i 22-23).

1.1 Minimalne stężenie hamujące cystatyny w formie monomerycznej w surowiczej albuminie wołowej (BSA) z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS)

Tabela 2.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Escherichia coli* ATCC 23811.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 3.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Escherichia coli* ATCC 8739.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 4.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Escherichia coli* ATCC 25922.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 5.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 6.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 7.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 8.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 9.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 10.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 11.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Proteus vulgaris* ATCC 6380.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 12.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) monomeru cystatyny dla *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

1.2. Minimalne stężenie hamujące cystatyny w formie dimerycznej w surowiczej albuminie wołowej (BSA) z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS)

Tabela 13.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Escherichia coli* ATCC 23811.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 14.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Escherichia coli* ATCC 8739.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 15.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Escherichia coli* ATCC 25922.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 16.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 17.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 18.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 19.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 20.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 21.

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 22.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Proteus vulgaris* ATCC 6380.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

Tabela 23.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) dimeru cystatyny dla *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

Nr próbki	Dodatek biopreparatu ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)				
	80	100	120	150	300
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
kontrola	+	+	+	+	+

+ widoczny makroskopowo wzrost

2. Krzywe przeżycia szczepów testowych

2.1. *Escherichia coli*

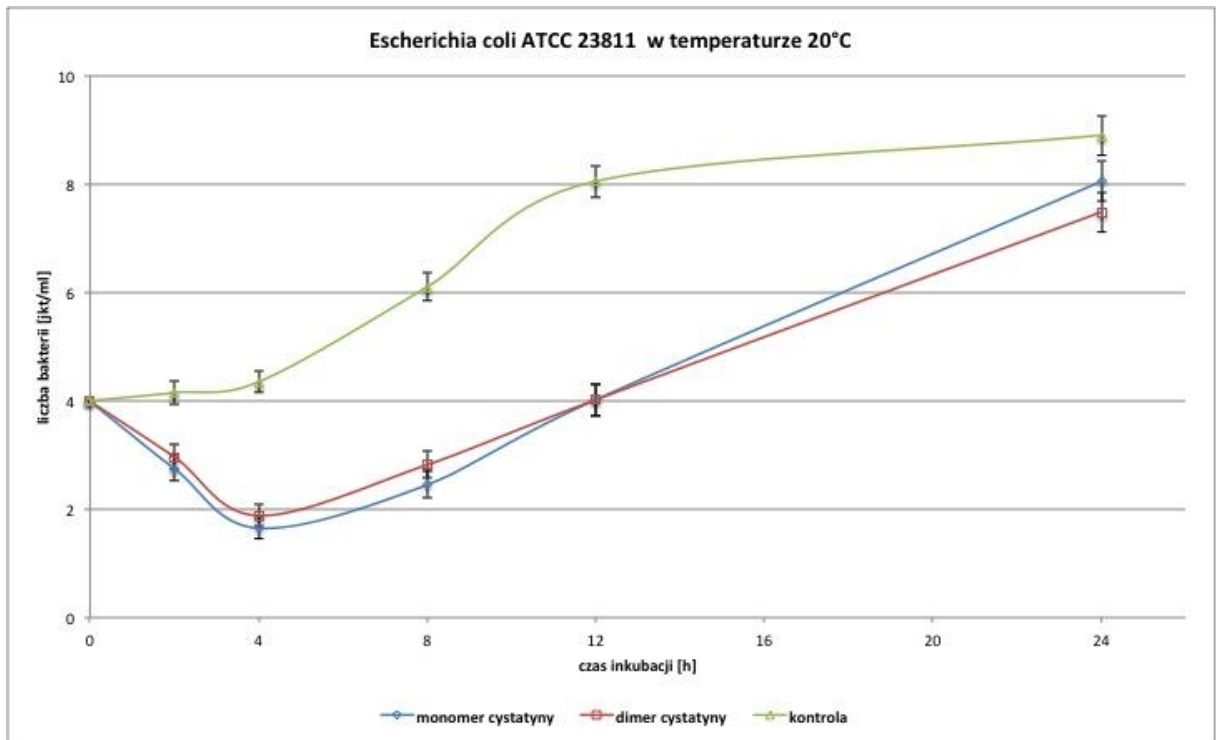
2.1.1. *Escherichia coli* ATCC 23811

W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny zarówno w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , największa redukcja szczepu testowego wystąpiła po 4 godzinach inkubacji. Po 12 godzinach trwania doświadczenia w temperaturze 20°C liczba bakterii *Escherichia coli* w środowisku monomeru i dimeru cystatyny, nie różniła się istotnie od wyjściowej liczby komórek bakteryjnych przyjętych w godzinie 0 doświadczenia. W kolejnych godzinach inkubacji następował wzrost liczby bakterii, a po 24 godzinach inkubacji liczba drobnoustrojów w próbkach z dodatkiem monomeru i dimeru cystatyny nie różniła się znamienne od liczby bakterii w próbkach kontrolnych.

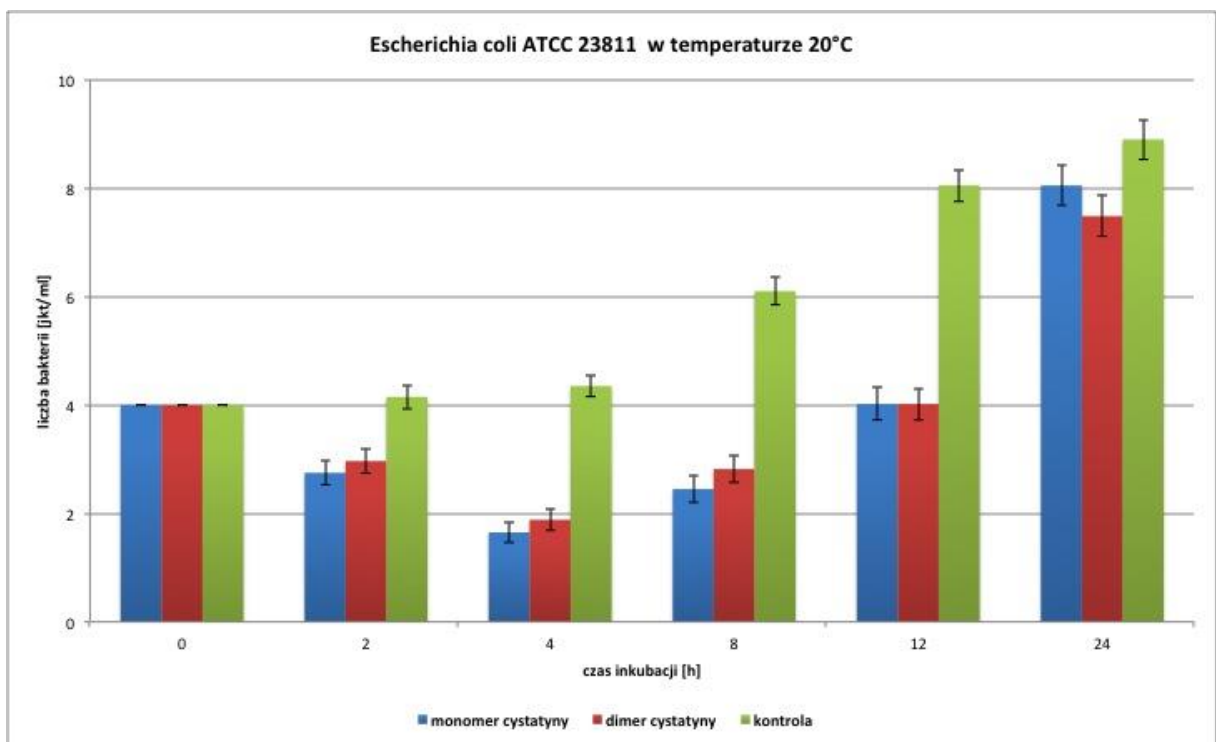
W próbkach inkubowanych w temperaturze 37°C z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny, zarówno w formie monomerycznej oraz dimerycznej, po pierwszych 4 godzinach inkubacji liczba komórek bakteryjnych była najniższa w stosunku do wyjściowej liczby bakterii. Następnie zaobserwowano stopniowy wzrost liczby bakterii w środowisku monomeru i dimeru cystatyny, a po 8 godzinach inkubacji liczba bakterii przewyższała wyjściową liczbę bakterii przyjętą na początku inkubacji (czas 0).

W próbkach kontrolnych bez dodatku biopreparatu liczba bakterii w pierwszych 4 godzinach inkubacji w temperaturze 20°C nie różniła się znacznie od wyjściowej liczby bakterii, po czym następował istotny wzrost liczby komórek bakteryjnych przez cały czas inkubacji. W próbkach kontrolnych inkubowanych w temperaturze 37°C stwierdzono wzrost liczby bakterii przez cały czas doświadczenia.

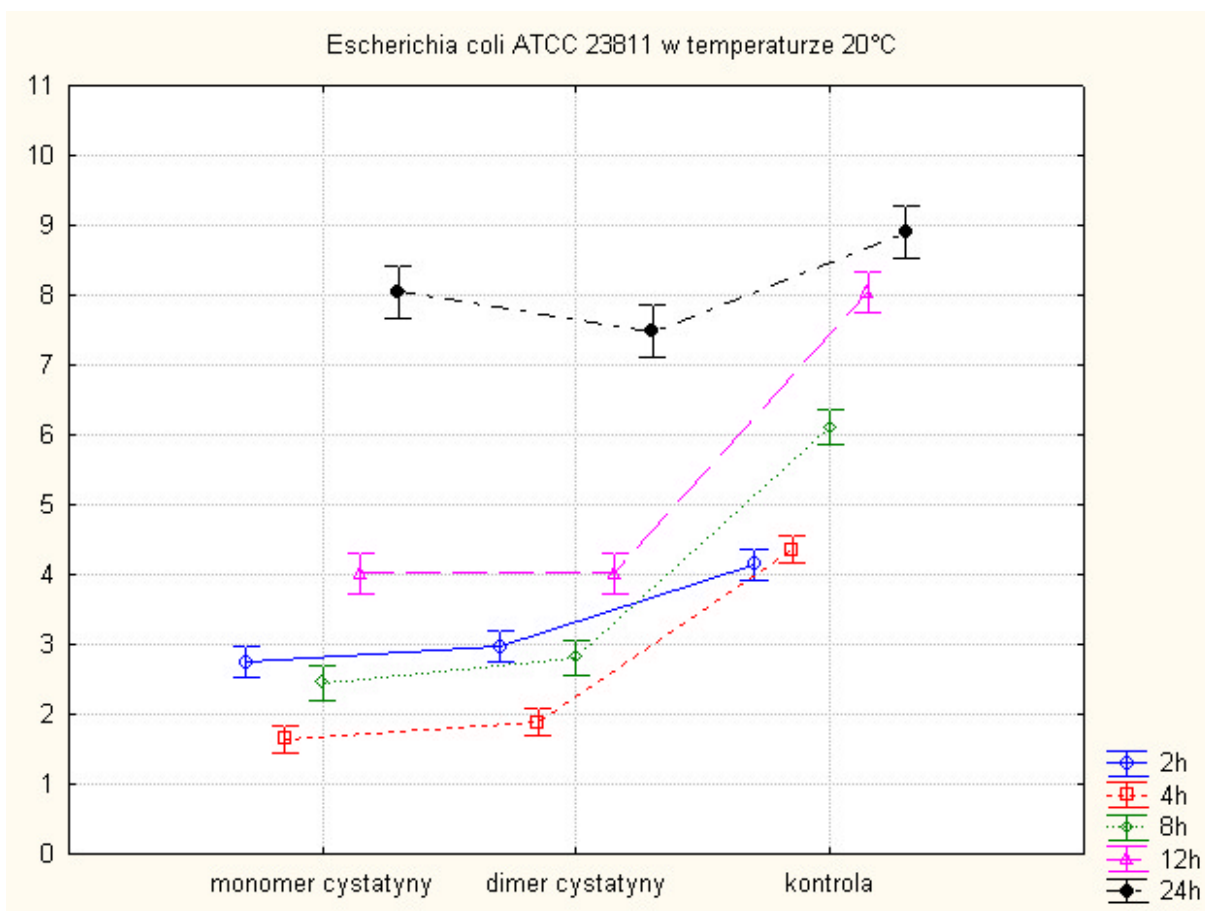
Rycina 1a. Krzywe przeżycia szczepu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



Rycina 1b. Porównanie wzrostu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



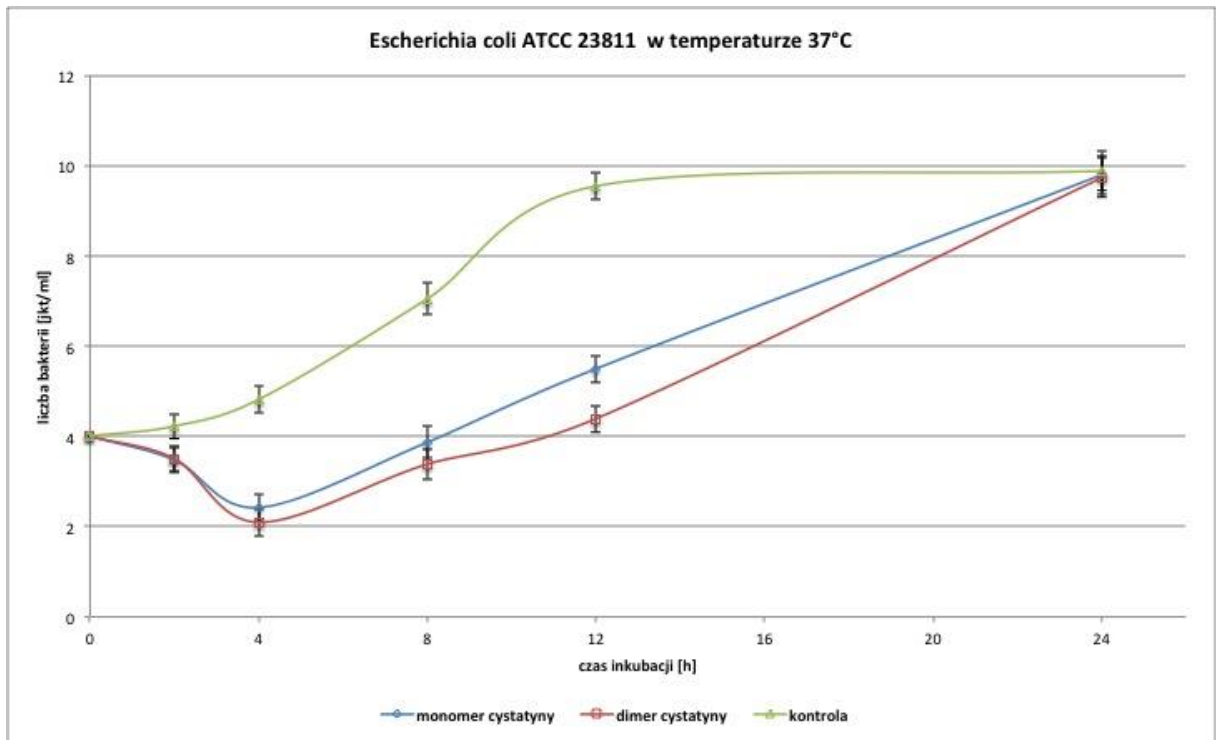
Rycina 1c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



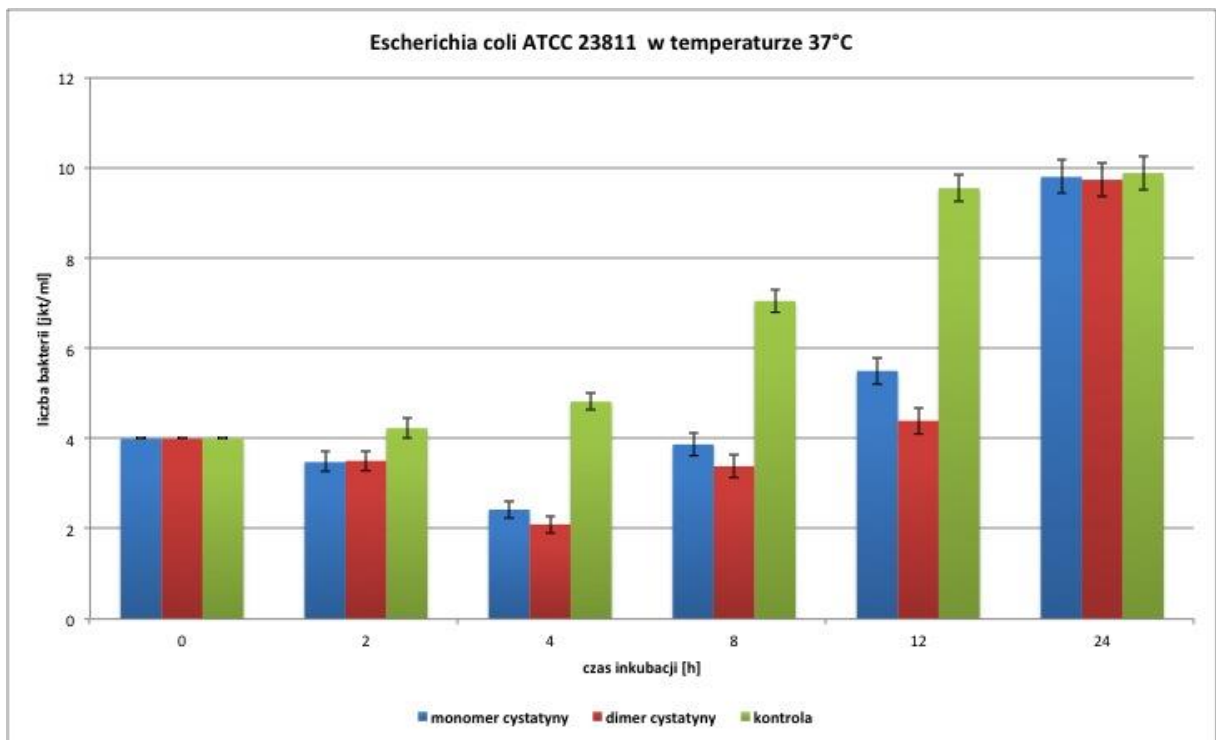
Rycina 1d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	Średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	2,75	0,31	0,11	2,97	0,30	0,11	4,15	0,23	0,08
4	1,65	0,20	0,07	1,88	0,27	0,10	4,35	0,26	0,09
8	2,45	0,28	0,10	2,82	0,33	0,12	6,10	0,33	0,12
12	4,02	0,24	0,09	4,02	0,47	0,17	8,05	0,38	0,14
24	8,05	0,31	0,11	7,48	0,46	0,17	8,90	0,59	0,22

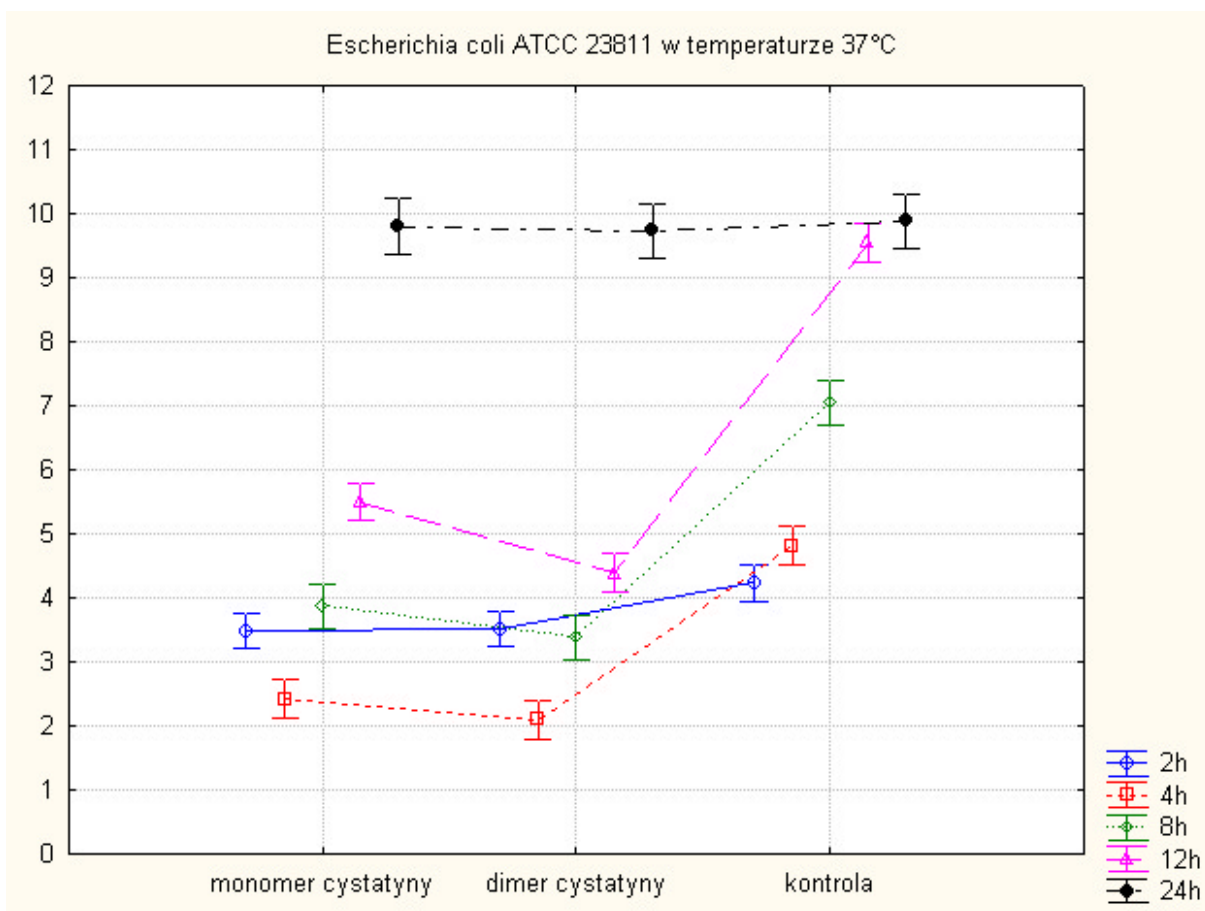
Rycina 2a. Krzywe przeżycia szczepu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 2b. Porównanie wzrostu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 2c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 2d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Escherichia coli* ATCC 23811 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

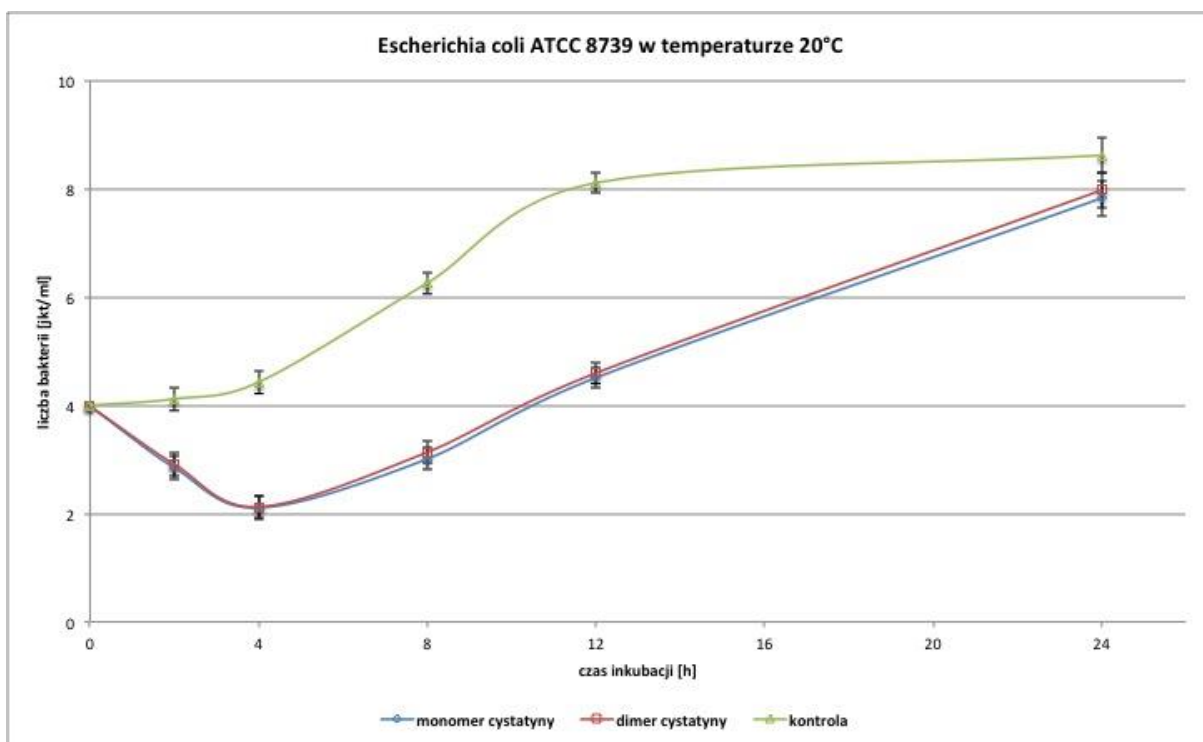
Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,70	0,31	0,11	3,51	0,40	0,15	4,23	0,25	0,09
4	2,00	0,27	0,10	2,10	0,39	0,14	4,82	0,43	0,16
8	3,14	0,32	0,12	3,39	0,33	0,12	7,05	0,51	0,19
12	4,54	0,29	0,10	4,39	0,41	0,15	9,55	0,37	0,13
24	9,45	0,50	0,18	9,74	0,49	0,18	9,89	0,61	0,23

2.1.2. *Escherichia coli* ATCC 8739

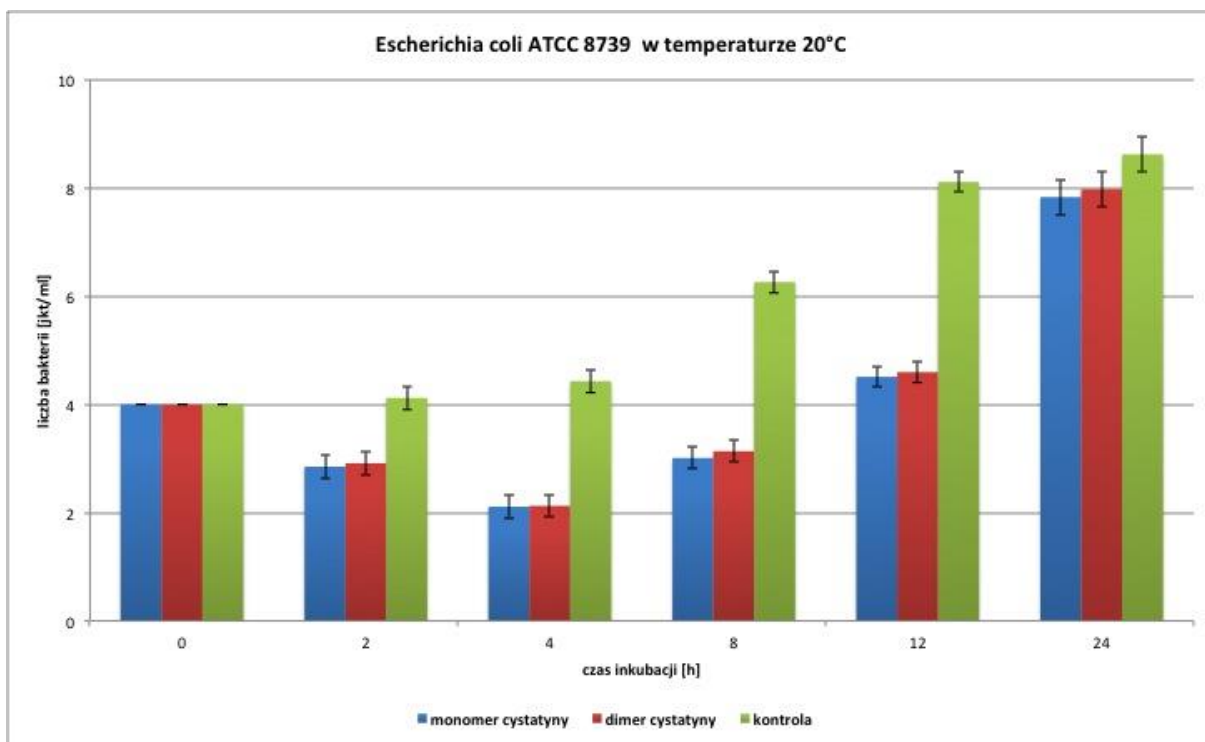
W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , największą redukcję wzrostu liczby bakterii odnotowano po pierwszych 4 godzinach inkubacji. Następnie, w trakcie inkubacji próbek z dodatkiem biopreparatów następował wzrost liczby komórek bakteryjnych, i po upływie ok. 10 godzin inkubacji w temperaturze 20°C liczba bakterii osiągała poziom zbliżony do liczby wyjściowej drobnoustrojów w początkowej fazie inkubacji (czas 0). W temperaturze 37°C stabilizacja liczby bakterii w próbkach z dodatkiem biopreparatów poniżej poziomu wyjściowego utrzymywała się do ok. 8 godziny inkubacji. Po tym czasie liczba drobnoustrojów istotnie wzrastała przez cały czas inkubacji.

W próbkach kontrolnych w temperaturze 20°C liczba bakterii nieznacznie wzrastała w pierwszych 4 godzinach inkubacji, po czym następował jej istotny wzrost. W temperaturze 37°C statystycznie istotny wzrost liczby bakterii *Escherichia coli* następował przez cały czas inkubacji.

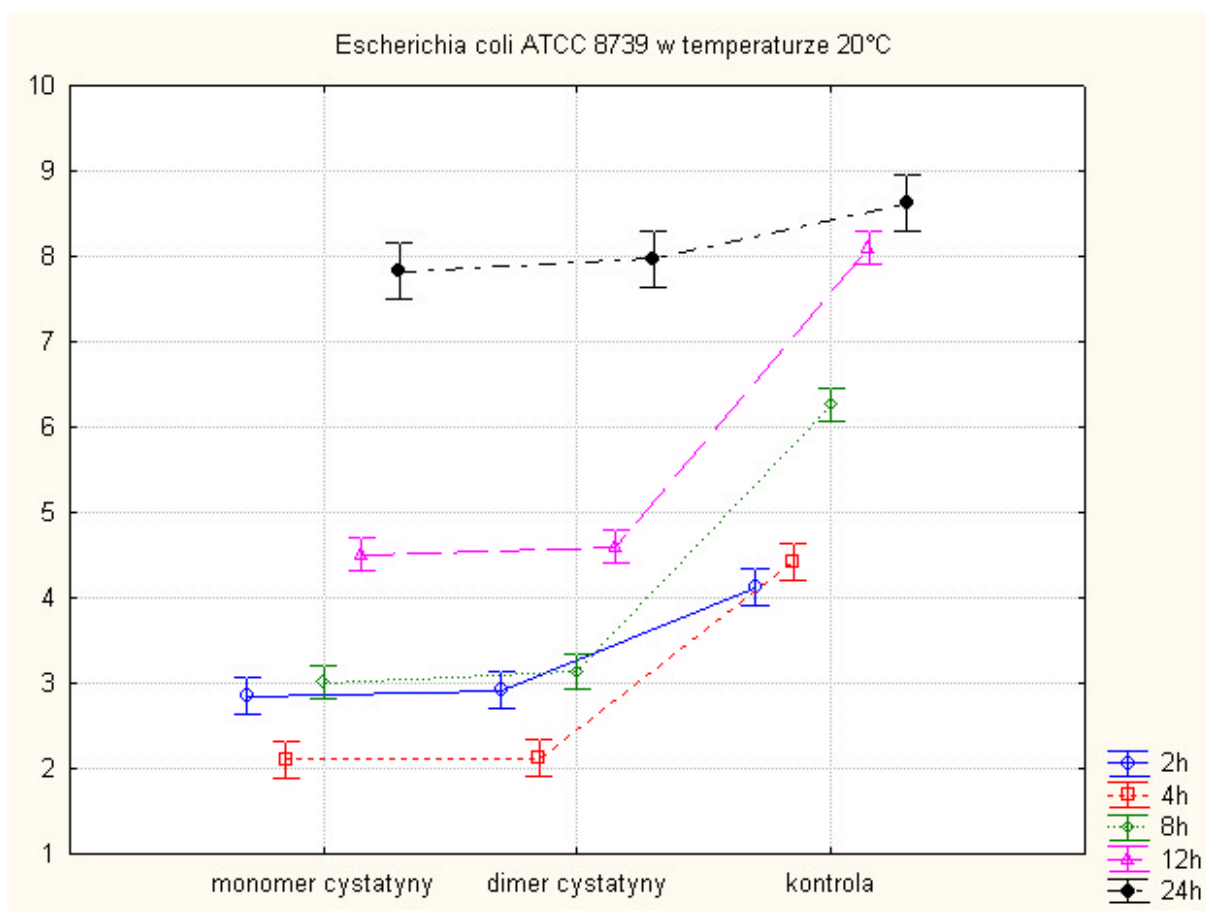
Rycina 3a. Krzywe przeżycia szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem $100 \mu\text{g}$ monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C .



Rycina 3b. Porównanie wzrostu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



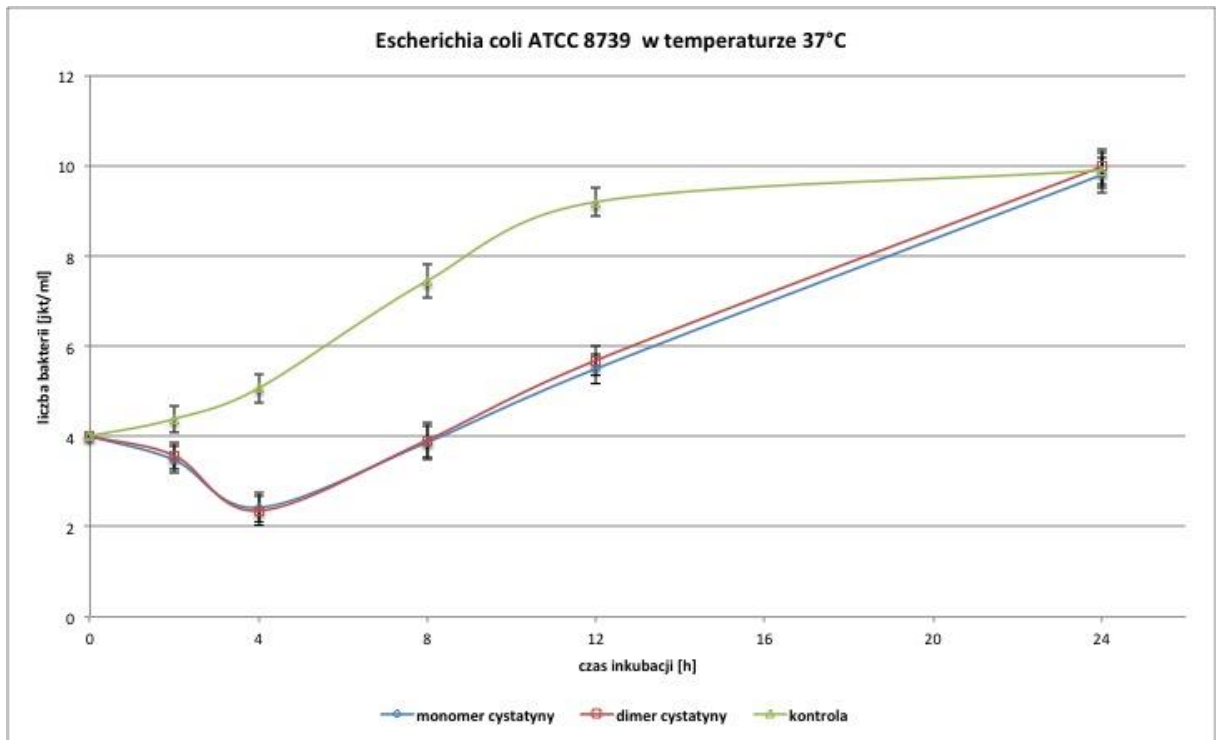
Rycina 3c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



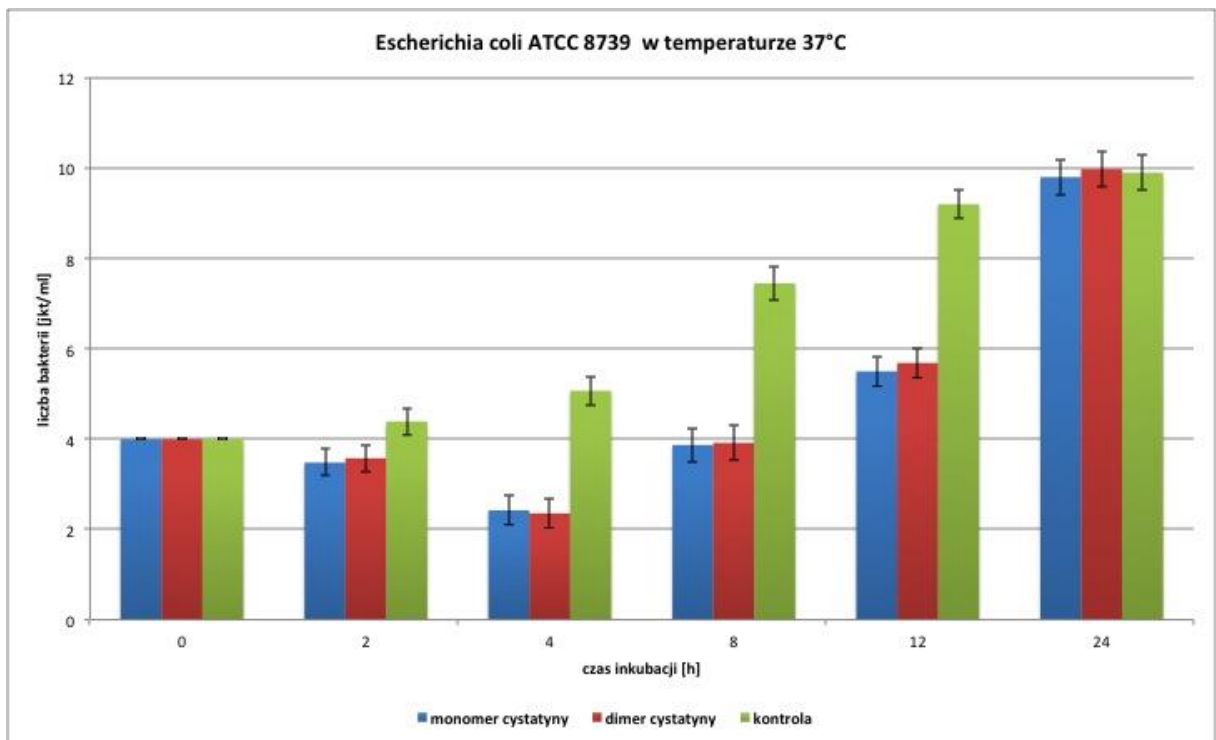
Rycina 3d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	2,85	0,28	0,10	2,91	0,33	0,12	4,12	0,20	0,07
4	2,11	0,27	0,10	2,13	0,32	0,12	4,43	0,20	0,07
8	3,01	0,24	0,09	3,13	0,30	0,11	6,26	0,21	0,07
12	4,51	0,23	0,08	4,60	0,25	0,09	8,11	0,25	0,09
24	7,83	0,52	0,19	7,98	0,40	0,15	8,62	0,30	0,11

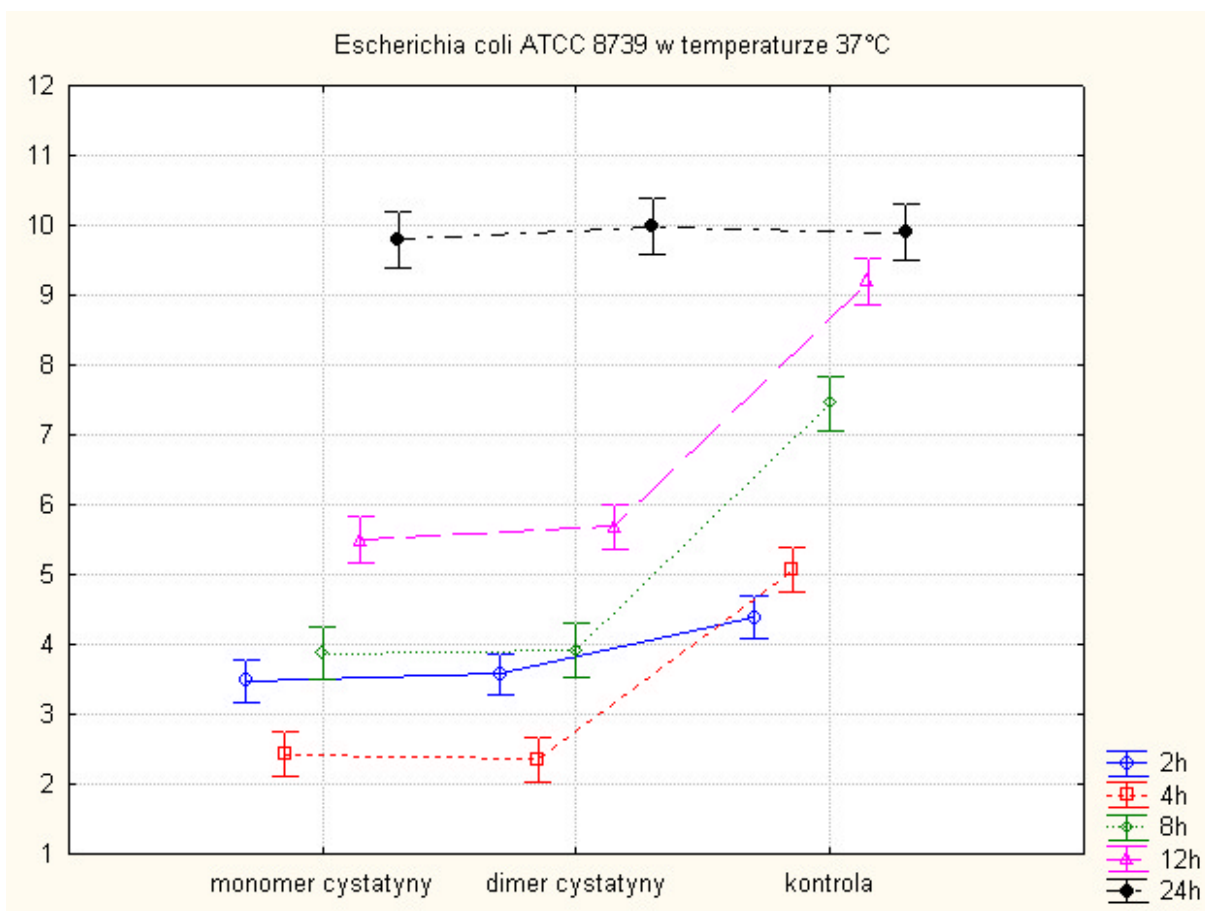
Rycina 4a. Krzywe przeżycia szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 4b. Porównanie wzrostu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 4c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 4d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

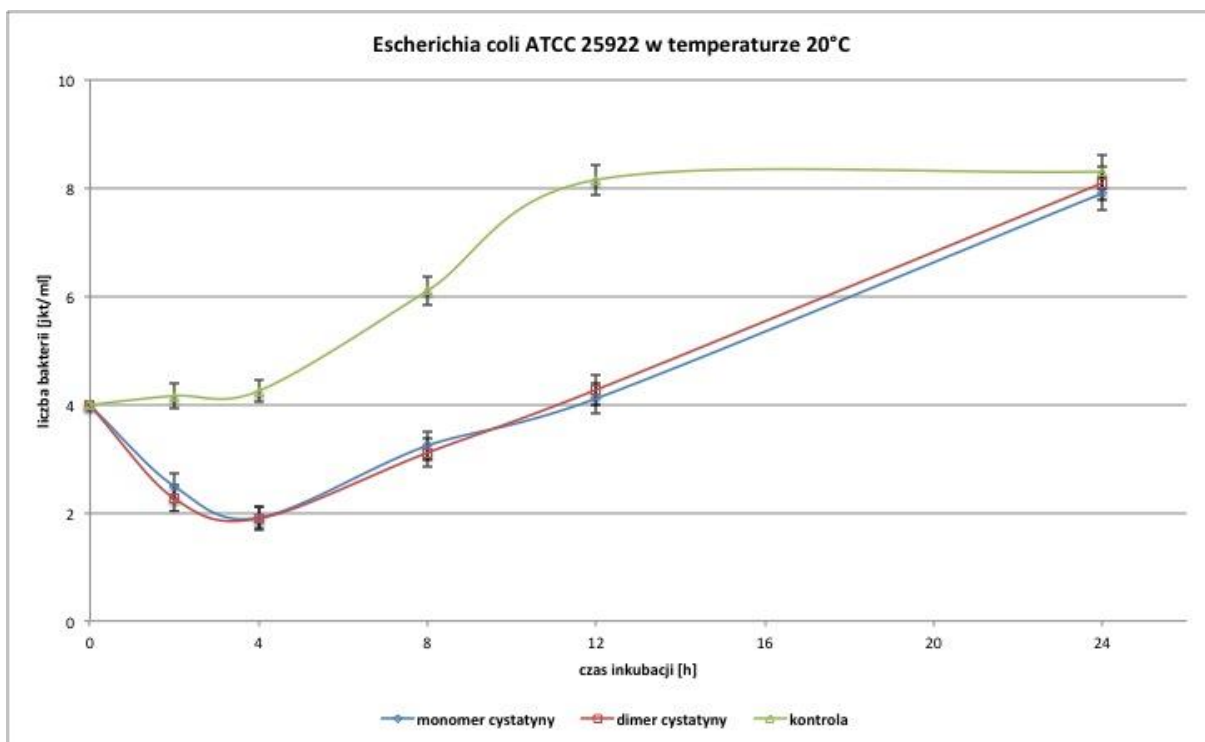
Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,48	0,37	0,13	3,58	0,40	0,15	4,39	0,36	0,13
4	2,42	0,34	0,12	2,35	0,34	0,12	5,07	0,51	0,19
8	3,87	0,45	0,17	3,92	0,46	0,17	7,45	0,53	0,20
12	5,50	0,35	0,13	5,69	0,41	0,15	9,20	0,48	0,18
24	9,80	0,52	0,19	9,98	0,39	0,14	9,90	0,58	0,21

2.1.3. *Escherichia coli* ATCC 25922

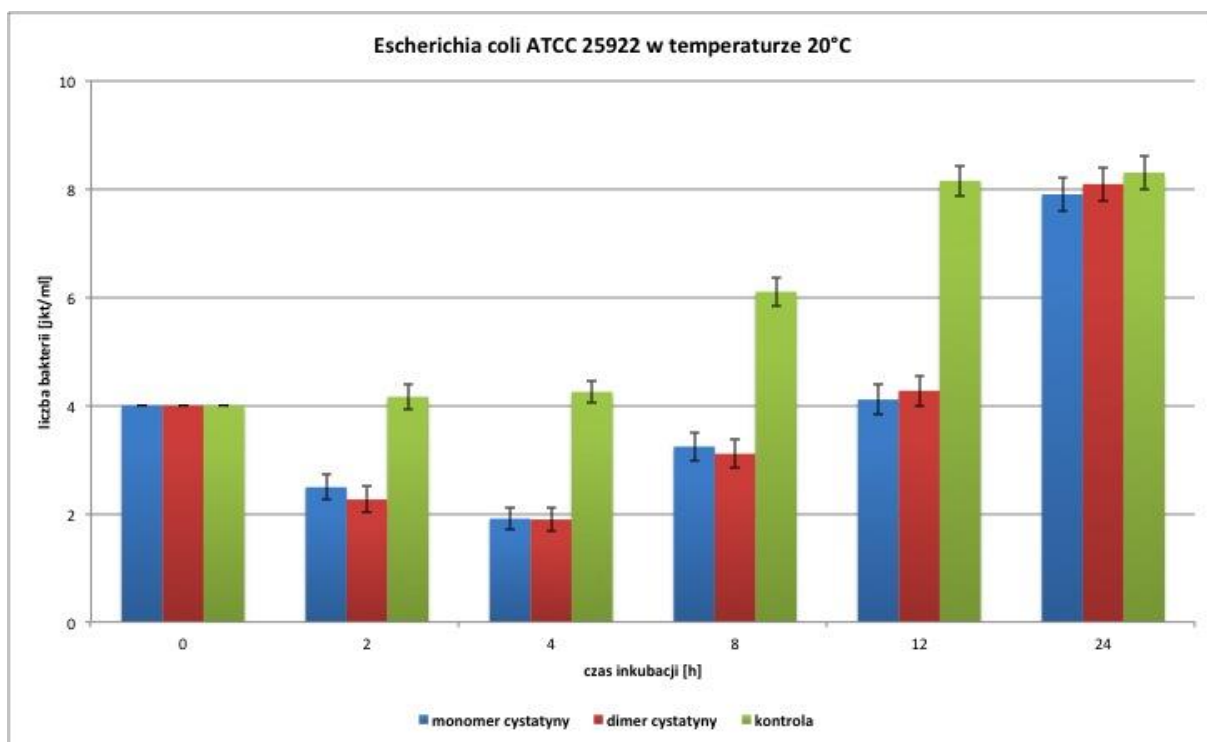
Podobnie jak w przypadku szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739, w próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , największą redukcję liczby bakterii, w porównaniu z próbkami kontrolnymi, zaobserwowano w pierwszych 4 godzinach inkubacji. Efekt redukcji liczby komórek bakteryjnych poniżej wyjściowej liczby bakterii (czas 0) utrzymywał się do ok. 10 godziny inkubacji. Po tym czasie liczba bakterii, zarówno w próbkach z dodatkiem monomeru oraz dimerucystatyny, znacząco wzrastała. W temperaturze 37°C liczba bakterii w próbkach z dodatkiem biopreparatów uległa najistotniejszej redukcji w 4 godzinie od posiewu. W temperaturze tej efekt hamowania wzrostu bakterii do poziomu wyjściowego (czas 0) utrzymywał się do około 8 godziny inkubacji.

W próbkach kontrolnych, pozbawionych dodatku biopreparatów cystatyny, w temperaturze 20°C liczba komórek *Escherichia coli* ATCC 25922 po upływie 4 godzin od posiewu nie różniła się istotnie od wyjściowej liczby bakterii. Po tym czasie następował znaczący wzrost liczby bakterii w czasie trwania eksperymentu, szczególnie do 12 godziny inkubacji. Próbki kontrolne inkubowane w temperaturze 37°C charakteryzowały się istotnym wzrostem liczby bakterii szczególnie do 12 godziny inkubacji.

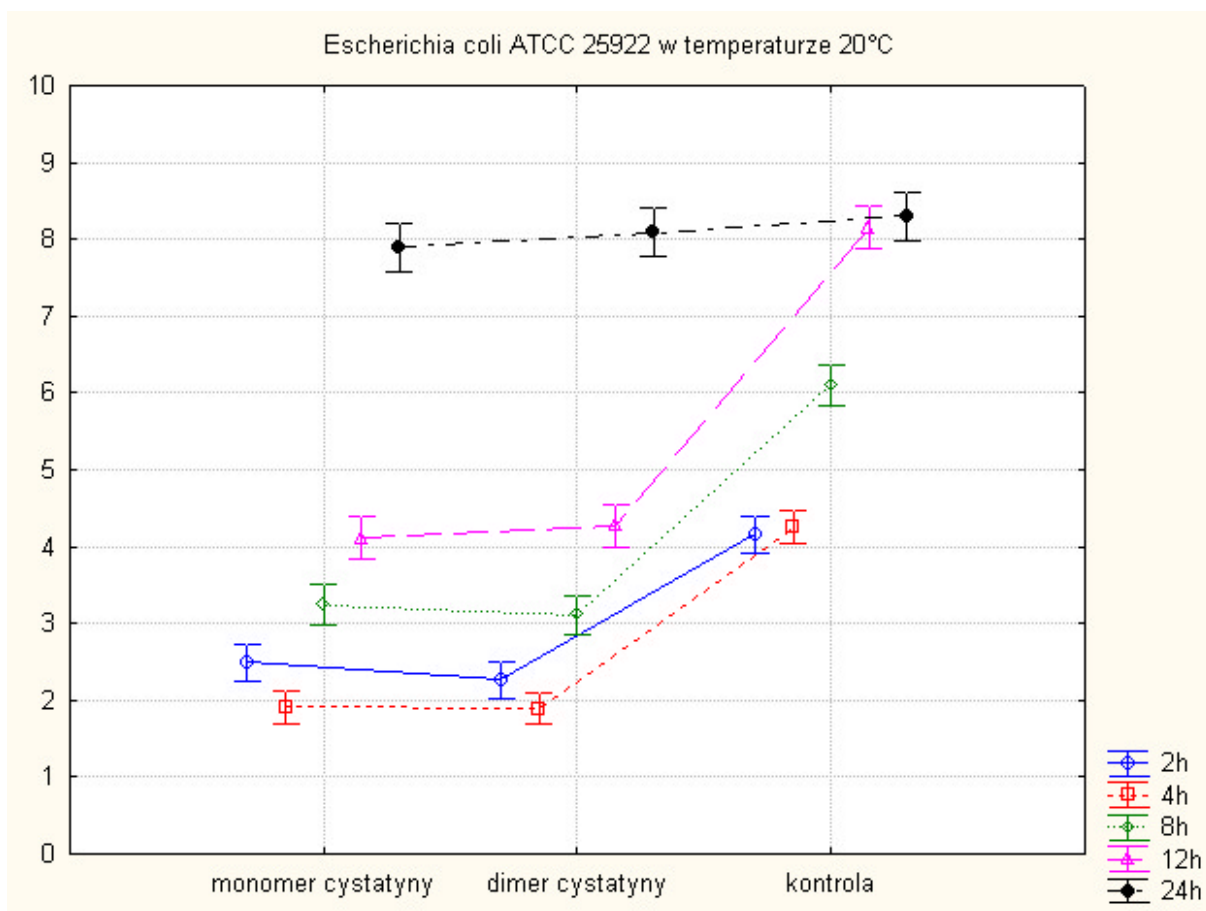
Rycina 5a. Krzywe przeżycia szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



Rycina 5b. Porównanie wzrostu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



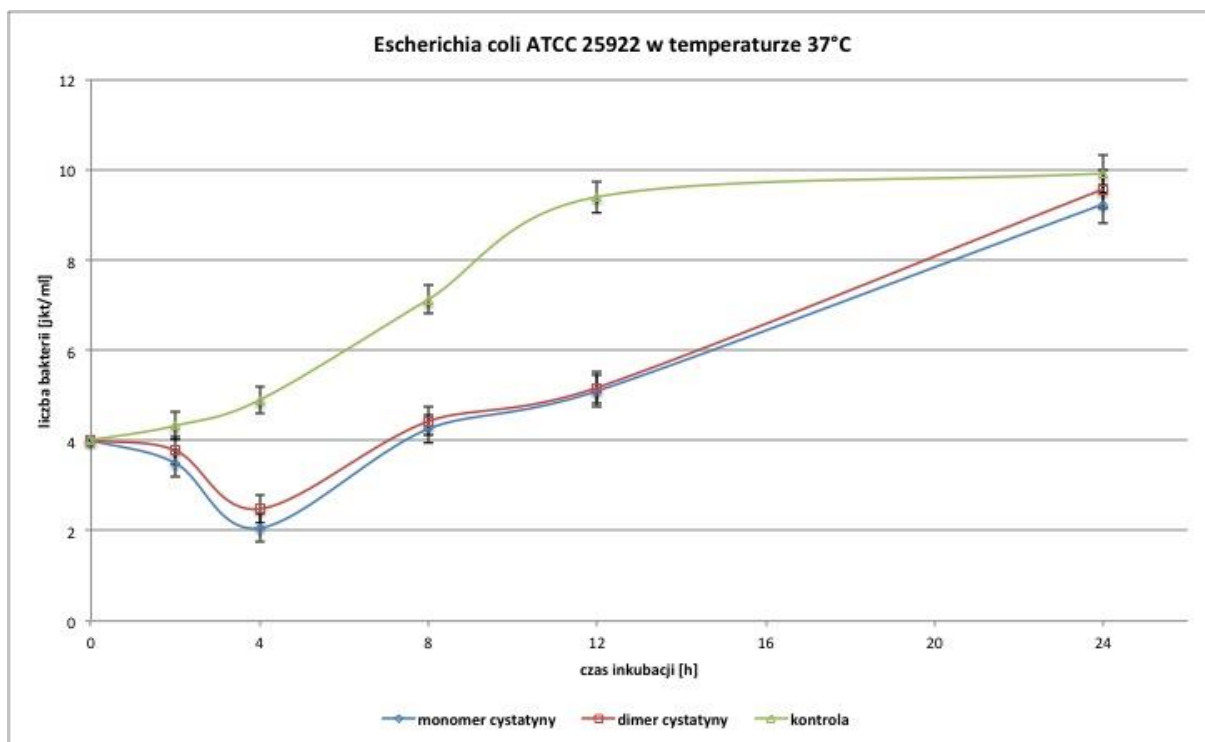
Rycina 5c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



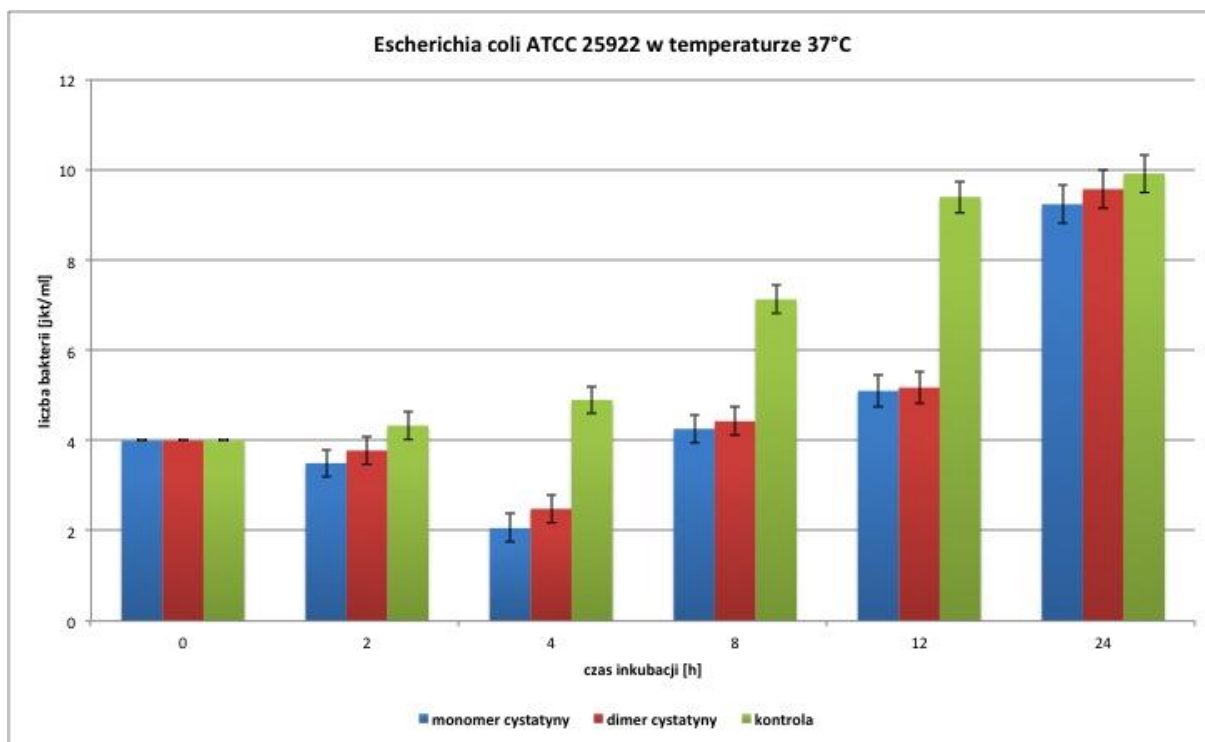
Rycina 5d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	2,49	0,36	0,13	2,26	0,26	0,09	4,16	0,26	0,09
4	1,91	0,27	0,10	1,89	0,30	0,11	4,25	0,24	0,09
8	3,24	0,37	0,13	3,11	0,34	0,12	6,10	0,27	0,10
12	4,11	0,27	0,10	4,27	0,40	0,15	8,15	0,38	0,14
24	7,90	0,33	0,12	8,09	0,46	0,17	8,30	0,37	0,13

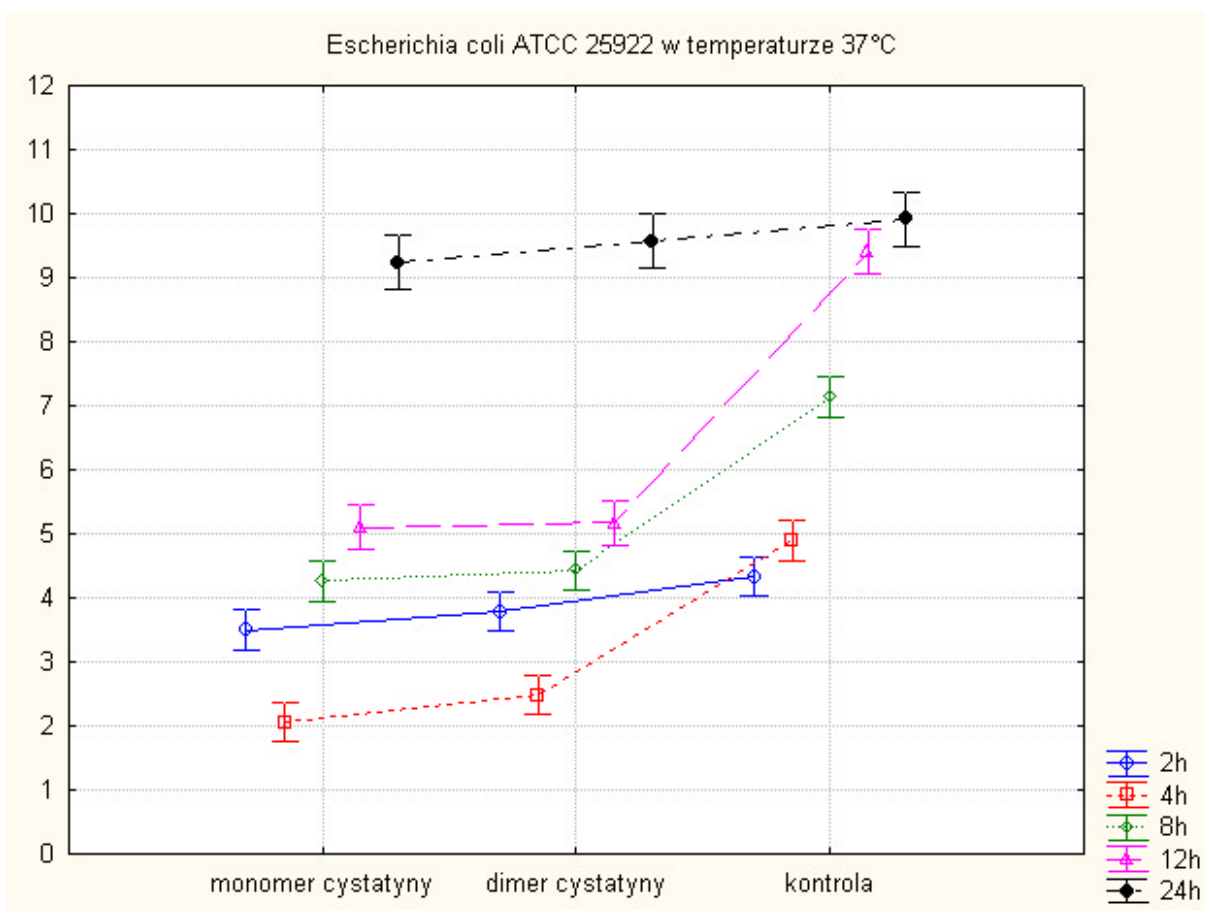
Rycina 6a. Krzywe przeżycia szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 6b. Porównanie wzrostu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 6c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 6d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,50	0,33	0,12	3,78	0,51	0,19	4,33	0,27	0,10
4	2,06	0,28	0,10	2,49	0,35	0,13	4,90	0,51	0,19
8	4,26	0,28	0,10	4,43	0,46	0,17	7,13	0,41	0,15
12	5,10	0,30	0,11	5,17	0,47	0,17	9,40	0,53	0,20
24	9,24	0,59	0,22	9,57	0,51	0,19	9,92	0,50	0,18

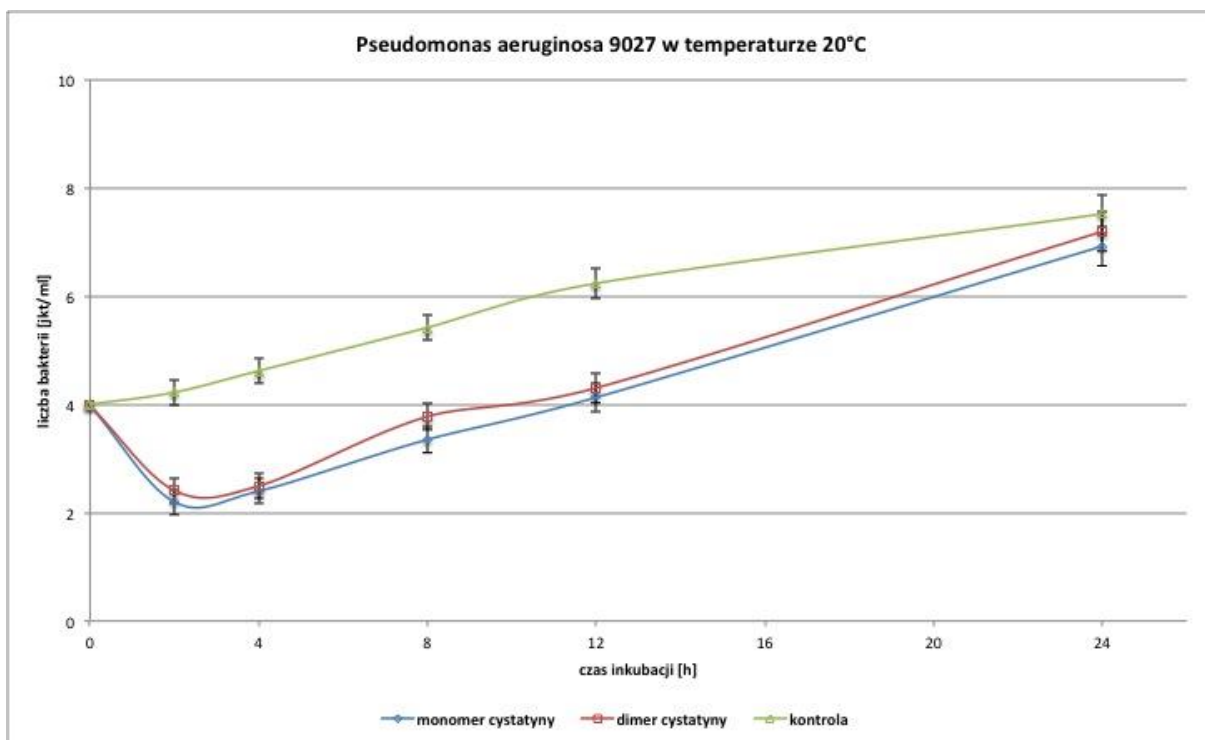
2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

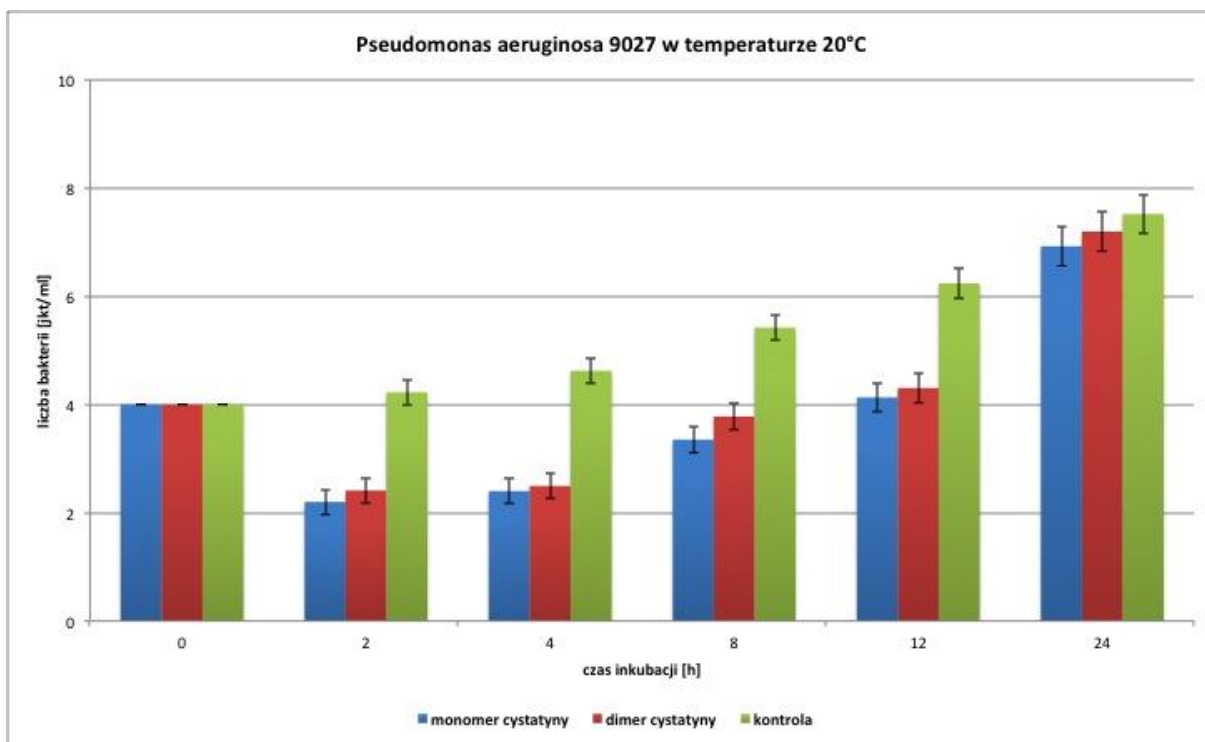
W materiale badawczym z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanym w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , największy spadek liczby bakterii testowych odnotowano po ok. 2 godzinach od posiewu. Następnie odnotowano stopniowy wzrost liczby bakterii, a ich stabilizacja poniżej wyjściowej liczby bakterii (czas 0) utrzymywała się do ok. 10 godziny inkubacji w temperaturze 20°C oraz 8 godziny inkubacji w temperaturze 37°C .

W próbkach kontrolnych, bez dodatku biopreparatu cystatyny, inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C zaobserwowano intensywny wzrost liczby drobnoustrojów przez cały czas doświadczenia.

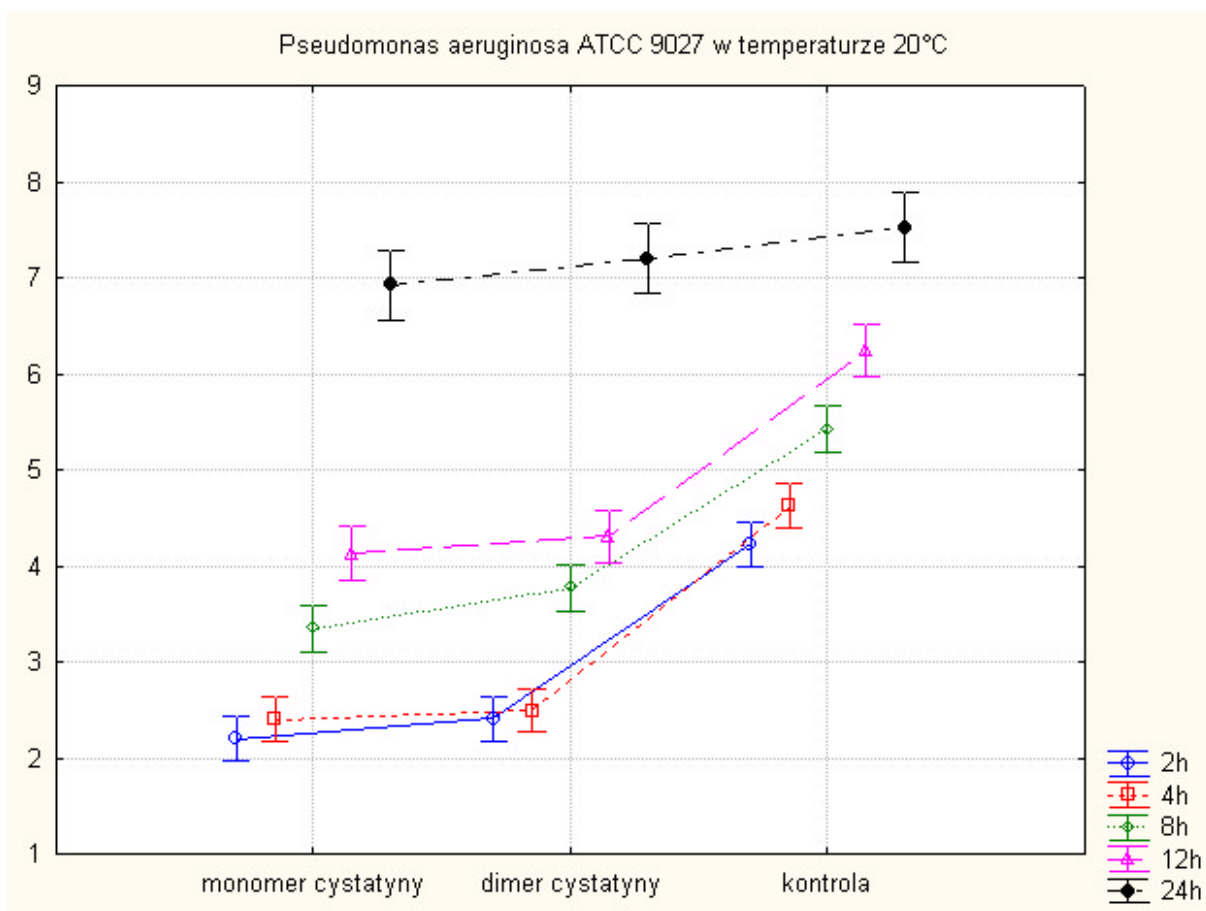
Rycina 7a. Krzywe przeżycia szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem $100 \mu\text{g}$ monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C .



Rycina 7b. Porównanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



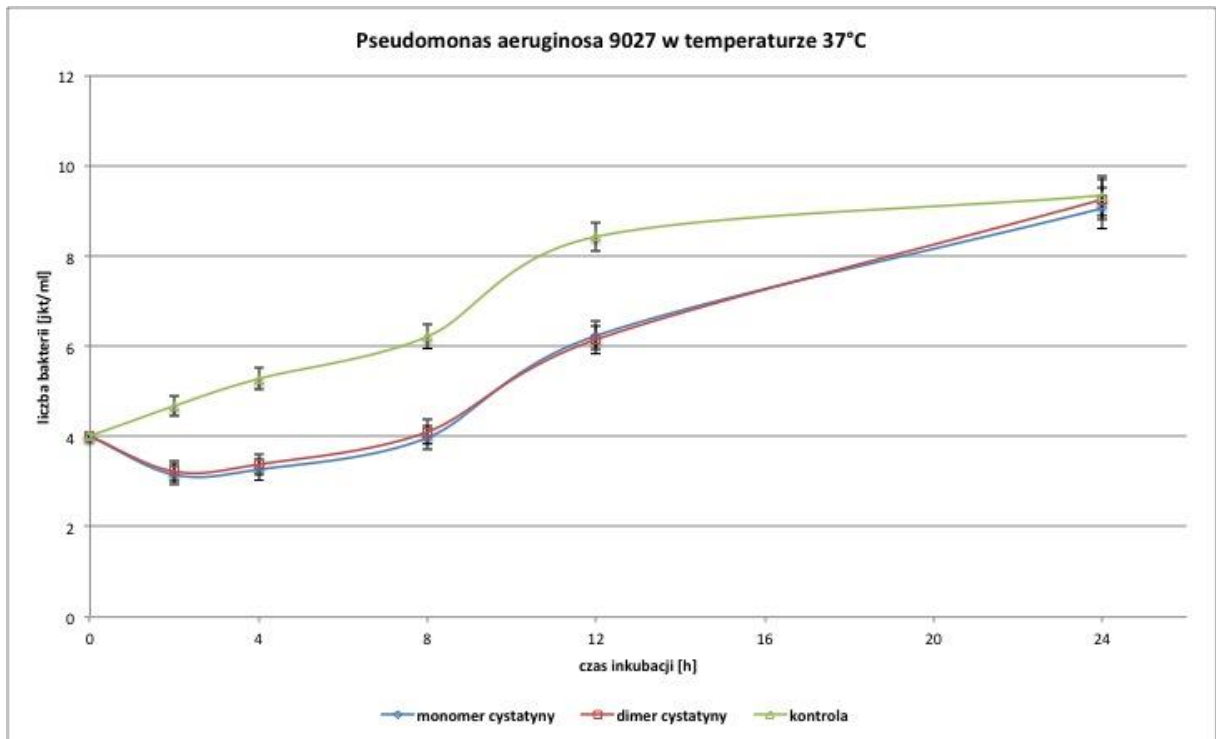
Rycina 7c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



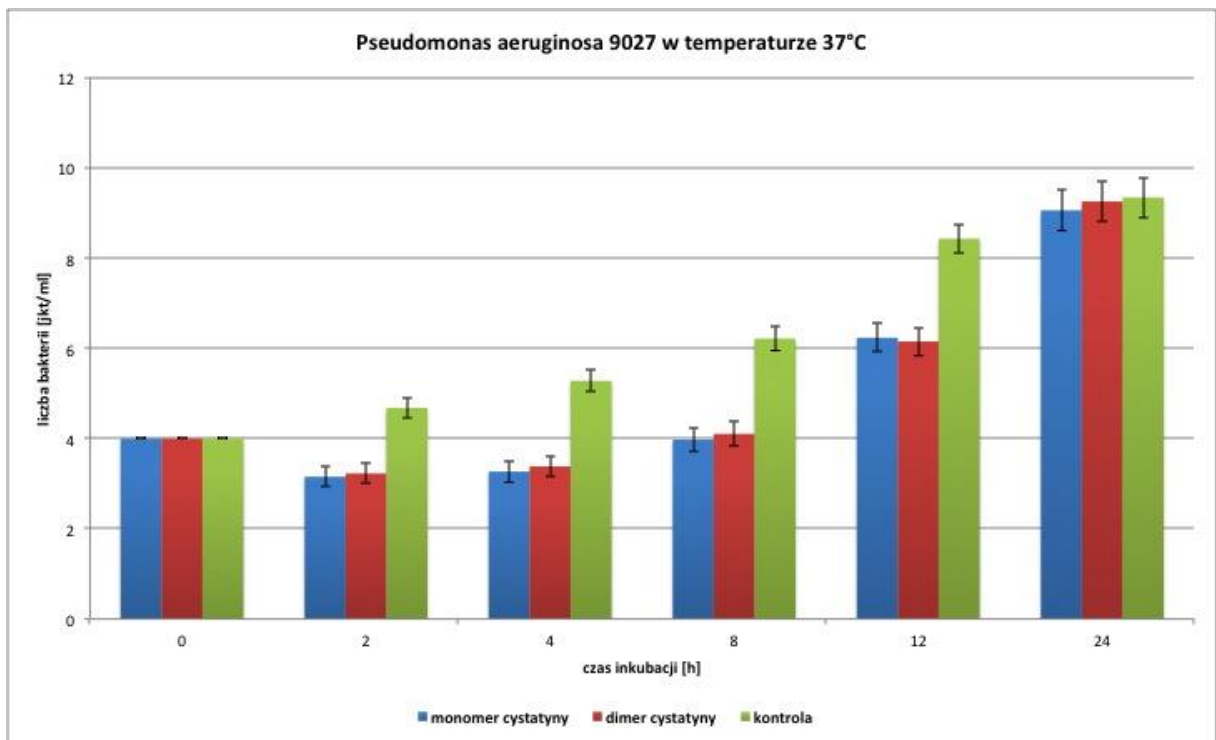
Rycina 7d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	2,20	0,30	0,11	2,41	0,32	0,12	4,22	0,27	0,10
4	2,40	0,25	0,09	2,49	0,33	0,12	4,62	0,28	0,10
8	3,35	0,28	0,10	3,78	0,30	0,11	5,42	0,34	0,12
12	4,13	0,31	0,11	4,31	0,29	0,10	6,24	0,42	0,15
24	6,92	0,43	0,16	7,19	0,46	0,17	7,52	0,47	0,17

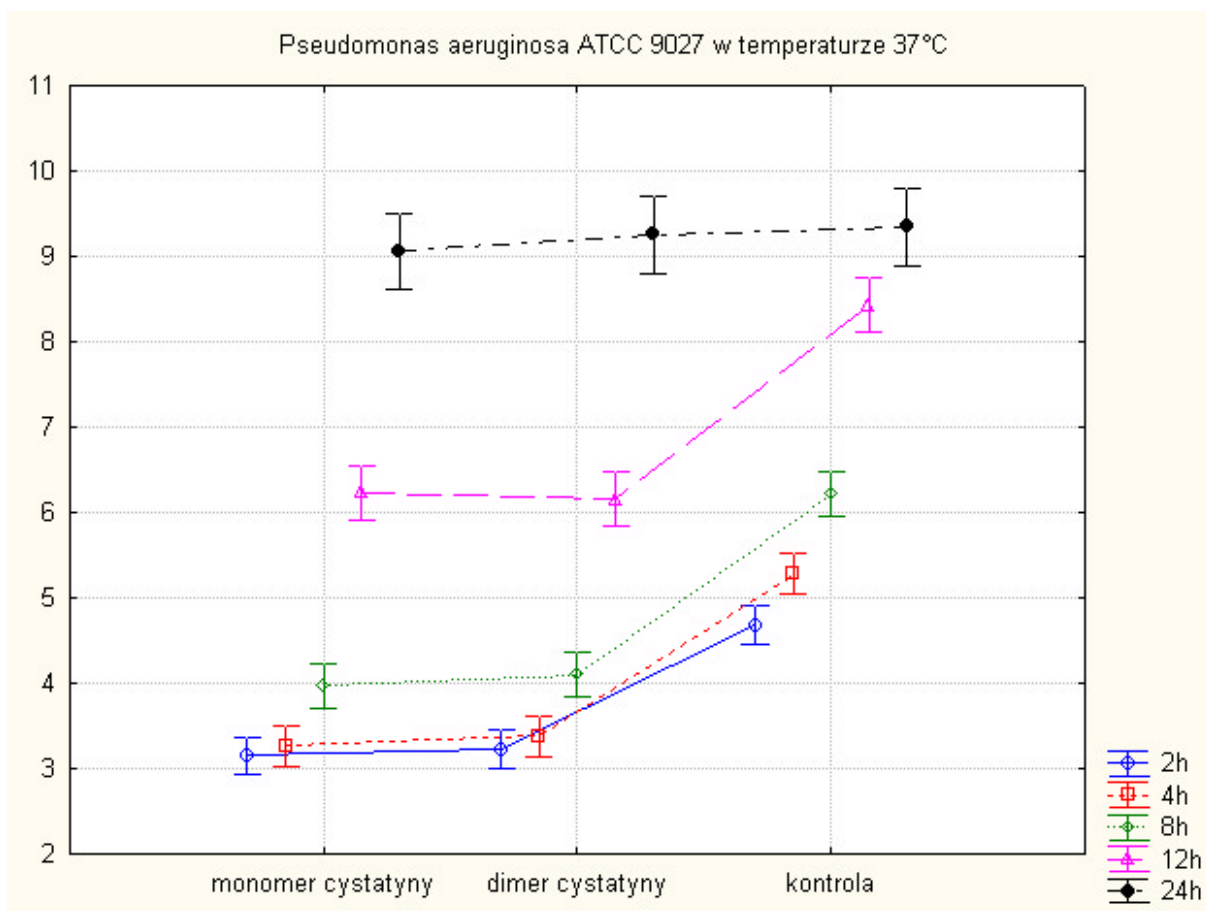
Rycina 8a. Krzywe przeżycia szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 8b. Porównanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 8c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 8d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

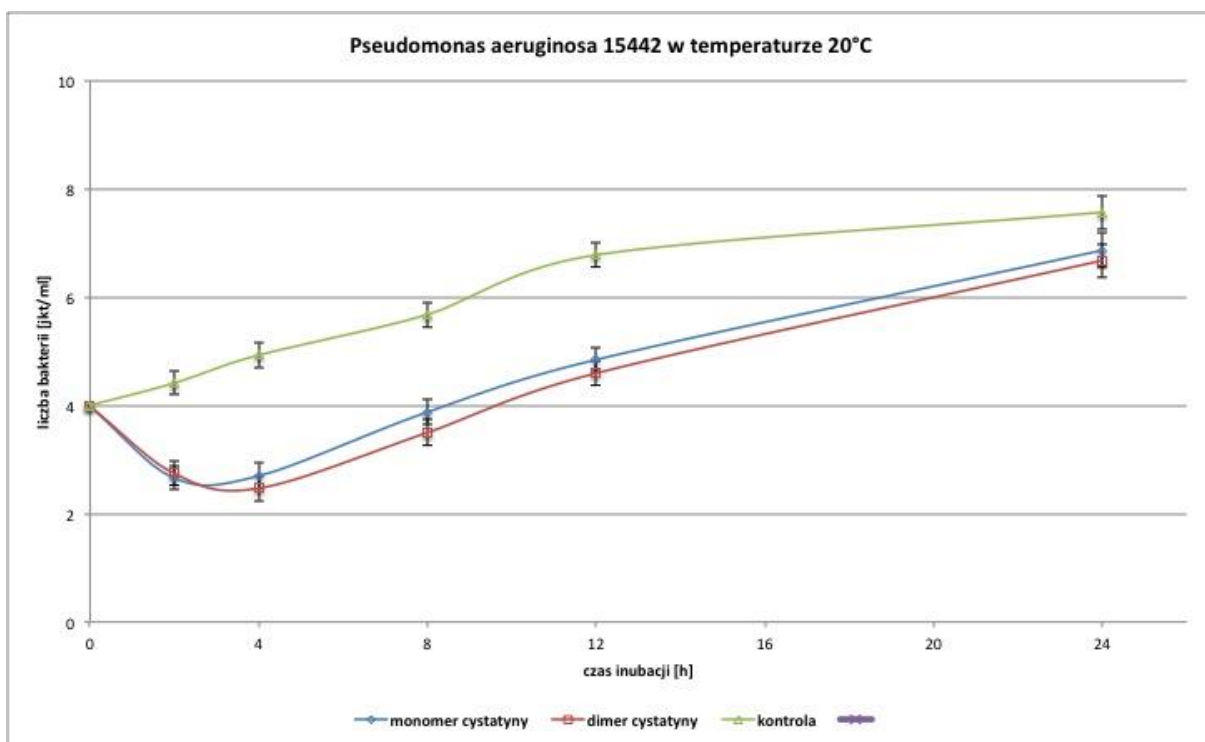
Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,15	0,28	0,10	3,23	0,30	0,11	4,68	0,26	0,09
4	3,27	0,32	0,12	3,38	0,32	0,12	5,28	0,24	0,09
8	3,97	0,35	0,13	4,10	0,31	0,11	6,22	0,34	0,12
12	6,23	0,32	0,12	6,15	0,47	0,17	8,43	0,40	0,15
24	9,06	0,63	0,23	9,26	0,56	0,21	9,34	0,50	0,18

2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

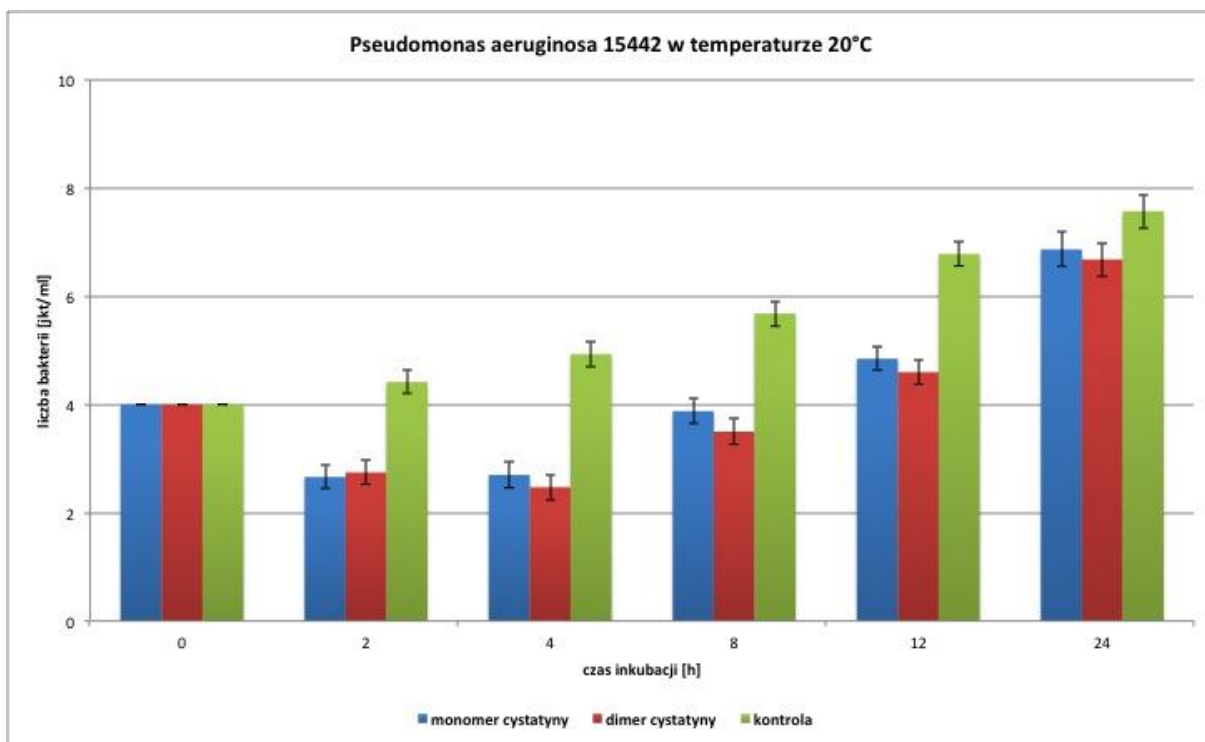
W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , liczba bakterii uległa istotnej redukcji po 4 godzinach od posiewu. Od ok. 10 godziny od posiewu odnotowano wzrost liczby komórek bakteryjnych powyżej liczby bakterii przyjętej na początku doświadczenia (czas 0). Inkubacja tych samych próbek w temperaturze 37°C charakteryzowała się największą redukcją liczby bakterii po około 2 godzinach od posiewu w przypadku próbek z dodatkiem monomeru cystatyny oraz po około 4 godzinach od posiewu w przypadku próbek z dodatkiem dimeru cystatyny. Stopień redukcji liczby bakterii poniżej poziomu wyjściowego (czas 0) utrzymywał się do 8 godziny inkubacji dla próbek z dodatkiem monomeru i dimeru cystatyny inkubowanych w temperaturze 37°C .

W próbkach kontrolnych, bez dodatku biopreparatu cystatyny, inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C zaobserwowano intensywny wzrost liczby drobnoustrojów przez cały czas doświadczenia.

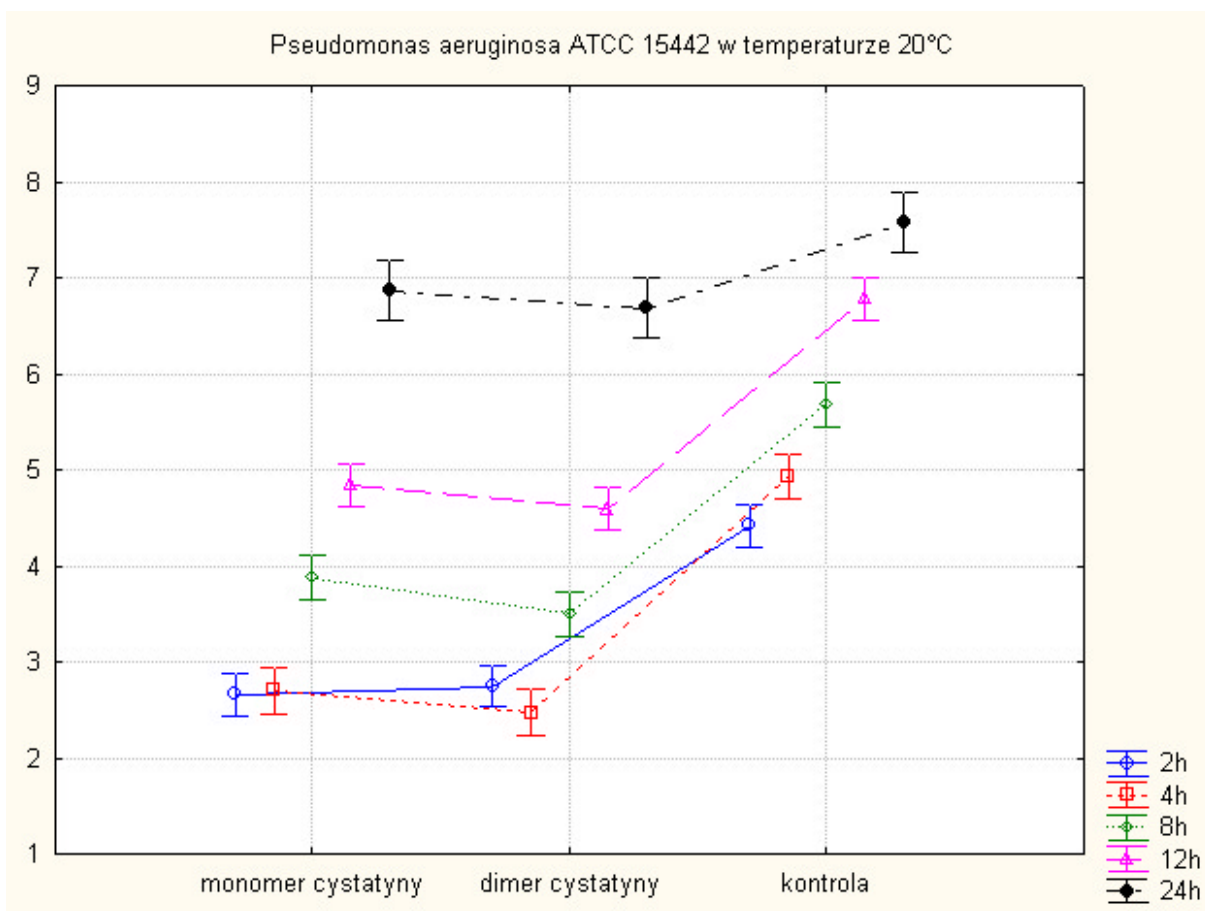
Rycina 9a. Krzywe przeżycia szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



Rycina 9b. Porównanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



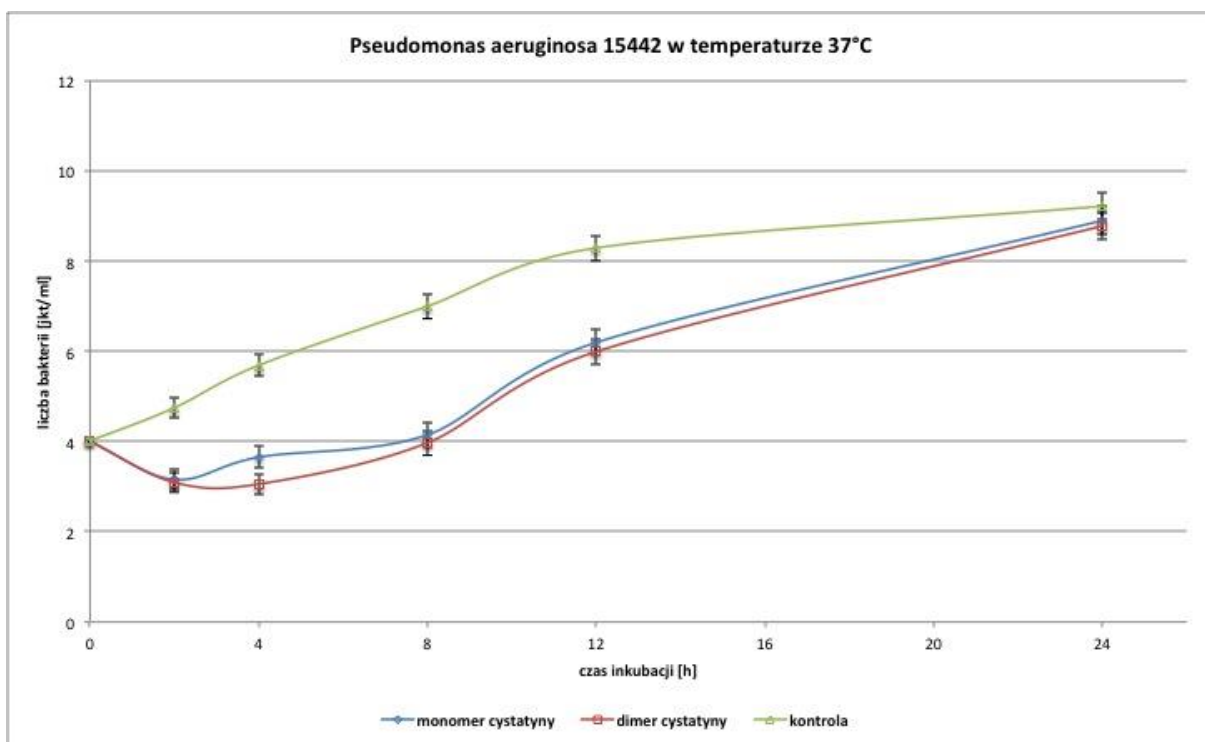
Rycina 9c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



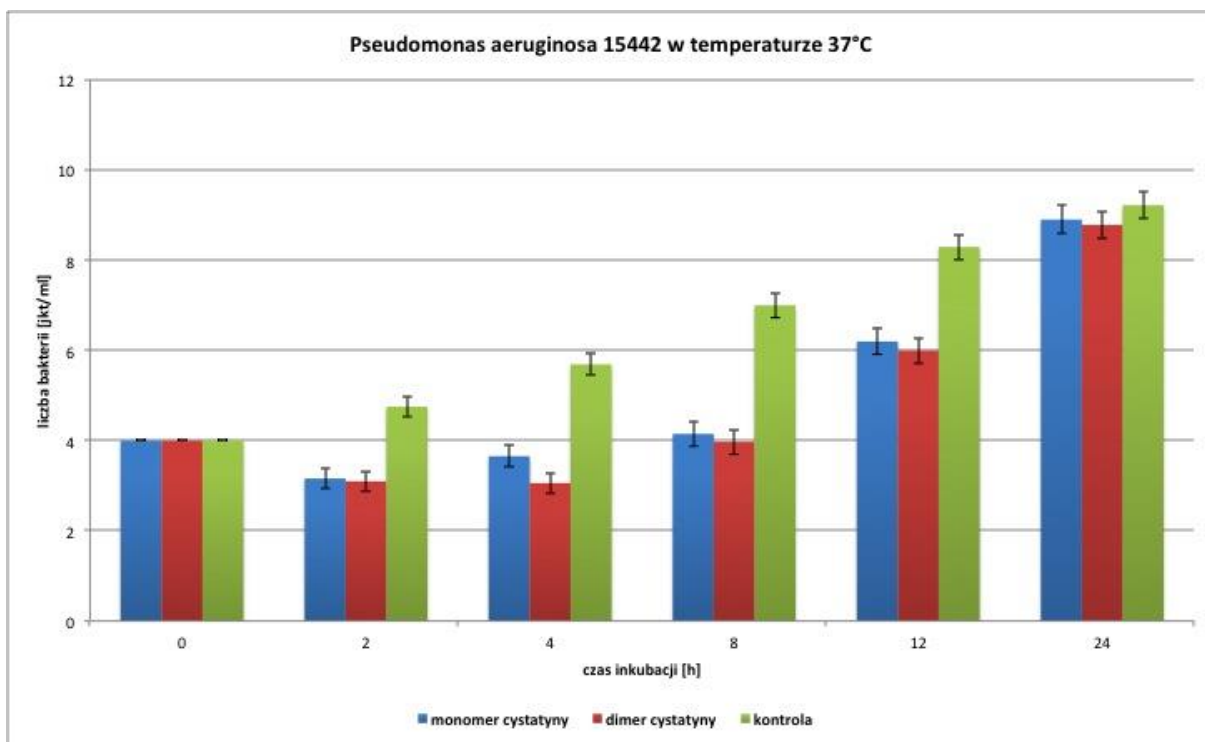
Rycina 9d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	2,66	0,23	0,08	2,74	0,31	0,11	4,42	0,27	0,10
4	2,70	0,23	0,08	2,47	0,41	0,15	4,93	0,23	0,08
8	3,88	0,23	0,08	3,50	0,37	0,13	5,68	0,26	0,09
12	4,85	0,28	0,10	4,60	0,28	0,10	6,77	0,30	0,11
24	6,87	0,42	0,15	6,68	0,38	0,14	7,57	0,37	0,13

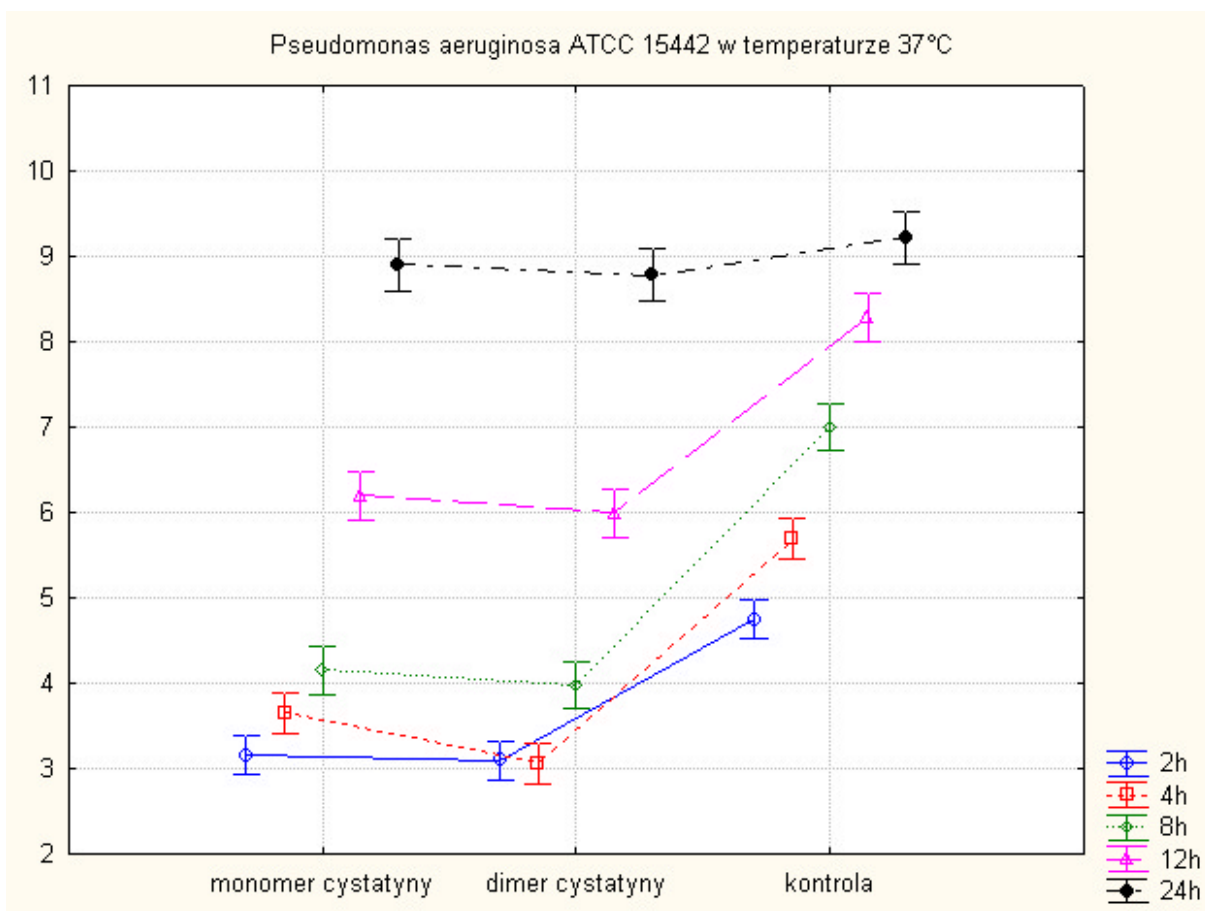
Rycina 10a. Krzywe przeżycia szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 10b. Porównanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 10c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 10d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

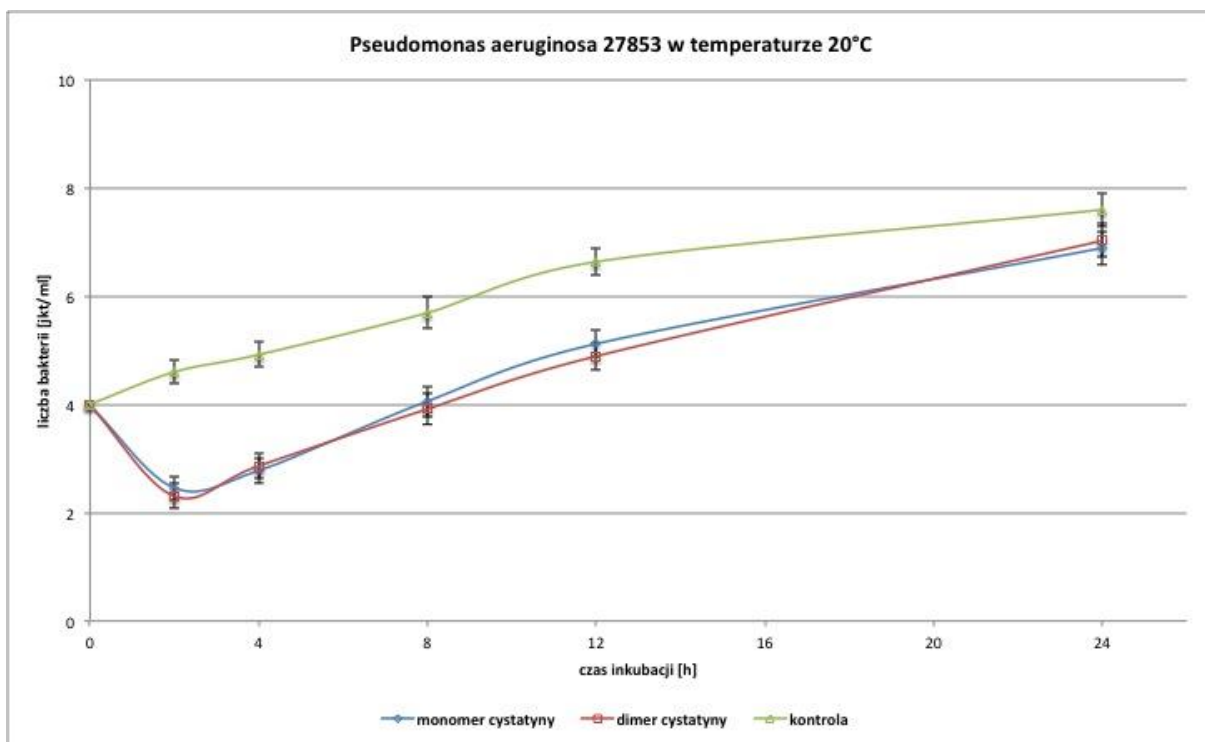
Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,16	0,34	0,12	3,10	0,21	0,07	4,75	0,27	0,10
4	3,65	0,31	0,11	3,06	0,33	0,12	5,69	0,24	0,09
8	4,15	0,31	0,11	3,97	0,36	0,13	7,00	0,37	0,13
12	6,20	0,35	0,13	5,99	0,39	0,14	8,29	0,33	0,12
24	8,90	0,40	0,15	8,78	0,40	0,15	9,22	0,36	0,13

2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

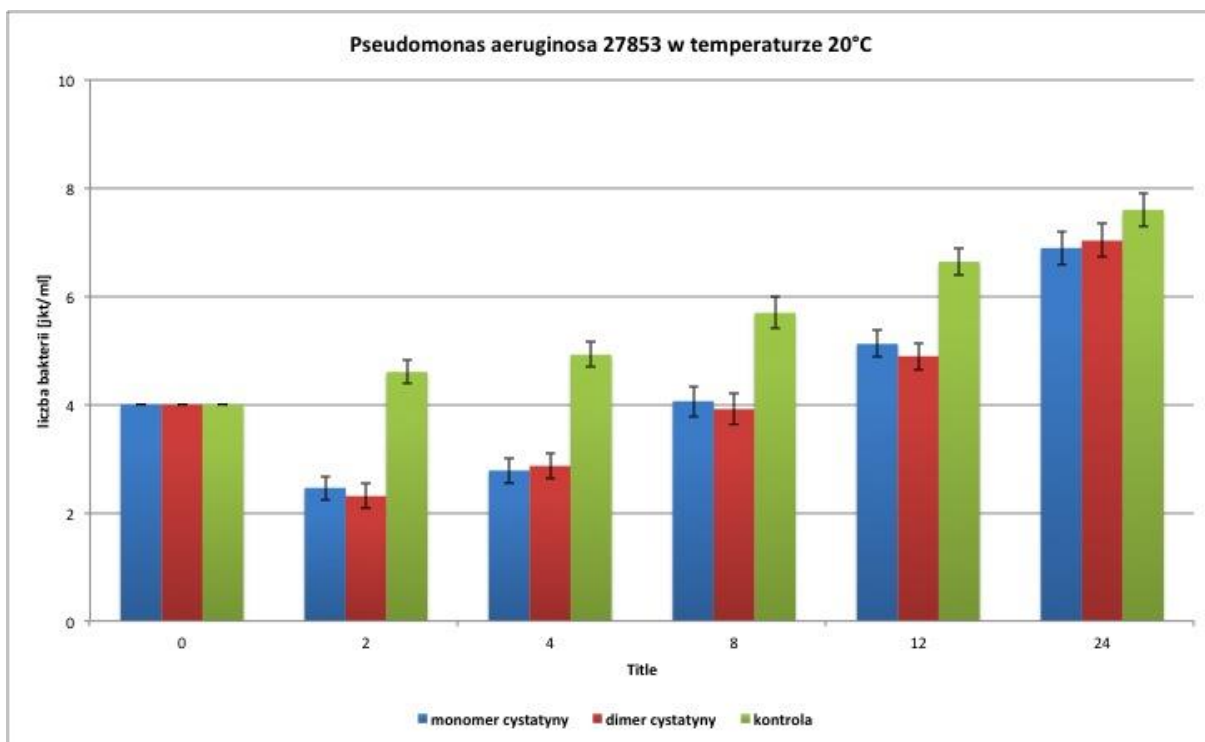
W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C w płynnym podłożu Muellera - Hinton, liczba bakterii uległa istotnej redukcji po ok. 2 godzinach od posiewu. Od ok. 8 godziny od posiewu, w obu temperaturach inkubacji, odnotowano wzrost liczby komórek bakteryjnych powyżej liczby bakterii przyjętej na początku doświadczenia (czas 0).

W próbkach kontrolnych, bez dodatku biopreparatu cystatyny, inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C zaobserwowano intensywny wzrost liczby drobnoustrojów przez cały czas doświadczenia.

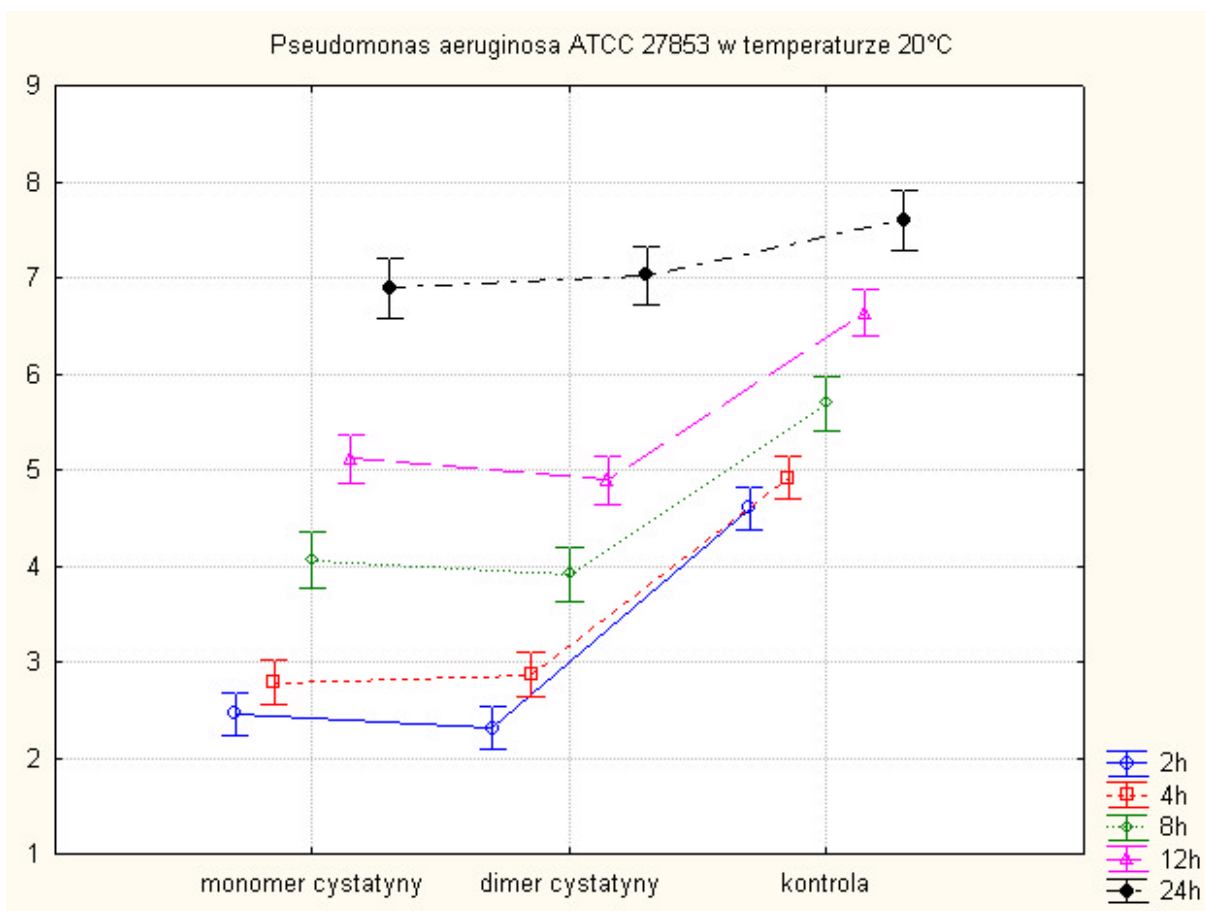
Rycina 11a. Krzywe przeżycia szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem $100 \mu\text{g}$ monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C .



Rycina 11b. Porównanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



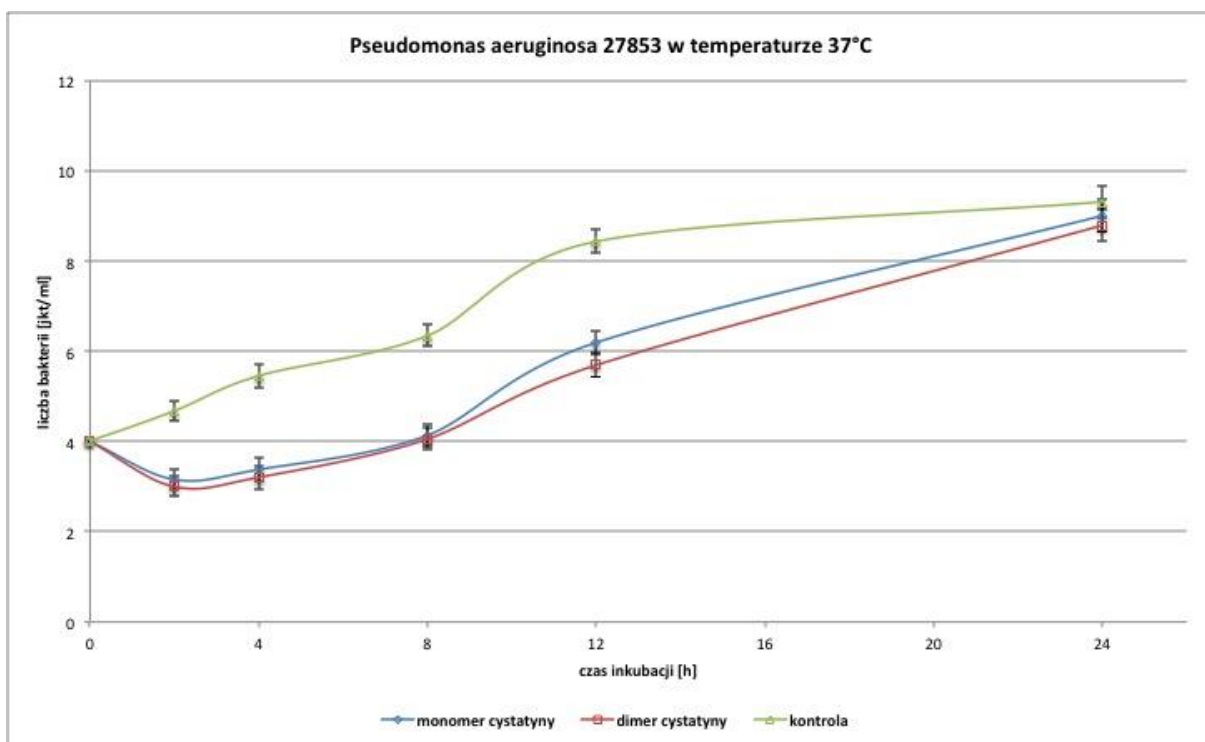
Rycina 11c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



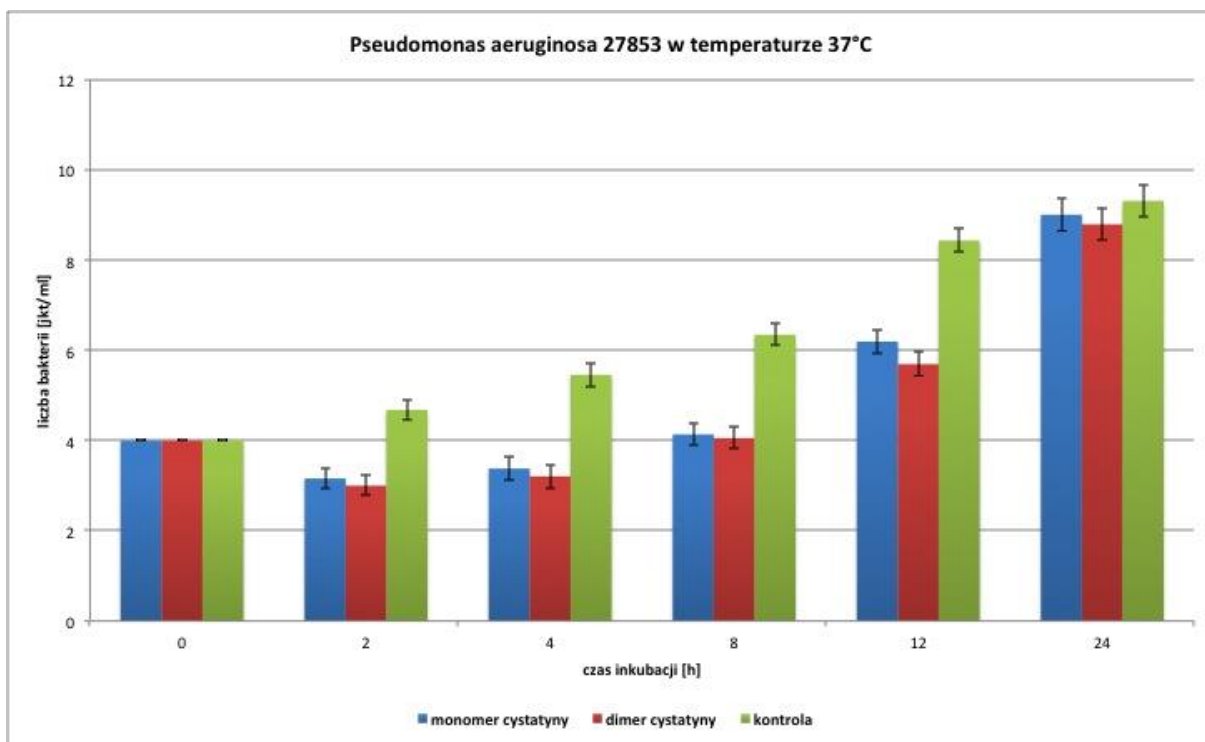
Rycina 11d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	2,46	0,25	0,09	2,31	0,34	0,12	4,60	0,24	0,09
4	2,78	0,25	0,09	2,86	0,37	0,13	4,92	0,24	0,09
8	4,06	0,36	0,13	3,92	0,43	0,16	5,69	0,27	0,10
12	5,12	0,22	0,08	4,89	0,42	0,15	6,64	0,28	0,10
24	6,89	0,39	0,14	7,03	0,39	0,14	7,60	0,38	0,14

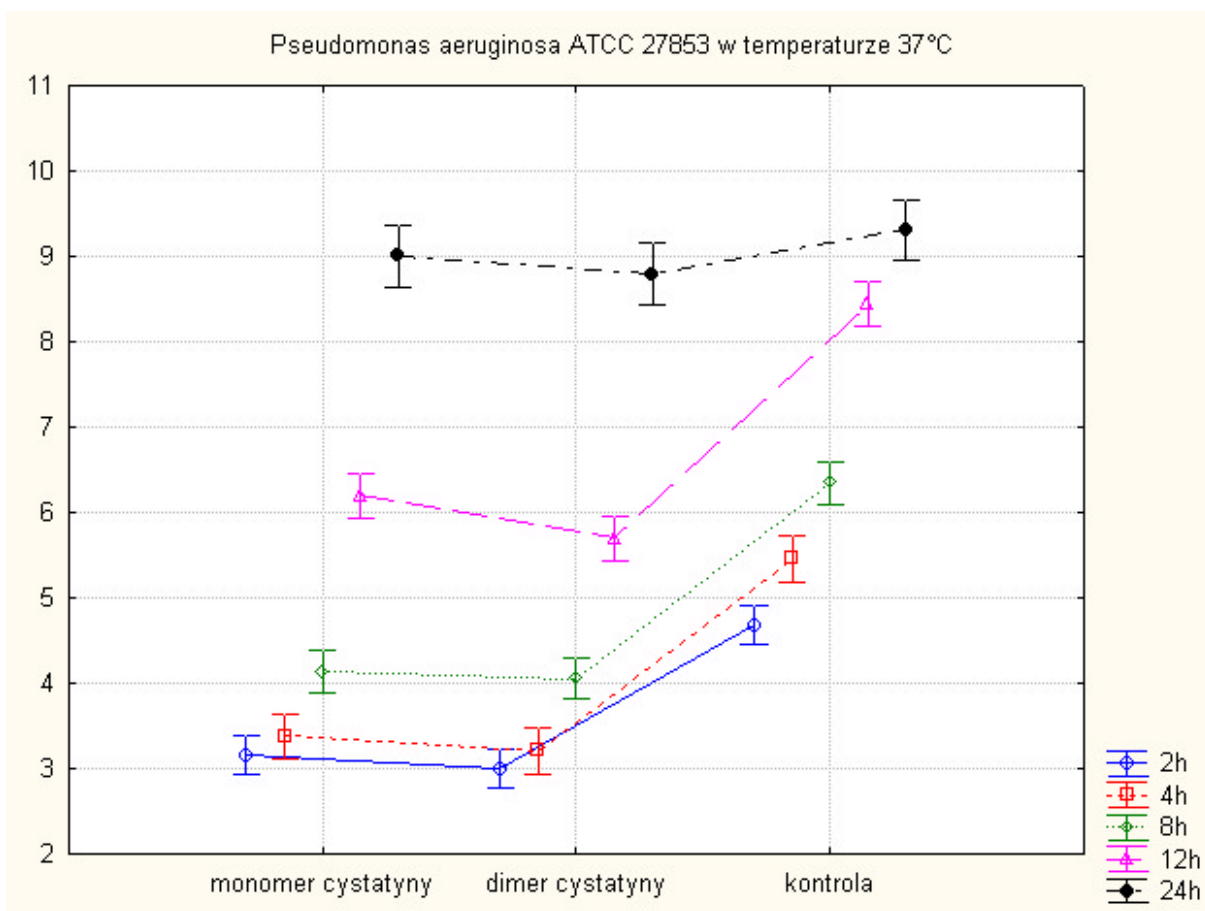
Rycina 12a. Krzywe przeżycia szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 12b. Porównanie wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 12c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 12d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,16	0,34	0,12	3,00	0,25	0,09	4,68	0,24	0,09
4	3,38	0,36	0,13	3,21	0,31	0,11	5,46	0,33	0,12
8	4,14	0,32	0,12	4,05	0,35	0,13	6,35	0,24	0,09
12	6,19	0,31	0,11	5,69	0,40	0,15	8,43	0,25	0,09
24	9,01	0,40	0,15	8,79	0,49	0,18	9,31	0,46	0,17

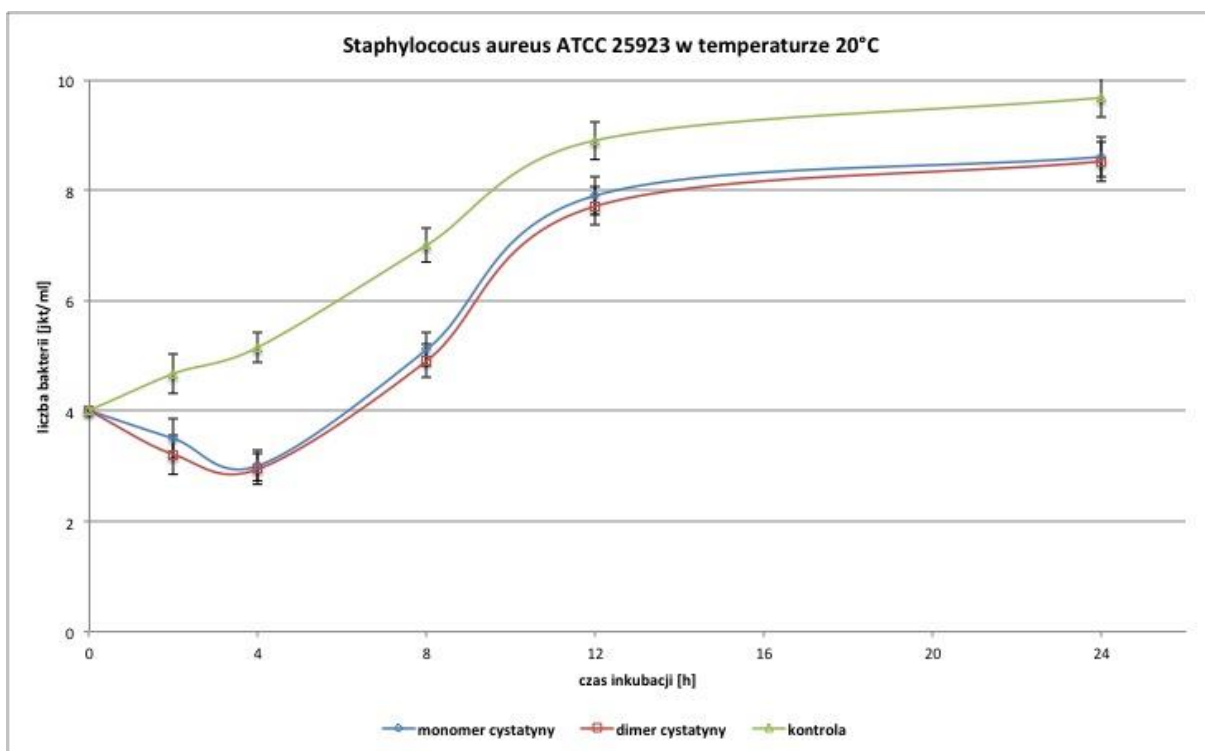
2.3. *Staphylococcus aureus*

2.3.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

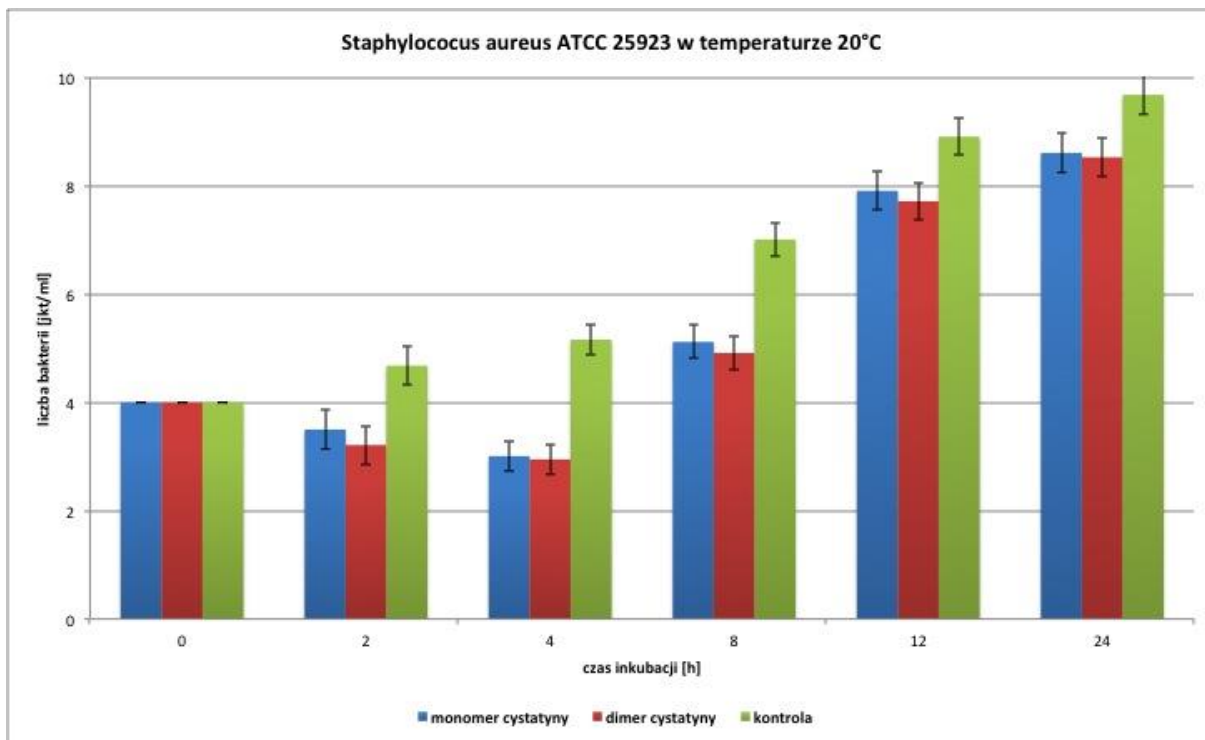
W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , liczba bakterii uległa znaczącej redukcji po ok. 4 godzinach inkubacji. Wzrost liczby komórek bakteryjnych powyżej liczby bakterii w godzinie 0 doświadczenia nastąpił po 6 godzinach inkubacji, zarówno w temperaturze 20°C i 37°C .

W próbkach kontrolnych, bez dodatku biopreparatu cystatyny, inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C zaobserwowano intensywny wzrost liczby drobnoustrojów przez cały czas doświadczenia.

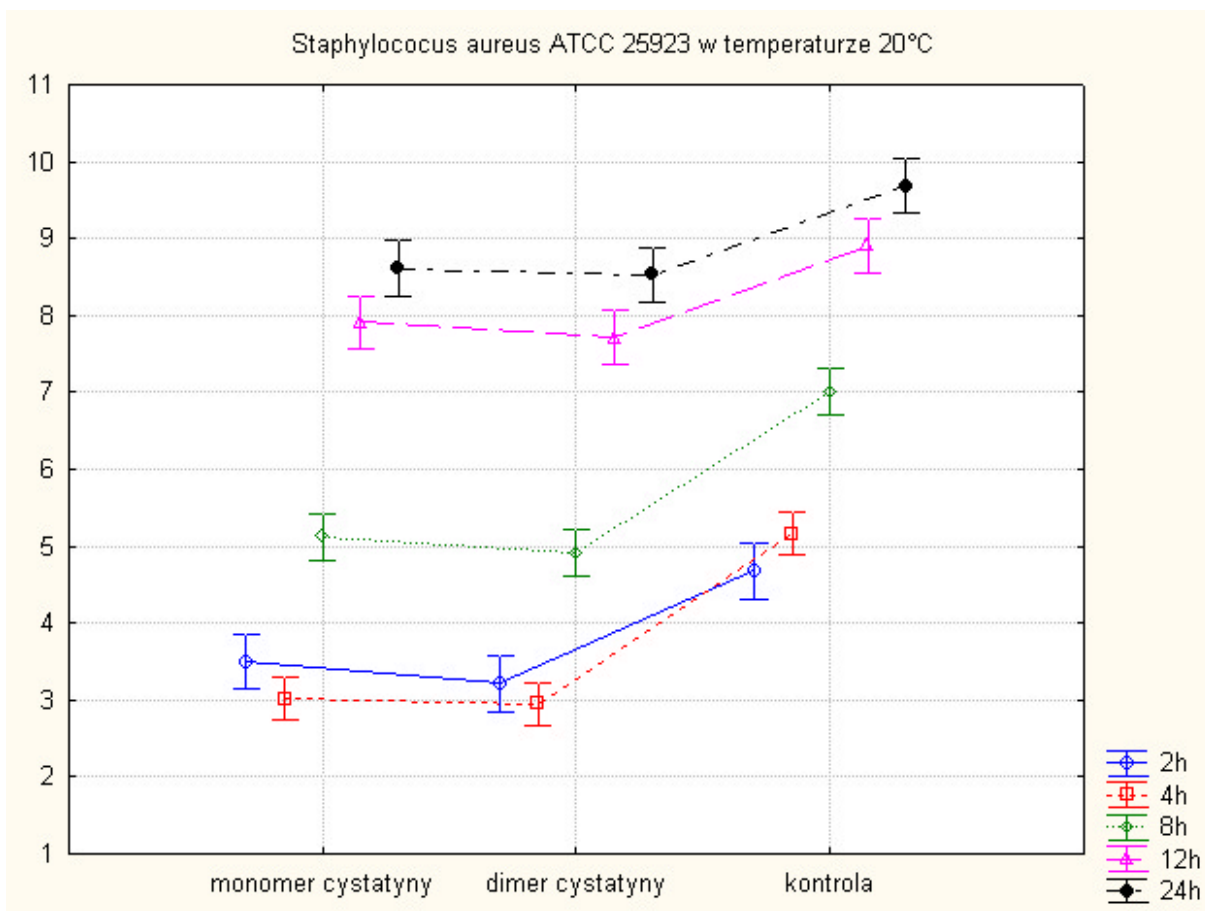
Rycina 13a. Krzywe przeżycia szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem $100 \mu\text{g}$ monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C .



Rycina 13b. Porównanie wzrostu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



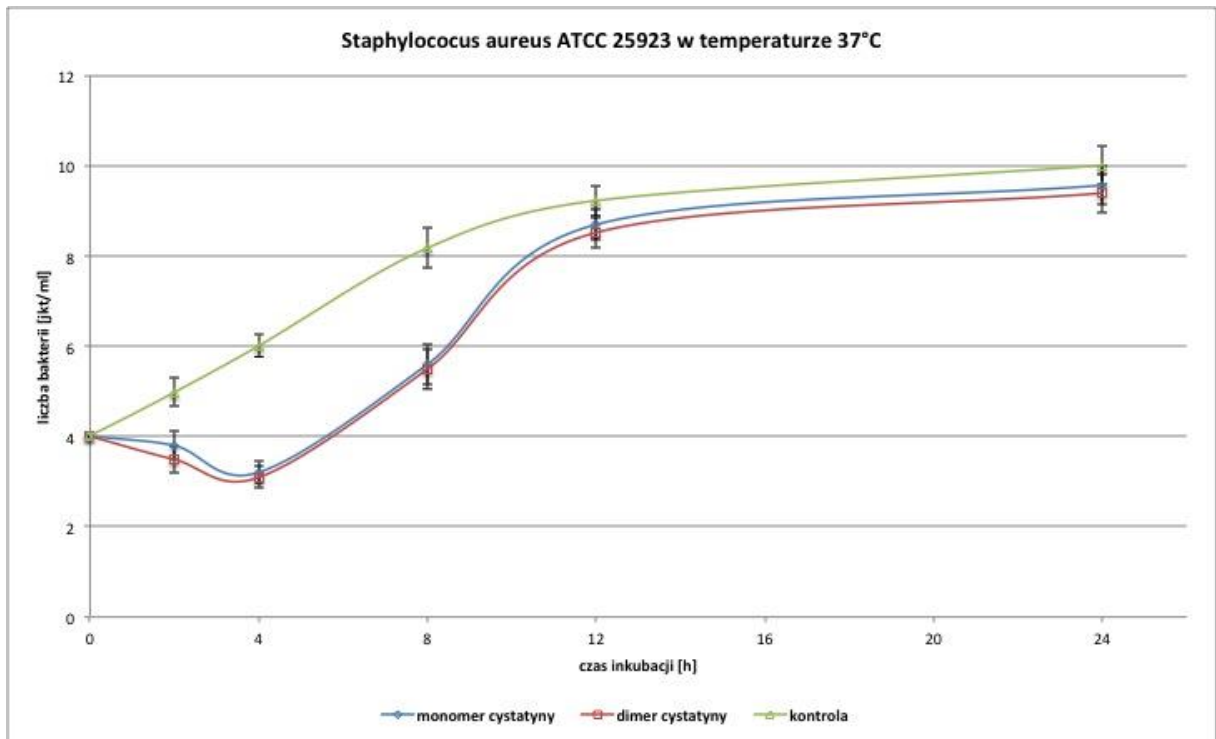
Rycina 13c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



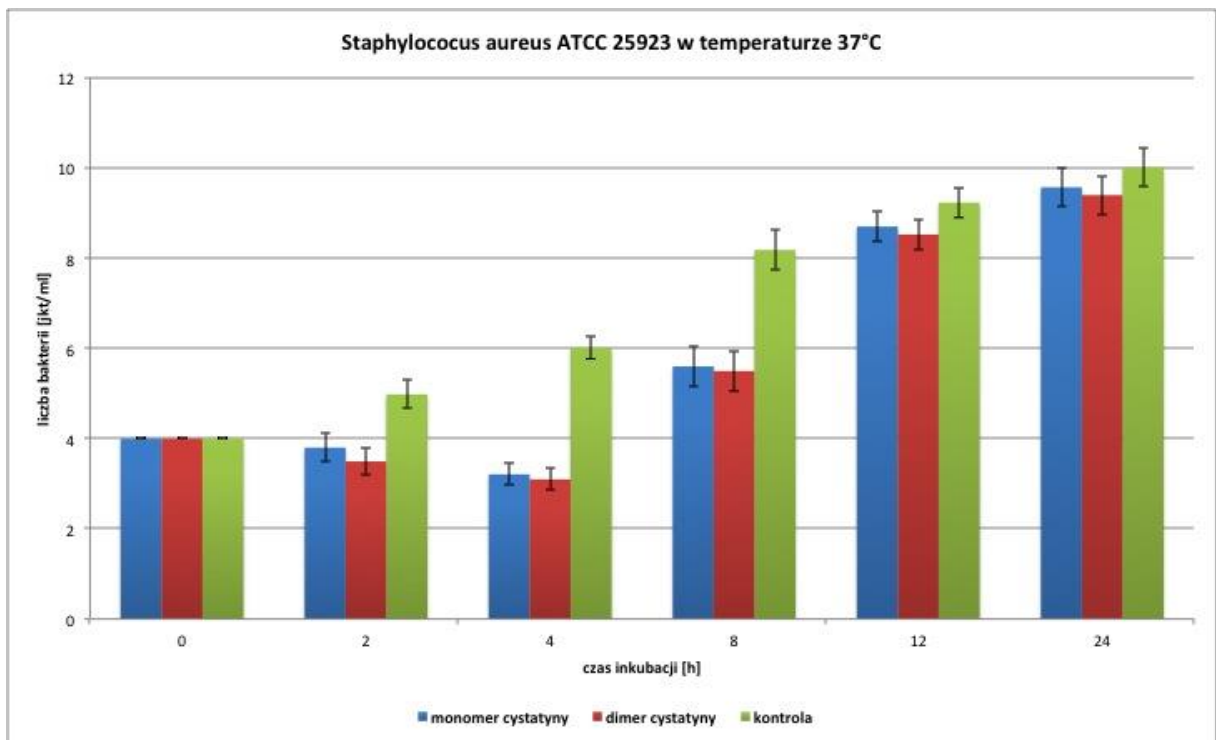
Rycina 13d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,50	0,53	0,20	3,21	0,36	0,13	4,68	0,45	0,17
4	3,01	0,40	0,15	2,95	0,34	0,12	5,16	0,30	0,11
8	5,12	0,30	0,11	4,91	0,47	0,17	7,01	0,37	0,13
12	7,91	0,29	0,10	7,72	0,45	0,17	8,91	0,54	0,20
24	8,61	0,43	0,16	8,53	0,40	0,15	9,68	0,53	0,20

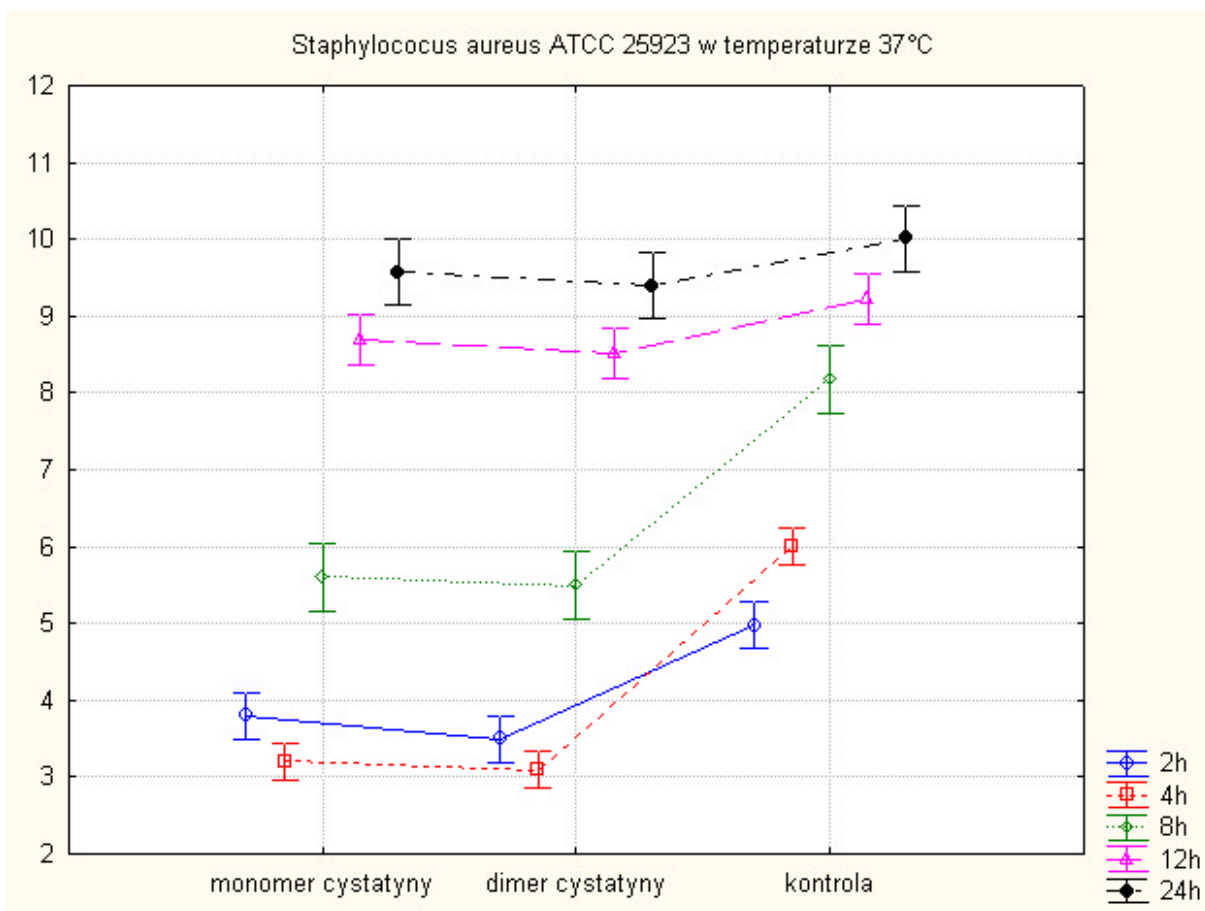
Rycina 14a. Krzywe przeżycia szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 14b. Porównanie wzrostu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 14c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 14d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

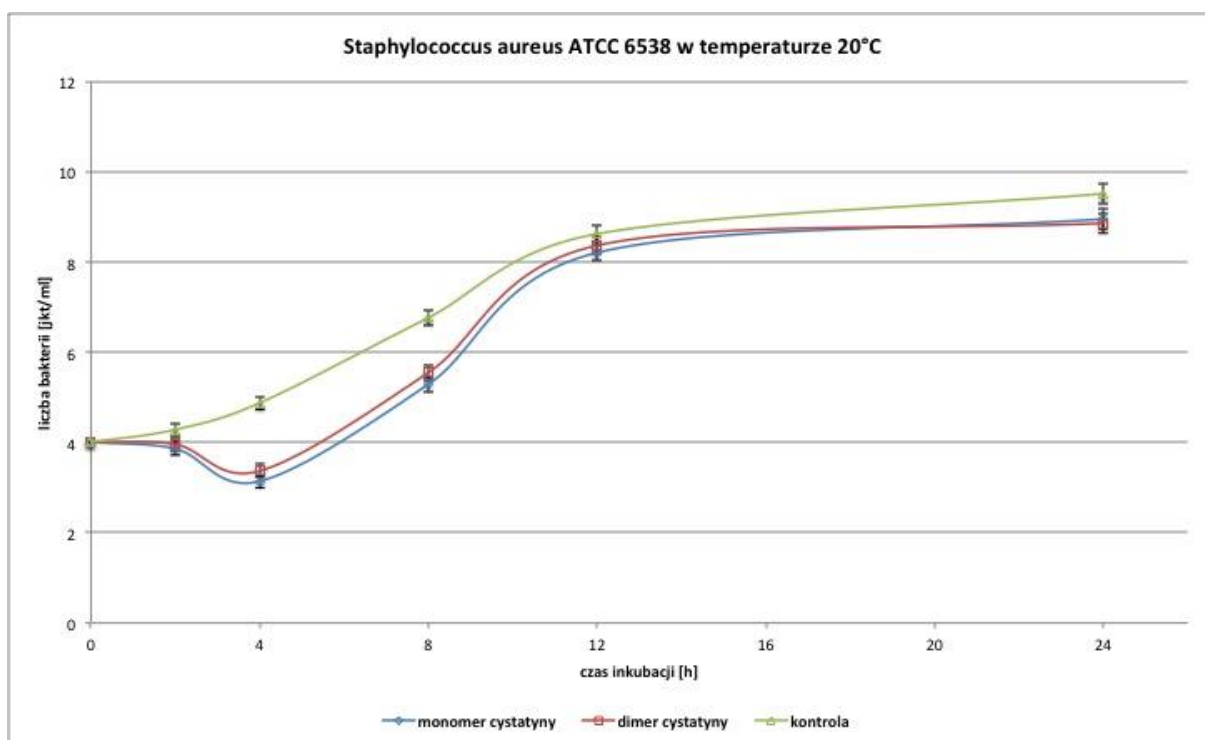
Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,80	0,44	0,16	3,49	0,35	0,13	4,98	0,37	0,13
4	3,21	0,28	0,10	3,09	0,34	0,12	6,01	0,29	0,10
8	5,60	0,59	0,22	5,50	0,39	0,14	8,18	0,66	0,24
12	8,70	0,30	0,11	8,52	0,49	0,18	9,23	0,44	0,16
24	9,57	0,66	0,24	9,40	0,45	0,17	10,01	0,50	0,18

2.3.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

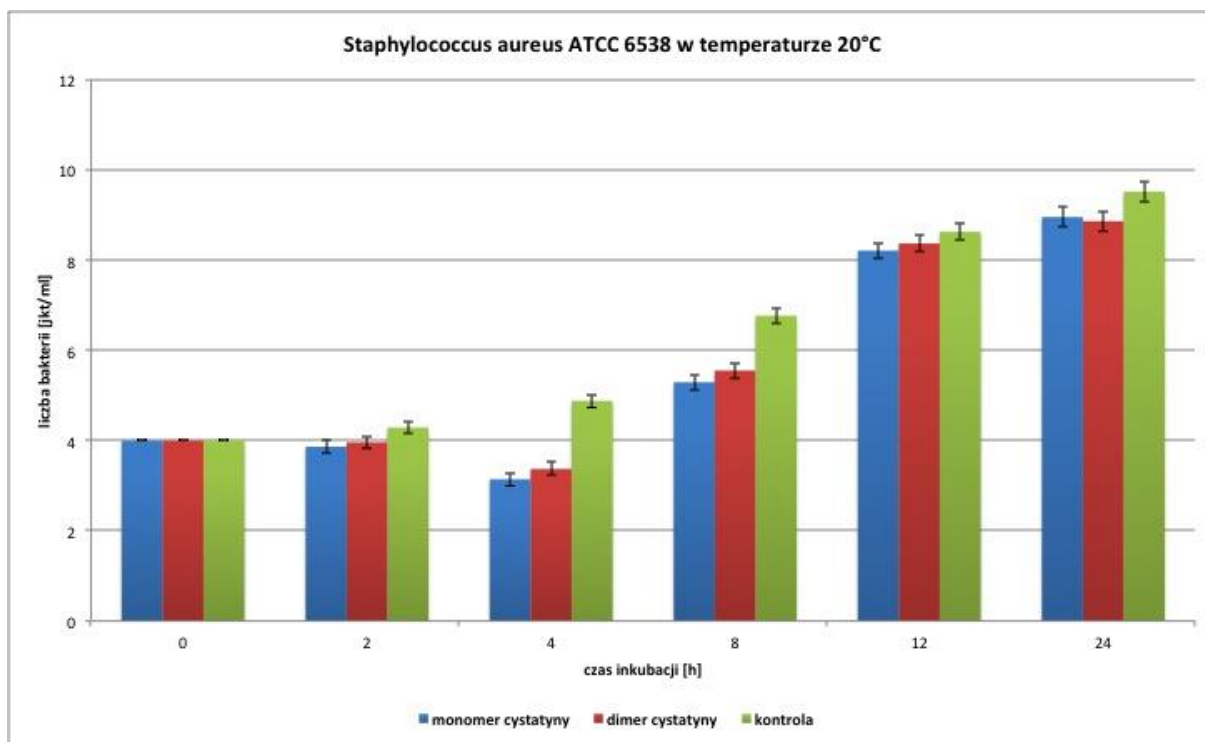
W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , największy stopień redukcji liczby bakterii zaobserwowano po około 4 godzinach inkubacji. Wzrost liczby komórek bakteryjnych powyżej liczby bakterii w godzinie 0 doświadczenia nastąpił po około 6 godzinach inkubacji, zarówno w temperaturze 20°C i 37°C .

W próbkach kontrolnych, bez dodatku biopreparatu cystatyny, inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C zaobserwowano intensywny wzrost liczby drobnoustrojów przez cały czas doświadczenia.

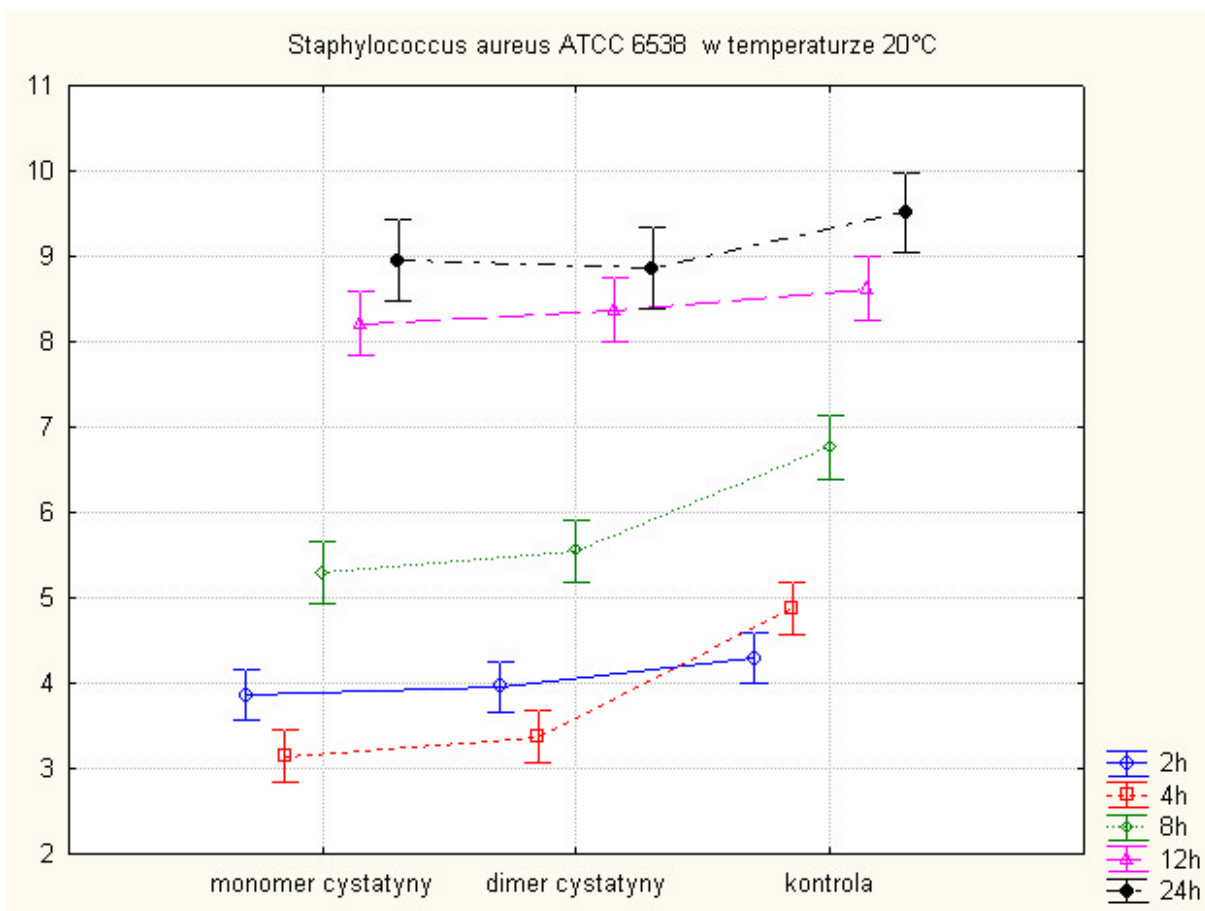
Rycina 15a. Krzywe przeżycia szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera- Hinton z dodatkiem $100 \mu\text{g}$ monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C .



Rycina 15b. Porównanie wzrostu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



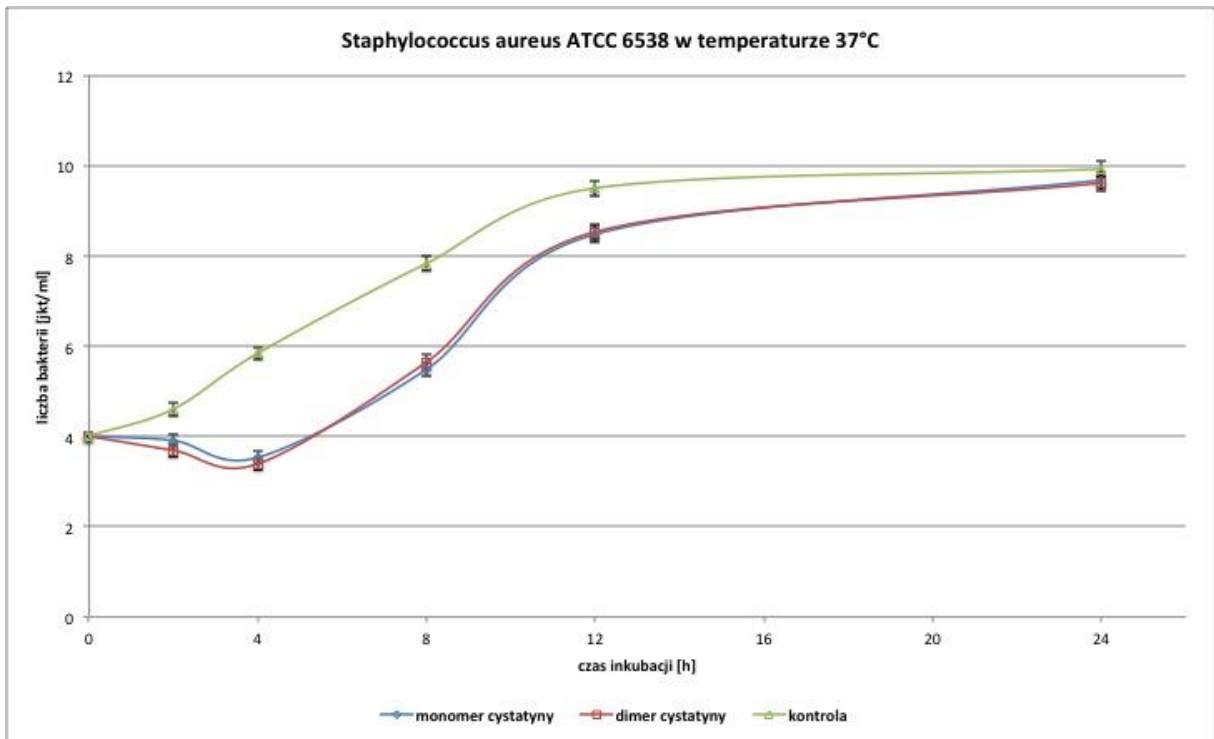
Rycina 15c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



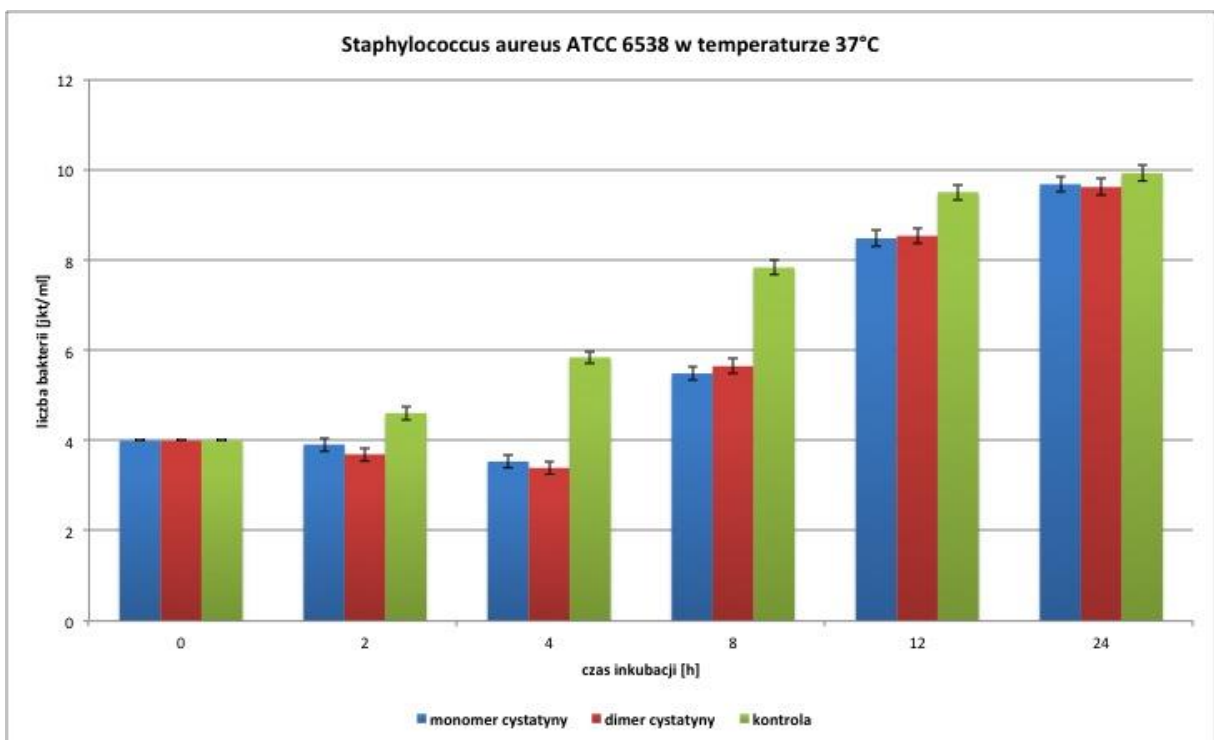
Rycina 15d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,86	0,44	0,16	3,96	0,29	0,10	4,29	0,37	0,13
4	3,14	0,34	0,12	3,37	0,32	0,12	4,88	0,49	0,18
8	5,29	0,52	0,19	5,55	0,38	0,14	6,77	0,48	0,18
12	8,21	0,47	0,17	8,37	0,55	0,20	8,63	0,38	0,14
24	8,95	0,67	0,25	8,86	0,65	0,24	9,52	0,43	0,16

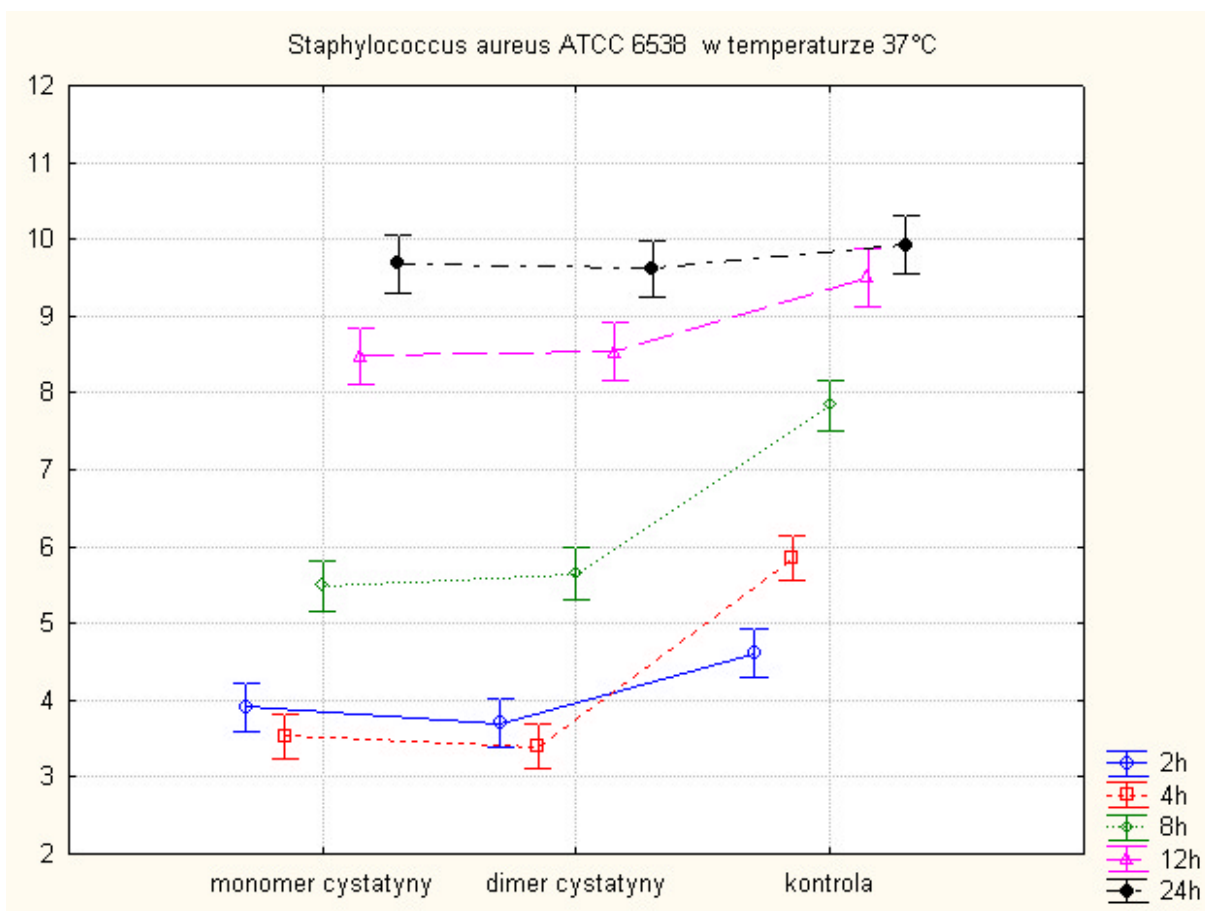
Rycina 16a. Krzywe przeżycia szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 16b. Porównanie wzrostu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 16c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 16d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,91	0,49	0,18	3,70	0,32	0,12	4,61	0,37	0,13
4	3,54	0,32	0,12	3,39	0,35	0,13	5,84	0,42	0,15
8	5,49	0,37	0,13	5,65	0,47	0,17	7,84	0,40	0,15
12	8,48	0,47	0,17	8,54	0,50	0,18	9,51	0,43	0,16
24	9,68	0,42	0,15	9,62	0,53	0,20	9,93	0,45	0,17

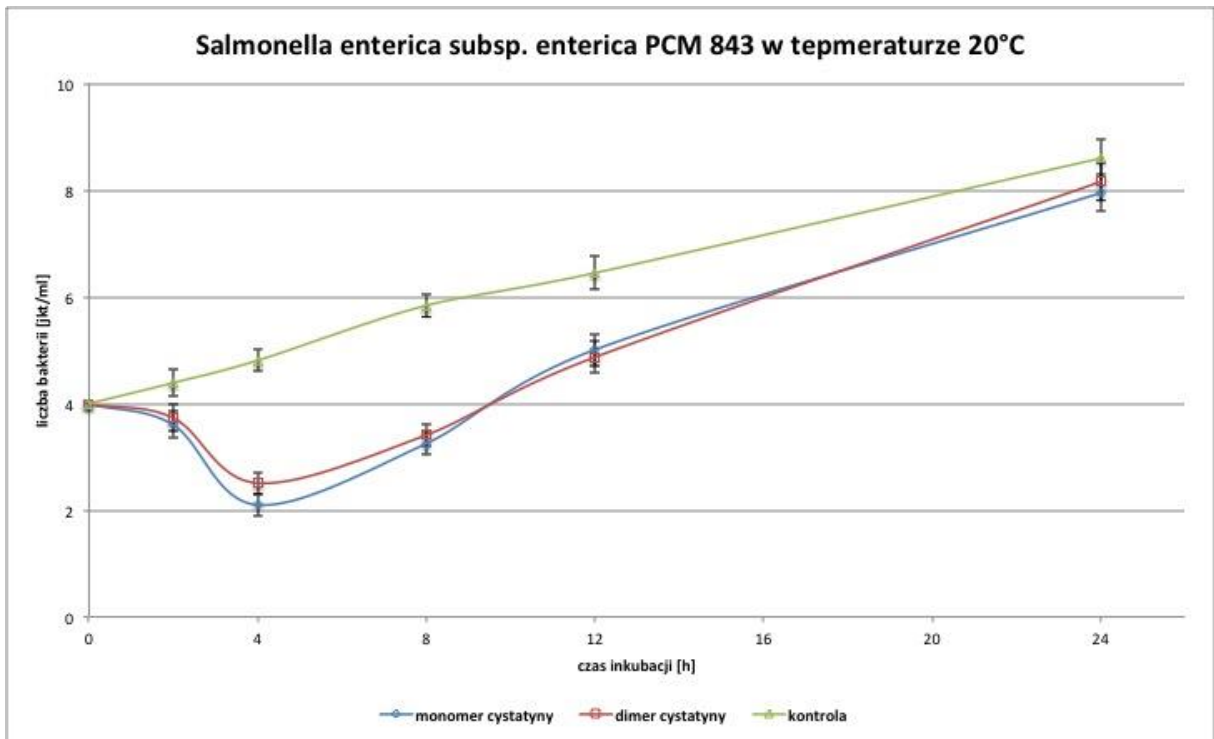
2.4. Salmonella

2.4.1. Salmonella enterica subsp. enterica PCM 843

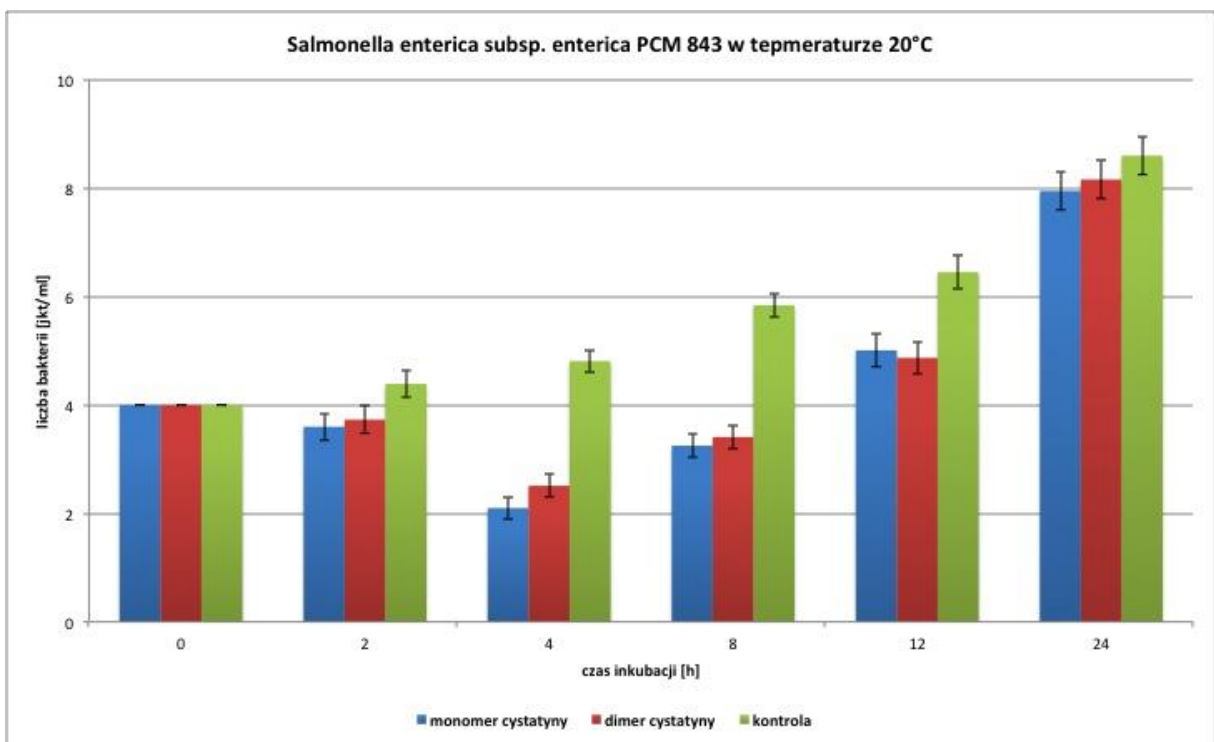
W próbkach z dodatkiem $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ biopreparatu cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej inkubowanych w płynnym podłożu Muellera - Hinton w temperaturze 20°C oraz 37°C , liczba bakterii uległa istotnej redukcji po ok. 4 godzinach inkubacji. Wzrost liczby komórek bakteryjnych powyżej liczby bakterii w godzinie 0 doświadczenia nastąpił po ok. 10 godzinach inkubacji w temperaturze 20°C , oraz po około 8 godzinach w temperaturze 37°C .

W próbkach kontrolnych, bez dodatku biopreparatu cystatyny, inkubowanych w temperaturze 20°C oraz 37°C zaobserwowano intensywny wzrost liczby drobnoustrojów przez cały czas doświadczenia.

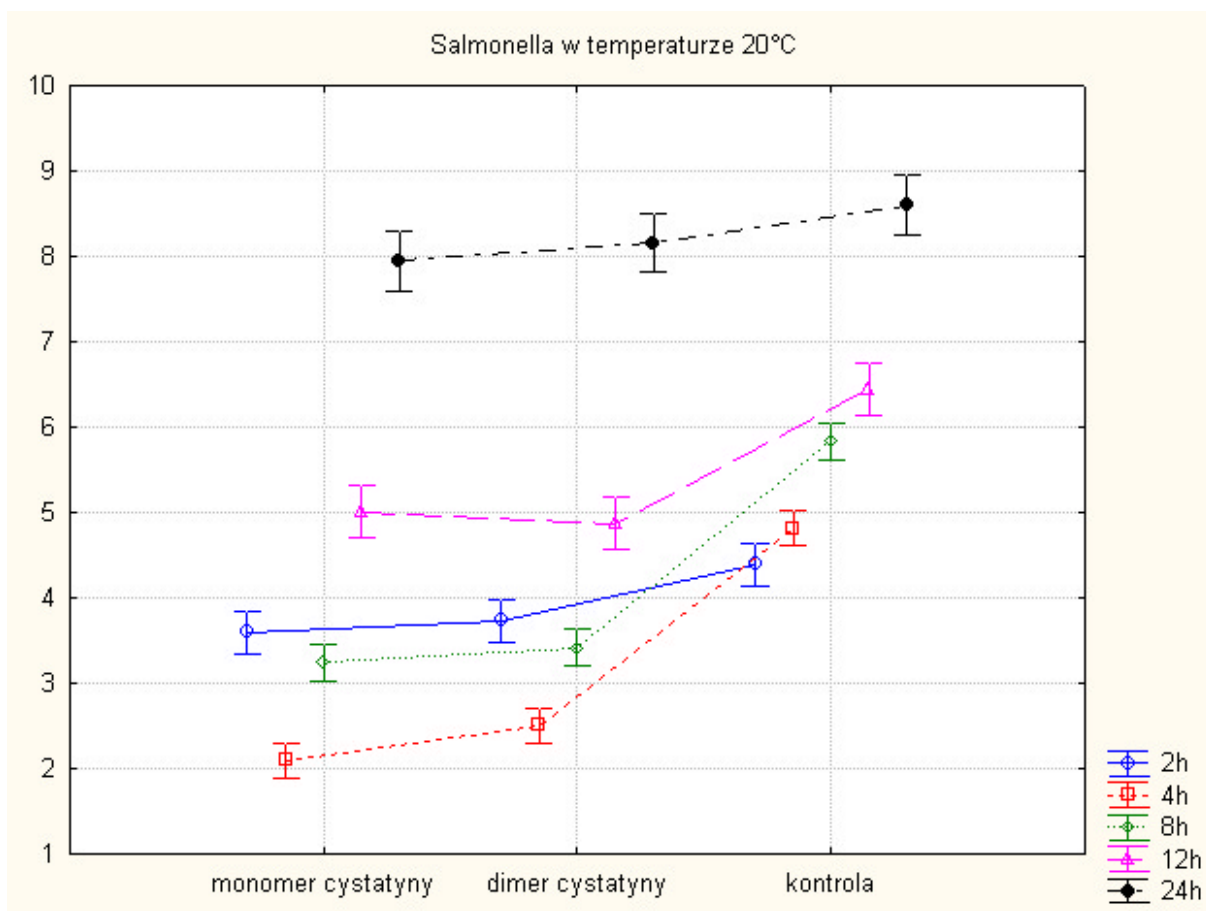
Rycina 17a. Krzywe przeżycia szczepu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



Rycina 17b. Porównanie wzrostu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



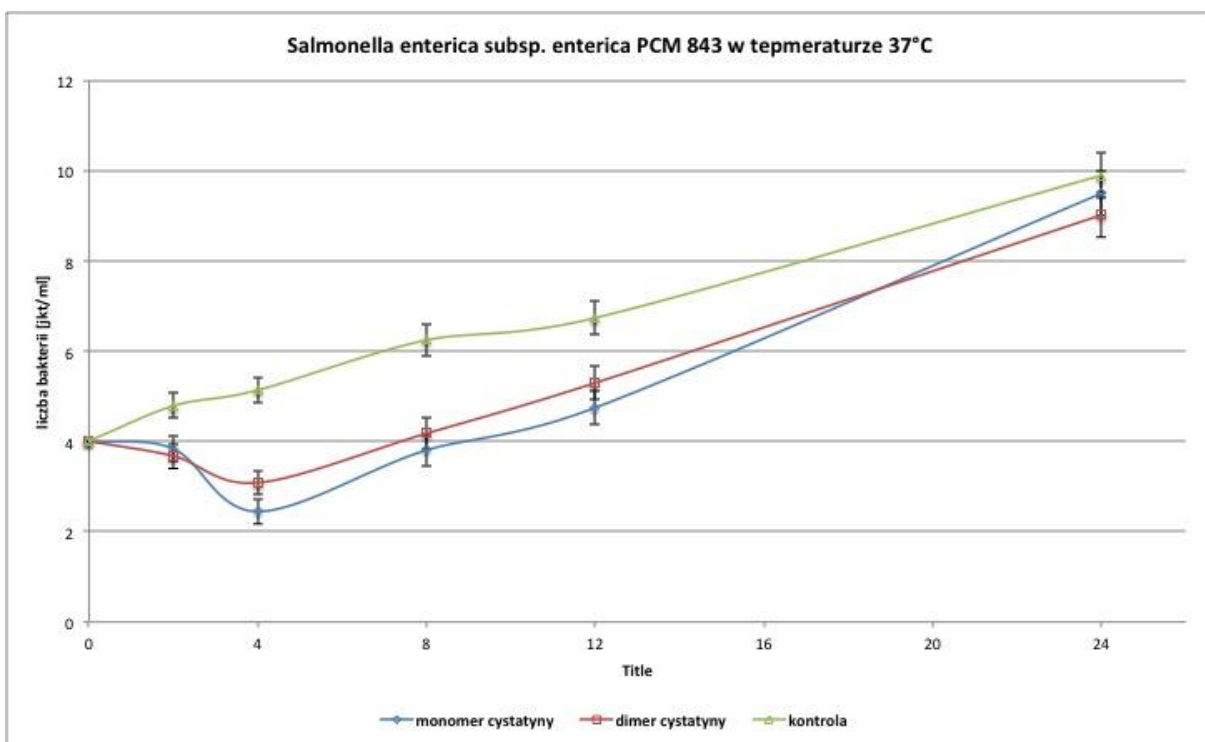
Rycina 17c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.



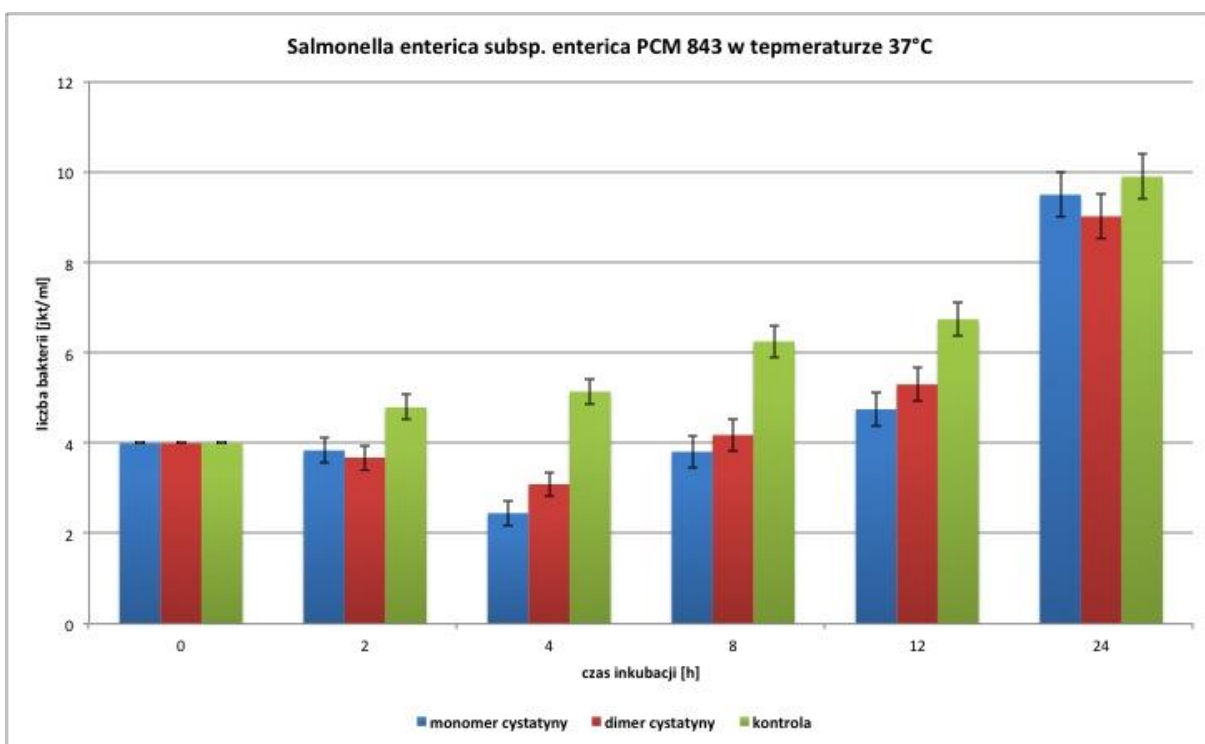
Rycina 17d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 20°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,60	0,29	0,10	3,73	0,38	0,14	4,39	0,27	0,10
4	2,10	0,19	0,07	2,51	0,25	0,09	4,81	0,32	0,12
8	3,25	0,19	0,07	3,41	0,29	0,10	5,84	0,32	0,12
12	5,01	0,47	0,17	4,87	0,35	0,13	6,45	0,31	0,11
24	7,95	0,45	0,17	8,16	0,39	0,14	8,60	0,49	0,18

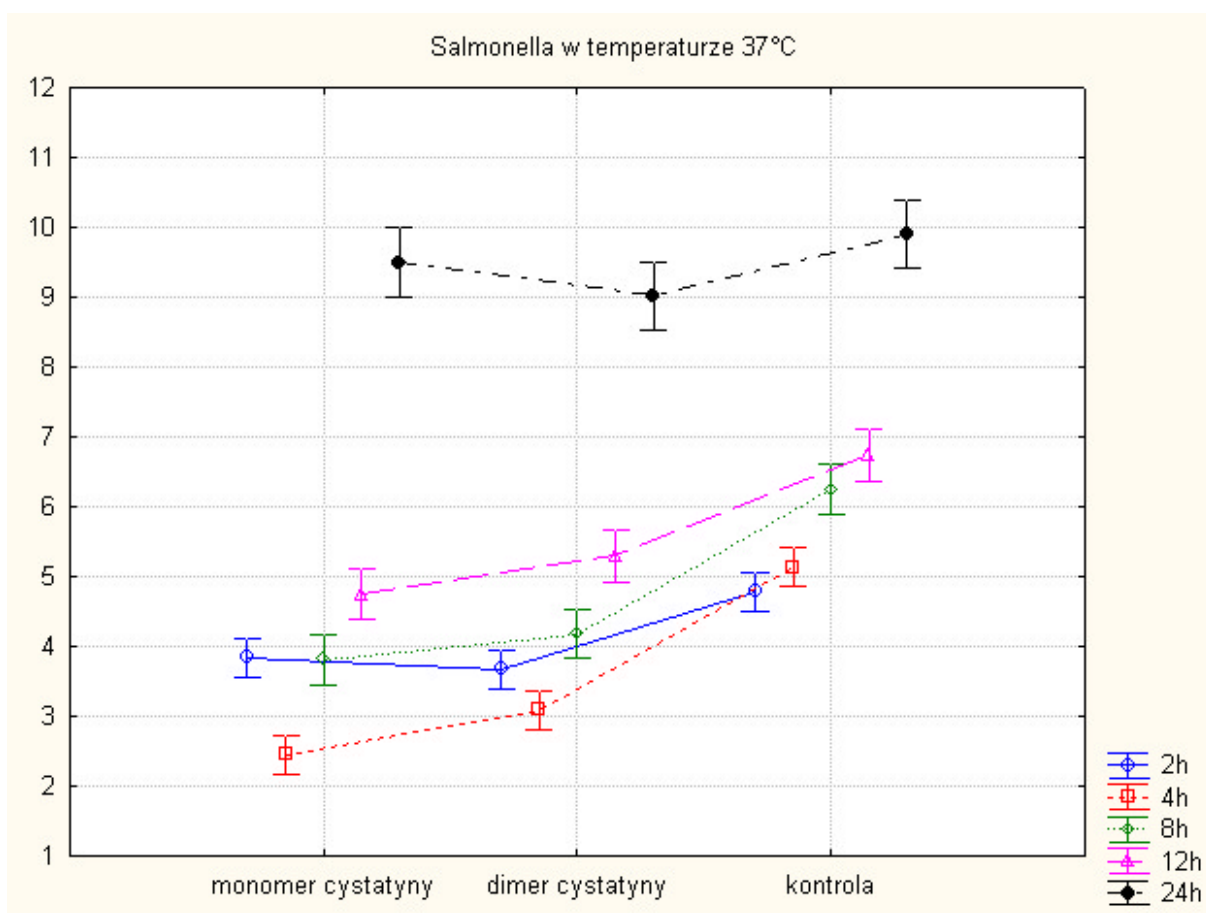
Rycina 18a. Krzywe przeżycia szczepu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 18b. Porównanie wzrostu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 18c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.



Rycina 18d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepu *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny w temperaturze 37°C.

Czas inkubacji (godziny)	Monomer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Dimer cystatyny (log jtk × ml ⁻¹)			Kontrola (log jtk × ml ⁻¹)		
	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE	średnia	SD	SE
2	3,84	0,37	0,13	3,68	0,34	0,12	4,79	0,33	0,12
4	2,45	0,32	0,12	3,09	0,29	0,10	5,14	0,42	0,15
8	3,81	0,41	0,15	4,18	0,52	0,19	6,25	0,39	0,14
12	4,75	0,55	0,20	5,30	0,37	0,13	6,74	0,46	0,17
24	9,50	0,60	0,22	9,02	0,60	0,22	9,90	0,65	0,24

V. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną objęto porównanie zmian liczby komórek bakteryjnych w próbkach z dodatkiem monomeru cystatyny, dimeru cystatyny oraz w próbkach kontrolnych dla 9 szczepów bakterii (*Escherichia coli* ATCC 23811, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843), w dwóch temperaturach (20°C i 37°C), po upływie 2, 4, 8, 12 i 24 godzin (wartości początkowe w godzinie 0 doświadczenia, jako identyczne we wszystkich grupach, nie podlegały analizie statystycznej). Badano średnie dla poszczególnych odczytów między 3 grupami:

- grupa kontrolna – szczepy bakteryjne bez dodatku cystatyny,
- grupa szczepów bakteryjnych w środowisku monomeru cystatyny,
- grupa szczepów bakteryjnych w środowisku dimeru cystatyny.

Do opracowania danych wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) na poziomie istotności 5%. W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej o równych wszystkich średnich w trzech populacjach statystycznych wykorzystano test *post-hoc* Tukeya celem ustalenia, które grupy różnią się od siebie w sposób istotny statystycznie. Obliczeń dokonano przy wykorzystaniu pakietu Statistica 9.1 firmy StatSoft. W opisie wykorzystano oznaczenia M – monomer cystatyny, D – dimer cystatyny, K – grupa kontrolna. Na wszystkich wykresach pionowe słupki oznaczają 95% przedziały ufności dla średnich.

1) *Escherichia coli* ATCC 23811 w temperaturze 20°C (Ryc. 1c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 24h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,008$) i D–K ($p < 0,001$).
- 2) *Escherichia coli* ATCC 23811 w temperaturze 37°C (Ryc. 2c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p = 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,002$) i D–K ($p = 0,003$).
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$).
 - c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$).
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$) i M–D ($p < 0,001$).
 - e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,874$).
- 3) *Escherichia coli* ATCC 8739 w temperaturze 20°C (Ryc. 3c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 24h ($p = 0,005$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,006$) i D–K ($p = 0,025$).
- 4) *Escherichia coli* ATCC 8739 w temperaturze 37°C (Ryc. 4c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p = 0,002$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,800$).
- 5) *Escherichia coli* ATCC 25922 w temperaturze 20°C (Ryc. 5c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,191$).
- 6) *Escherichia coli* ATCC 25922 w temperaturze 37°C (Ryc. 6c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p = 0,003$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,002$) i D–K ($p = 0,039$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,083$).
- 7) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 w temperaturze 20°C (Ryc. 7c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$),
D–K ($p < 0,001$) i M–D ($p = 0,045$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h
($p = 0,076$).
- 8) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 w temperaturze 37°C (Ryc. 8c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),
 - c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),
 - d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),
 - e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h
($p = 0,633$).
- 9) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 w temperaturze 20°C (Ryc. 9c):
- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),
 - b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$)
i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 24h ($p = 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,01$) i D–K ($p = 0,001$).

10) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 w temperaturze 37°C (Ryc. 10c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$) i M–D ($p = 0,004$),
- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,119$).

11) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 w temperaturze 20°C (Ryc. 11c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 24h ($p = 0,007$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,008$) i D–K ($p = 0,033$).

12) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 w temperaturze 37°C (Ryc. 12c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$),
- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$) i M–D ($p = 0,027$),
- e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,123$).

13) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 w temperaturze 20°C (Ryc. 13c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p = 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 24h ($p = 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,001$) i D–K ($p < 0,001$).

14) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 w temperaturze 37°C (Ryc. 14c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$),
- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p = 0,014$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,014$),
- e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,120$).

15) Dla *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 w temperaturze 20°C (Ryc. 15c):

- a) wykazano brak istotnie statystycznych różnic między średnimi po upływie 2h ($p = 0,10930$).
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$).

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$).
- d) wykazano brak istotnie statystycznych różnic między średnimi po upływie 12h ($p = 0,27517$).
- e) wykazano brak istotnie statystycznych różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,11019$).

16) Dla *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 w temperaturze 37°C (Ryc. 16c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p = 0,0012$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,0116$) i D–K ($p = 0,0014$).
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$).
- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$).
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,002$) i D–K ($p = 0,003$).
- e) wykazano brak istotnych statystycznie różnic między średnimi po upływie 24h ($p = 0,43873$).

17) *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 w temperaturze 20°C (Ryc. 17c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p = 0,003$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$). W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$) i M–D ($p = 0,022$),

- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 24h ($p = 0,038$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,033$).

18) *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843 w temperaturze 37°C (Ryc. 18c):

- a) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 2h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- b) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 4h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$), D–K ($p < 0,001$) i M–D ($p = 0,008$),
- c) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 8h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- d) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p < 0,001$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p < 0,001$) i D–K ($p < 0,001$),
- e) wykazano istotne statystycznie różnice między średnimi po upływie 12h ($p = 0,049$).
W ramach testów parami wykazano istotną różnicę między grupami M–K ($p = 0,040$).

VI. DYSKUSJA

1. Minimalne Stężenie Hamujące (MIC)

W dostępnej literaturze wiele jest metod badawczych wykorzystywanych do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji pochodzenia naturalnego. Zasady tych metod opierają się na pomiarach lub obserwacjach zmiany barwy badanych substancji, obecności ewentualnego wzrostu drobnoustrojów, czy obecności wytrącających się związków po dodaniu specyficznych reagentów. Wskutek tak licznych metod i ich modyfikacji nie opracowano do tej pory standardowego testu służącego ocenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji potencjalnie uważanych za naturalne biokonserwanty produktów spożywczych.

Wszystkie techniki wykorzystywane do oceny skuteczności działania przeciwdrobnoustrojowego poszczególnych substancji określane są jako metody testowania wrażliwości przeciwdrobnoustrojowej (AST – antimicrobial susceptibility testing).

W diagnostyce laboratoryjnej, w kontekście oceny skuteczności przeciwdrobnoustrojowej potencjalnych konserwantów żywności, wykorzystuje się najczęściej metody oznaczania minimalnego stężenia hamującego (MIC - Minimal Inhibitory Concentration), minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC – Minimal Bactericidal Concentration), opisywanego w literaturze również jako minimalne stężenie letalne (MLC – Minimal Lethal Concentration). Za minimalne stężenie bakteriobójcze (letalne) przyjmuje się najmniejszą koncentrację środka bójczego, w obecności którego ginie 99,9% drobnoustrojów w określonym czasie i warunkach inkubacji.

Wśród wyżej wymienionych metod oznaczanie minimalnego stężenia hamującego stanowi obecnie najbardziej rozpowszechnioną technikę w ocenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych, naturalnych biosubstancji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Metoda ta jest również wykorzystywana w medycynie ludzkiej, jako test służący ocenie wrażliwości badanych drobnoustrojów na chemioterapeutyki. Metoda oznaczania minimalnego stężenia hamującego wykorzystywana jest również jako test porównawczy wobec niejednoznacznych wyników innych doświadczeń, m.in. testów dyfuzji z krążka, lub jako potwierdzenie bądź wykluczenie oporności drobnoustrojów wobec badanych związków (Andrews, 2001).

W literaturze minimalne stężenie hamujące definiowane jest jako:

- minimalne stężenie powodujące zahamowanie wzrostu lub redukcję liczebności szczepu testowego (Carson i wsp., 1995),
- minimalne stężenie niezbędne do całkowitego zahamowania wzrostu organizmu testowego po 48 godzinach inkubacji (Canillac i Mourey, 2001),
- najniższe stężenie niezbędne do zahamowania makroskopowo widocznego wzrostu szczepu testowego (Delaquis i wsp., 2002),
- najniższe stężenie powodujące istotną (powyżej 90%) redukcję badanego szczepu (Cosentino i wsp., 1999).

W przeprowadzonym doświadczeniu za minimalne stężenie hamujące biopreparatu cystatyny w formach monomerycznej oraz dimerycznej przyjęto najniższe jego stężenie powodujące zahamowanie wzrostu badanych szczepów testowych po 24 godzinach inkubacji w warunkach optymalnych dla rozwoju poszczególnych szczepów testowych.

Zastosowany w badaniach biopreparat cystatyny, zarówno w formie monomerycznej, jak i dimerycznej, okazał się skuteczny wobec większości badanych szczepów drobnoustrojów. Biopreparat cystatyny skutecznie hamował wzrost wszystkich trzech badanych szczepów *Escherichia coli* przy stężeniu $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. Cystatyna w stężeniu $120 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ lub wyższym skutecznie hamowała wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Salmonella enterica subsp. enterica*. Szczepy *Staphylococcus aureus* wykazywały największą oporność na działanie roztworów cystatyny w teście oznaczania minimalnego stężenia hamującego (MIC). Ich wzrost na podłożach agarowych hamowany był przy stężeniu $300 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ cystatyny. Roztwory cystatyny okazały się nieskuteczne wobec bakterii z rodzaju *Proteus sp.* Nawet najwyższe przyjęte w doświadczeniu stężenie cystatyny ($300 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) nie spowodowało zahamowania wzrostu bakterii *Proteus vulgaris* na podłożach agarowych.

Co istotne, nie zaobserwowano różnic w efekcie działania przeciwbakteryjnego monomeru oraz dimeru cystatyny w stosunku do wszystkich szczepów bakteryjnych wykorzystanych w doświadczeniu. Zatem wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) cystatyny w formie monomerycznej oraz dimerycznej wobec badanych szczepów bakteryjnych są identyczne.

W dostępnej literaturze niewiele jest informacji na temat skuteczności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny białka jaja kurzego, a wyniki przeprowadzonych dotychczas badań różnią się między sobą. W związku z tym porównanie uzyskanych wyników badań dotyczących aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny białka jaja kurzego z wynikami innych autorów jest trudne z uwagi na ich niewielką liczbę, a także różnorodność stosowanych metod badawczych, wyboru materiału badawczego i otrzymywanych rezultatów.

Z dostępnych źródeł literaturowych oraz własnych doświadczeń i obserwacji wynika fakt, iż za zmienność otrzymywanych wyników badań nad skutecznością przeciwdrobnoustrojową naturalnych biopreparatów wykorzystywanych w konserwacji żywności odpowiadają czynniki zależne od użytego w badaniach szczepu bakteryjnego, od badanej substancji oraz czynniki związane z wyborem odpowiednich metod badawczych i ich modyfikacji (Brużewicz, 2004).

W ocenie aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych związków pochodzenia naturalnego istotną rolę odgrywa dobór odpowiedniego szczepu testowego. Zgodnie z profilem pracy, do badań wybrano szczepy testowe służące jako drobnoustroje wskaźnikowe w ocenie jakości produktów spożywczych (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) oraz odpowiedzialne za psucie się żywności (*Proteus vulgaris*). Ponadto w badaniach uwzględniono szczep *Salmonella*, bakterii będącej jedną z głównych przyczyn zatruć pokarmowych w Polsce. Wybór szczepów testowych spowodowany był również ich przydatnością w ocenie działania czynników przeciwbakteryjnych. Niektóre z nich standardowo wykorzystuje się w ocenie działania chemioterapeutyków oraz innych naturalnych substancji pochodzenia roślinnego, np. ekstraktu korzenia tarczycy bajkalskiej (Brużewicz, 2004).

Wykorzystane w badaniach szczepy pochodziły z kolekcji ATCC (American Type Culture Collection), uzyskane z PCM – Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (Polska Akademia Nauk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu). Były to następujące szczepy bakteryjne: *Escherichia coli* ATCC 23811, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PCM 843, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 oraz *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

Niektóre z tych bakterii były testowane również w badaniach innych autorów. Węsierska i wsp. (2005), w ocenie aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny białka jaja kurzego stosowali różnorodne szczepy bakteryjne. Były to szczepy *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus xylosum*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Oligella* sp., oraz *Salmonella enterica* Enteritidis.

Inni autorzy wykazali aktywność cystatyny białka wobec drobnoustrojów występujących w jamie ustnej człowieka: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, czy *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Blankenvoorde, 1998; Grenier, 1996). Cystatyna wyizolowana z hemocytów stawonogów wykazała działanie hamujące (IC₅₀) wobec szczepów *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* w stężeniu 80–100 µg × ml⁻¹ (Agarwala i wsp., 1996).

W badaniach własnych, spośród szczepów bakteryjnych testowanych również przez innych autorów, użyto szczepów *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz *Salmonella*.

Na wyniki badań oceny skuteczności przeciwdrobnoustrojowej poszczególnych substancji wpływa również faza wzrostu drobnoustrojów, a w szczególności fakt, w jakiej fazie wzrostu znajdują się drobnoustroje w momencie ekspozycji na poszczególną substancję. Przyjmuje się, że do oceny aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych substancji pochodzenia naturalnego wykorzystuje się drobnoustroje będące w fazie logarytmicznego wzrostu. Takie postępowanie przyjęto również w przeprowadzonych badaniach, w których wykorzystano bakterie pochodzące z 18-godzinnej zsynchronizowanej hodowli. Nawet kilkugodzinna różnica w długości prowadzonej hodowli bakteryjnej może znacząco wpływać na efekty działania badanej substancji wobec drobnoustrojów (Zaleski, 1985).

Kolejnym czynnikiem zależnym od szczepu testowego drobnoustroju i wpływającym na zmienność i różnorodność wyników aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny jest wielkość *inoculum*, która wymieniana jest jako istotna zmienna przy wykonywaniu oznaczeń wrażliwości bakterii. *Inoculum* określa liczbę komórek bakteryjnych, wyrażaną jako liczbę

jednostek tworzących kolonie na mililitr ($\text{jtk} \times \text{ml}^{-1}$) lub $\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$ (*ang.* colony forming unite per millitre). *Inoculum* może być również wyrażone jako zmętnienie lub gęstość optyczna zawiesiny bakteryjnej. W niniejszym doświadczeniu, do wyznaczania minimalnego stężenia hamującego cystatyny liczbę komórek bakteryjnych (*inoculum*) standaryzowano do około $1-2 \times 10^8 \text{ jtk} \times \text{ml}^{-1}$, co odpowiada zawiesinie bakteryjnej o gęstości 0,5 McFarlanda (EUCAST, 2000).

Głównym czynnikiem wpływającym na zmienność otrzymywanych dotychczas wyników badań oceny minimalnego stężenia hamującego cystatyny był również wybór metody badawczej. W przeprowadzonych badaniach za minimalne stężenie hamujące przyjęto najmniejsze stężenie biopreparatu cystatyny hamujące wzrost bakterii. W niniejszym doświadczeniu oznaczanie minimalnego stężenia hamującego przeprowadzono w środowisku stałym, gdzie biopreparat cystatyny rozpuszczono w podłożu agarowym, które ulegało zestaleniu. Celem takiego postępowania było zapewnienie optymalnej dyfuzji biopreparatu z podłoża.

W dostępnej literaturze przeciwdrobnoustrojowa aktywność cystatyny białka jaja określana była za pomocą metody dyfuzji z krążka w agarze (Węsierska i wsp., 2005). W badaniach tych biopreparat cystatyny białka jaja dyfundował z krążka bibułowego na podłożu stałym. Miarą wrażliwości badanych szczepów była wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka nasyconego biopreparatem. Strefy zahamowania wzrostu badanych szczepów testowych uzyskano przy stężeniu 80 $\mu\text{g}/\text{dysk}$ (w przypadku szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 strefa ta wynosiła 11mm, w przypadku szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strefa wynosiła 12mm). Stężenie cystatyny 120 $\mu\text{g}/\text{dysk}$ wobec szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 skutkowało zahamowaniem jego wzrostu w strefie 16mm wokół krążka.

Ocena pomiarów wielkości stref zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków bibułowych nasączonych cystatyną jest trudna wskutek braku możliwości dokładnej interpretacji otrzymanych wyników badań. Ponadto, porównanie tych wyników z wynikami przeprowadzonych badań jest trudne, gdyż wielkość strefy zahamowania wzrostu wokół krążka nasyconego cystatyną nie koreluje z wartością MIC (Hryniewicz i wsp., 2002).

Węsierska i wsp., 2005 w swych badaniach dotyczących określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny, posłużyli się metodą wyznaczania stężenia hamującego rozwój bakterii. Poprzez oznaczenie wartości IC (ang. *Inhibitory Concentration*) cystatyny białka jaja kurzego określono stężenie biopreparatu konieczne do zahamowania wzrostu szczepów bakteryjnych w 50% (IC₅₀) lub 100% (IC₁₀₀). Za pomocą powyższych metod stwierdzono, że cystatyna hamuje wzrost wszystkich badanych szczepów testowych w stężeniach od 75 do 200 µg/ml. Całkowite zahamowanie wzrostu badanych bakterii osiągnięto stosując roztwór cystatyny w stężeniach od 100 do 500 µg/ml, z wyjątkiem szczepu *Citrobacter freundii*, którego zahamowanie wzrostu nastąpiło przy stężeniu cystatyny wynoszącym powyżej 1mg/ml.

Porównanie otrzymanych wyników badań jest trudne z uwagi na zastosowanie odmiennych metod oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny.

Badana substancja to kolejny czynnik mogący wpływać na rezultaty uzyskanych wyników badań. W doświadczeniu wykorzystano roztwory cystatyny białka jaja kurzego w postaci monomerycznej oraz dimerycznej w surowiczej albuminie wołowej (BSA) z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS), o stężeniu 1000 µg/ml. Obecność 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) w roztworach cystatyny zapobiegała zjawisku agregacji cystatyny, które mogłoby powodować nierównomierną dyfuzję biopreparatu z podłoża agarowego, a tym samym wpływać na rezultaty badań. W przywołanych wynikach badań innych autorów brak jest szczegółowych informacji o składzie roztworów cystatyny, bądź biopreparat cystatyny w początkowej postaci występował w formie liofilizatu i charakteryzował się inną aktywnością roztworu macierzystego (Węsierska i wsp., 2005).

Powyższe czynniki mogą zatem być przyczyną różnic w dotychczasowych badaniach oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny białka jaja kurzego.

2. Krzywe przeżycia szczepów testowych

Szczegółową analizę dynamiki wzrostu badanych szczepów testowych wykonano jako uzupełnienie poprzedniego etapu badań dotyczącego wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego cystatyny.

Metodę wyznaczenia krzywych przeżycia drobnoustrojów zastosowano w celu sprawdzenia w jaki sposób dodatek biopreparatów cystatyny białka jaja kurzego wpłynie na rozwój szczepów bakteryjnych podczas ich inkubacji w środowisku płynnym. Badania prowadzono w dwóch temperaturach. Temperatura inkubacji to czynnik istotnie wpływający na wzrost drobnoustrojów. Każdy drobnoustrój posiada optymalny zakres temperatur umożliwiający jego rozwój. Zakres ten określany jest przez tzw. temperatury kardynalne (Molenda, 2010). Temperatura optymalna zawiera się w zakresie ograniczonym temperaturami kardynalnymi dla poszczególnych drobnoustrojów i jest to temperatura, w której czas jednej generacji, czyli czas upływający między kolejnymi podziałami komórek bakteryjnych jest najkrótszy (Zaleski, 1985) W niniejszym doświadczeniu dynamikę wzrostu bakterii badano w dwóch temperaturach 20°C oraz 37°C. Temperatura 20°C odpowiadała warunkom przechowywania produktów spożywczych w temperaturze pokojowej. Temperatura 37°C odpowiadała natomiast optymalnej temperaturze wzrostu badanych szczepów testowych.

Za wyjściową liczbę komórek bakteryjnych, czyli wielkość *inoculum* w godzinie 0 doświadczenia, przyjęto liczbę 10^4 jtk \times ml⁻¹ kierując się faktem, iż zanieczyszczenie poprodukcyjne produktu spożywczego nie przekracza liczby bakterii rzędu $10^2 - 10^3$ jtk \times g⁻¹ (Zaleski, 1985).

Ocena dynamiki wzrostu badanych szczepów bakteryjnych była kolejnym etapem badań dotyczących oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny białka jaja kurzego. Oceny wpływu dodatku biopreparatu cystatyny na wzrost szczepów bakteryjnych dokonano w kontekście wielkości oraz czasu, w jakim utrzymywał się efekt bakteriostatyczny. W przypadku badanych szczepów, w zależności od rodzaju bakterii i temperatury inkubacji, największą redukcję liczby komórek bakteryjnych zaobserwowano po około 4 godzinach inkubacji zarówno w temperaturach 20°C i 37°C. Długość utrzymywania się efektu przeciwbakteryjnego cystatyny wobec badanych szczepów testowych była uzależniona od temperatury inkubacji i wahała się od około 6 do około 12 godzin inkubacji, po którym to

czasie liczba komórek bakteryjnych wzrastała powyżej wyjściowej liczby komórek przyjętej w godzinie 0 doświadczenia (Ryciny 1a-18a). Największą opornością na działanie biopreparatów cystatyny charakteryzowały się szczepy *Staphylococcus aureus*, gdzie poziom redukcji liczby bakterii był najniższy, a czas utrzymywania się efektu przeciwbakteryjnego najkrótszy. W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano różnic w efekcie działania cystatyny w formie monomerycznej i dimerycznej wobec wszystkich szczepów bakteryjnych.

Udowodniona w powyższych badaniach aktywność przeciwdrobnoustrojowa cystatyny białka jaja kurzego skłania do oceny możliwości jej zastosowania jako naturalnego czynnika przeciwbakteryjnego w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt, a także jako biokonserwantu w przemyśle spożywczym. Roztwór cystatyny, zarówno w postaci monomerycznej, jak i dimerycznej, redukował liczbę drobnoustrojów podczas ich inkubacji. Skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowego biopreparatu została określona w różnych warunkach termicznych inkubacji, zarówno w temperaturze optymalnego wzrostu drobnoustrojów, jak i w niższej temperaturze 20°C. Pomimo, że cystatyna jest białkiem termostabilnym, uzyskane wyniki badań wydają się być istotne w aspekcie przechowywania produktów spożywczych w warunkach temperatury pokojowej.

Istotą oceny danej substancji w aspekcie wykorzystania jej jako konserwantu jest wpływ na stan zdrowia konsumenta. Dostępna literatura nie wskazuje na jakiegokolwiek szkodliwe oddziaływanie cystatyny na organizm zdrowego człowieka, w tym oddziaływanie toksyczne. Co więcej, cystatynie białka jaja kurzego przypisuje się wiele przedstawionych wcześniej oddziaływań prozdrowotnych.

Bezspornie, czynnikiem limitującym zastosowanie biopreparatu cystatyny jako biokonserwantu w utrwalaniu żywności jest czas trwania efektu przeciwbakteryjnego, który słabnie w trakcie inkubacji szczepów bakteryjnych. Wydaje się więc, że zastosowanie cystatyny białka jaja kurzego jako czynnika przeciwbakteryjnego jest ograniczone.

Na podstawie doniesień literaturowych przypuszcza się jednak, że istnieje możliwość wydłużenia efektu przeciwdrobnoustrojowego poprzez połączone działanie naturalnych substancji z innymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi. Podjęto próby synergistycznego działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego z bakteriocynami, dwutlenkiem węgla lub promieniowaniem jonizującym (Malinowska-Pańczyk i Kołodziejska, 2007).

Przykładem związku, który może współdziałać z innymi czynnikami w zakresie aktywności przeciw drobnoustrojom, jest lizozym białka jaja kurzego. Lizozym został zastosowany jako czynnik przeciwbakteryjny wspólnie z innymi związkami pochodzenia naturalnego, m.in. z niziną. Wykazano, że możliwe jest skojarzone zastosowanie lizozymu z wysokim ciśnieniem, podwyższoną temperaturą, co skutkuje zwiększoną ich aktywnością wobec bakterii Gram-ujemnych (Nakimbugwe i wsp., 2006). Fakty te skłaniają do podjęcia próby zastosowania cystatyny białka jaja kurzego wspólnie z innymi związkami pochodzenia naturalnego o właściwościach przeciwbakteryjnych lub z czynnikami środowiskowymi sprzyjającymi redukcji drobnoustrojów. Działanie takie zostało podjęte poprzez zastosowanie skojarzonego działania cystatyny białka jaja kurzego z siarczanem miedzi, co stanowi przedmiot zgłoszenia patentowego, którego jestem współautorem (Malicki i wsp., 2013).

Niewątpliwą korzyścią przemawiającą za możliwością synergistycznego oddziaływania cystatyny z wymienionymi powyżej czynnikami jest obniżenie kosztów procesu poprzez wykorzystywanie mniejszych ilości aktywnych substancji, a także osiągnięcie dłuższego efektu hamowania wzrostu drobnoustrojów w porównaniu z efektem działania pojedynczych substancji.

Dzięki właściwościom przeciwdrobnoustrojowym, biopreparat cystatyny białka jaja kurzego wydaje się spełniać kryteria naturalnego biokonserwantu. Przedstawione wyniki badań laboratoryjnych wymagają kontynuacji. Kolejnym etapem w kwestii zastosowania biopreparatu cystatyny na skalę szerszą niż laboratoryjna powinny być badania nad wpływem biokonserwantu na stan mikrobiologiczny gotowych produktów spożywczych podczas ich przechowywania. Uzyskane wyniki badań sugerują również ich kontynuację dla oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny w działaniu synergistycznym z innymi naturalnymi substancjami. Ponadto istotne wydaje się sprawdzenie czy i w jaki sposób biopreparat cystatyny wpływa na właściwości organoleptyczne produktów poddawanych jego działaniu.

Dobrze rozwinięty i zorganizowany system hodowli kur, powszechność surowca jajczarskiego oraz stosunkowo niska jego cena, sprawiły, że jaja kurze stały się przedmiotem zainteresowania badaczy w aspekcie pozyskiwania związków biologicznie aktywnych.

Udowodniona w powyższych badaniach aktywność przeciwbakteryjna cystatyny poszerza dotychczasową wiedzę na temat właściwości przeciwdrobnoustrojowych bioaktywnych substancji pochodzących z jaj kurzych. Fakt ten sprawia, że surowiec jajczarski może stać się doskonałym materiałem wykorzystywanym m.in. w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Szansę na wykorzystanie właściwości przeciwbakteryjnych cystatyny na skalę większą niż laboratoryjna stworzyło opracowanie nowatorskich programów hodowli i żywienia kur nieśnych. Możliwe jest to m.in. dzięki zastosowaniu nowej generacji dodatków paszowych dla kur. Pozwala to na poznanie i modyfikację składu chemicznego jaj, a tym samym pozyskiwanie pożądaných substancji w większych niż dotychczas ilościach. Postępowanie takie pozwala na określanie kur nieśnych objętych specjalistycznymi programami żywienia i immunizacji mianem żywych bioreaktorów wytwarzających biofarmaceutyki (Sosnowska i wsp., 2011).

Dzięki uzyskanym wynikom badań jaja kurze jawią się nie tylko jako produkty spożywcze o wysokiej wartości odżywczej i kulinarnej, ale także jako surowiec wykorzystywany do produkcji preparatów o licznych właściwościach biologicznych, w tym przeciwbakteryjnych.

VII. WNIOSKI

W oparciu o uzyskane wyniki badań sformułowano następujące wnioski:

1. Cystatyna białka jaja kurzego, zarówno w formie monomerycznej, jak również w formie dimerycznej, wykazywała aktywność przeciwbakteryjną wobec większości badanych szczepów testowych.
2. Efekty działania przeciwbakteryjnego cystatyny w formie monomerycznej oraz w formie dimerycznej są podobne i nie różnią się statystycznie między sobą.
3. Skuteczność przeciwbakteryjna cystatyny białka jaja kurzego w formie monomerycznej oraz w formie dimerycznej w stosunku do badanych szczepów bakteryjnych jest zmienna i zależy od rodzaju szczepu testowego, temperatury oraz czasu inkubacji.
4. Cystatyna białka jaja kurzego w formie monomerycznej oraz dimerycznej działa skutecznie przez pierwsze 6-12 godzin. W celu przedłużenia jej działania korzystne byłoby zastosowanie związków o działaniu synergistycznym z cystatyną lub ponowne jej dodanie.
5. Cystatyna w formie monomerycznej oraz dimerycznej, dzięki potwierdzonym w badaniach właściwościom przeciwbakteryjnym, może znaleźć zastosowanie jako naturalna substancja antybakteryjna w leczeniu ludzi i zwierząt oraz jako biokonserwant w żywności.

VIII. STRESZCZENIE

Badania nad poszukiwaniem naturalnych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym stanowią aktualny kierunek zainteresowania badaczy w przemyśle spożywczym, mikrobiologii żywności i ochronie zdrowia konsumenta. Związane jest to ze wzrastającymi wymaganiami konsumentów i producentów żywności, co do trwałości i jakości produktów spożywczych, oraz rosnącą niechęcią konsumentów do tradycyjnych środków konserwujących. Produkty spożywcze poddane procesom utrwalania poprzez substancje pochodzenia naturalnego postrzegane są przez konsumentów jako bezpieczne, w porównaniu z produktami utrwalanymi za pomocą metod tradycyjnych.

Jaja kurze zawierają szereg substancji o działaniu biologicznym, w tym o działaniu bakteriobójczym lub bakteriostatycznym. Wydaje się, że cystatyna białka jaja kurzego może wykazywać właściwości przeciwbakteryjne i spełniać kryteria biologicznego konserwantu żywności.

Wydaje się, że główną funkcją inhibitorów enzymów proteolitycznych, do których należy cystatyna białka jaj kurzego, jest regulacja podstawowych reakcji biologicznych związanych z proteolizą. Niektóre z inhibitorów lub produktów ich proteolizy wykazują szereg innych właściwości biologicznych, m.in. są czynnikami wzrostu, wykazują działanie przeciwnowotworowe, blokują kanały wapniowe, przejawiają działanie foto- i radioprotekcyjne. Stwarza to możliwość wykorzystania inhibitorów enzymów proteolitycznych w profilaktyce, terapii i regulacji wielu procesów biologicznych niezwiązanych z proteolizą.

Dostępna literatura omawia liczne właściwości cystatyny białka jaja kurzego. Białko to wykazuje szereg efektów leczniczych i wykorzystywane jest w profilaktyce i terapii wielu schorzeń (Turk i wsp., 2008).

Doniesienia na temat aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny białka jaja kurzego wobec drobnoustrojów odpowiedzialnych za psucie się żywności są nieliczne oraz nie do końca spójne. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na realną możliwość zastosowania cystatyny jako naturalnej substancji konserwującej żywność.

Podejmowano próby oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej cystatyny białka jaja kurzego wobec drobnoustrojów występujących w żywności, jednak rezultaty tych badań nie są jednoznaczne.

W związku z tym, w niniejszej pracy podjęto próbę laboratoryjnej oceny skuteczności przeciwbakteryjnej cystatyny wobec wybranych szczepów testowych związanych z problematyką bezpieczeństwa żywności.

Przeprowadzone badania składały się z etapów polegających na określeniu minimalnego stężenia hamującego (MIC) biopreparatów cystatyny oraz na wyznaczeniu krzywych przeżycia badanych szczepów testowych w środowisku płynnym z dodatkiem biopreparatów cystatyny.

W badaniach wykorzystano następujące roztwory macierzyste cystatyny białka jaja kurzego: 1) roztwór macierzysty cystatyny białka jaja kurzego w formie monomerycznej o stężeniu 1000 µg/ml z dodatkiem 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) oraz z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS), 2) roztwór macierzysty cystatyny białka jaja kurzego w formie dimerycznej o stężeniu 1000 µg/ml z dodatkiem 5% surowiczej albuminy wołowej (BSA) oraz z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS).

W eksperymencie wykorzystano szczepy testowe: *Escherichia coli* ATCC 23811, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, oraz *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

Do oznaczenia minimalnego stężenia hamującego cystatyny białka jaja kurzego wykorzystano metodę rozcieńczeń biopreparatu w agarze. Minimalne stężenie hamujące określano na podłożu Muellera – Hinton, które przygotowano tak, aby w 1 ml tego podłoża stężenie biopreparatów cystatyny wynosiło odpowiednio 80 µg, 100 µg, 120 µg, 150 µg oraz 300 µg. Za minimalne stężenie hamujące (MIC) przyjęto najmniejsze stężenie biopreparatu cystatyny hamujące wzrost bakterii na płytkach Petriego.

Krzywe przeżycia badanych szczepów testowych w środowisku biopreparatów cystatyny wyznaczono poprzez inkubację zawiesiny komórek bakteryjnych (w liczbie ok. 10^4 jtk/ml) w płynnym podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem roztworu macierzystego cystatyny (stężenie 1000 µg/ml).

Warunki eksperymentalne ustalono zamierzając wykazać czy i w jaki sposób dodatek biopreparatów cystatyny białka jaja kurzego wpłynie na rozwój szczepów bakteryjnych podczas ich inkubacji w środowisku płynnym. Próbkę inkubowano w temperaturach 20°C oraz 37°C wykonując jednocześnie oznaczenia liczby bakterii podczas inkubacji. Oznaczenia liczby bakterii wykonywano w czasie 0 – bezpośrednio po ich wprowadzeniu do roztworu oraz po 2, 4, 8, 12 i 24 godzinach przechowywania w każdej z wymienionych temperatur. Oznaczenia liczby bakterii wykonywano poprzez odzyskiwanie ich na podłożach wybiórczych, właściwych dla danego szczepu bakteryjnego. Do oznaczeń tych wykorzystano metodę płytkową NPL (Burbianka i wsp., 1983). Badania wykonano w 7 powtórzeniach dla każdego szczepu testowego.

Przeprowadzone badania pozwoliły na oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) biopreparatu cystatyny. Zastosowany w badaniach biopreparat cystatyny okazał się skuteczny wobec wszystkich badanych szczepów drobnoustrojów, z wyjątkiem bakterii z rodzaju *Proteus*. Jednakże porównanie uzyskanych wyników oznaczania minimalnego stężenia hamującego cystatyny z wynikami innych autorów jest trudne, z uwagi na niewielką ilość badań oraz zróżnicowanie stosowanych metod i materiałów badawczych.

W założeniu, przeprowadzone w niniejszej pracy badania oznaczania minimalnego stężenia hamującego cystatyny miały również na celu weryfikację dotychczasowych wyników badań w tym zakresie oraz podjęcie próby standaryzacji doboru metod badawczych w ocenie aktywności przeciwbakteryjnej cystatyny białka jaja kurzego.

Podczas wyznaczania krzywych przeżycia drobnoustrojów w środowisku biopreparatów, stwierdzono istotne różnice we wrażliwości poszczególnych szczepów testowych na dodatek cystatyny, w porównaniu z próbkami kontrolnymi pozbawionymi dodatku biopreparatu. Dodatek biopreparatu cystatyny skutecznie ograniczał wzrost badanych szczepów bakteryjnych, głównie w pierwszych 8 - 12 godzinach, zależnie od zastosowanej temperatury i rodzaju szczepu testowego. Po tym czasie efekt zahamowania wzrostu bakterii zmniejszał się, a ich liczba wzrastała powyżej poziomu wyjściowego przyjętego w godzinie 0 doświadczenia.

Udowodniona w powyższych badaniach aktywność przeciwbakteryjna cystatyny poszerza dotychczasową wiedzę na temat właściwości przeciwdrobnoustrojowych bioaktywnych substancji pochodzących z jaj kurzych.

Dzięki uzyskanym wynikom badań jaja kurze jawią się nie tylko jako produkty spożywcze o wysokiej wartości odżywczej i kulinarnej, ale także jako surowiec wykorzystywany do produkcji preparatów o właściwościach biomedycznych, w tym przeciwbakteryjnych.

W oparciu o uzyskane wyniki badań sformułowano następujące wnioski:

1. Cystatyna białka jaja kurzego, zarówno w formie monomerycznej, jak również w formie dimerycznej, wykazywała aktywność przeciwbakteryjną wobec większości badanych szczepów testowych.
2. Efekty działania przeciwbakteryjnego cystatyny w formie monomerycznej oraz w formie dimerycznej są podobne i nie różnią się statystycznie między sobą.
3. Skuteczność przeciwbakteryjna cystatyny białka jaja kurzego w formie monomerycznej oraz w formie dimerycznej w stosunku do badanych szczepów bakteryjnych jest zmienna i zależy od rodzaju szczepu testowego, temperatury oraz czasu inkubacji.
4. Cystatyna białka jaja kurzego w formie monomerycznej oraz dimerycznej działa skutecznie przez pierwsze 6-12 godzin. W celu przedłużenia jej działania korzystne byłoby zastosowanie związków o działaniu synergistycznym z cystatyną lub ponowne jej dodanie.
5. Cystatyna w formie monomerycznej oraz dimerycznej, dzięki potwierdzonym w badaniach właściwościom przeciwbakteryjnym, może znaleźć zastosowanie jako naturalna substancja antybakteryjna w leczeniu ludzi i zwierząt oraz jako biokonserwant w żywności.

IX. SUMMARY

Studies on the exploration of natural substances with antimicrobial activity are the current direction of the interest of the researchers in the food industry, food microbiology and the consumer health care. This is due to the increasing requirements of consumers and food producers as to the durability and quality of food products after production, and the growing reluctance of consumers to traditional preservatives. Food products fixed with substances of natural origin are perceived by consumers as safe, as compared to the products treated with traditional methods. Chicken eggs contain a number of substances having biological activity, including a bactericidal or bacteriostatic. It seems that the egg white cystatin can exhibit antimicrobial properties and meet the criteria of biological preservative in food. It seems that the main function of the inhibitors of proteolytic enzymes, which include the chicken egg white cystatin, is a basic control of biological reactions with proteolysis. Some of the inhibitors or products of their proteolysis demonstrate biological properties, such as growth factors, antitumor effect, blocking the calcium channel activity and show photo- and radioprotective activity. This creates the possibility of using inhibitors of proteolytic enzymes in the prevention, therapy and the regulation of many biological processes not associated with proteolysis. The literature shows many characteristics of egg white cystatin. This protein has a number of therapeutic effects and is used in the prevention and treatment of many diseases. Reports on the antimicrobial activity of chicken egg white cystatin against microorganisms responsible for food spoilage are few and inconsistent. Previous studies point to the real possibility of application of cystatin as a natural food preservative. There were made attempts to assess the antimicrobial activity of egg white cystatin against pathogens in the food, but the results of these studies are not conclusive. Therefore, in the present study there were made attempts of evaluation of the antimicrobial efficacy of cystatin against selected strains associated with food industry. The purpose of the study was also assistance in evaluation of the possible usage of cystatin as a natural preservative in the food industry. The studies aimed to determine also the minimal inhibitory concentration (MIC) of chicken egg white cystatin and also to determine the survival curves of the bacterial strains in liquid medium with the addition of cystatin.

The study used the following solutions of chicken egg white cystatin: 1) the solution of chicken egg white cystatin in monomeric form in 5% solution of bovine serum albumin (BSA) supplemented buffered saline (PBS), with a concentration of 1000 µg/ml; 2) the solution of chicken egg white cystatin in dimeric form in 5% solution of bovine serum albumin (BSA) supplemented buffered saline (PBS) at a concentration of 1000 µg/ml. In the experiment the following bacterial strains were used: *Escherichia coli* ATCC 23811, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica subsp. enterica* PCM 843, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, and *Proteus vulgaris* ATCC 13315. To determine the minimal inhibitory concentration of the chicken egg white cystatin the agar dilution method was used. The minimal inhibitory concentration was determined on the Mueller - Hinton medium which was prepared in the way the concentration of cystatin in 1 ml of this medium was respectively 80 mg, 100 mg, 120 mg, 150 mg and 300 mg. The lowest concentration of cystatin which inhibited the growth of bacteria in Petri dishes was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC). The survival curves of test strains in the environment of the cystatin were determined by incubation of the bacterial cell suspension (approximately 10^4 jtk/ml) in liquid Mueller-Hinton medium supplemented with cystatin (concentration 1000 µg/ml). The major objective was to determine how the addition of chicken egg white cystatin affects the development of bacterial strains during incubation in liquid media. Samples were incubated at temperatures of 20°C and 37°C. Determination of the number of bacteria was carried out at time 0 - immediately after their introduction into the solution and after 2, 4, 8, 12 and 24 hours of storage at each of these temperatures. Determination of the number of bacteria was performed by their recovery on selective media, suitable for each strain. The indications were made with MPN method (most probable number), (Burbianka et al., 1983). Labelling was performed in 7 replications for each test organism.

The research have determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of chicken cystatin. Cystatin used in the study was effective against all tested strains of microorganisms, except bacteria of the *Proteus* sp. This may be caused by the ability of the

bacteria of the *Proteus* sp. to a characteristic movement and colony growth and the consequence the difficulty of assessing bacterial growth on the agar medium.

However, comparison the results obtained for determining the minimal inhibitory concentration of cystatin with the results of other authors is difficult because of the insignificant number of the research in this field and the diversity of methods and materials used. Research carried out in this paper was to verify the previous results in this area and to try to standardize the selection of research methods in the evaluation of the antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. While determining the survival curves of microorganisms, there were significant differences in the sensitivity of individual test strains in the environment of cystatin, compared to control samples without the additive of cystatin. Addition of cystatin effectively inhibited the growth of bacterial strains, especially in the first 8 - 12 hours, depending on the temperature used and the type of the bacteria.

After this time, the effect of inhibition of bacterial growth was reduced and their number increased above baseline at 0 time adopted in the experiment. These studies demonstrate the antibacterial activity of chicken egg white cystatin. The results extend the existing knowledge about the antimicrobial properties of bioactive substances isolated from chicken eggs. With the obtained results, eggs not only appear as a food of high nutritional value, but also as material for the manufacture of substances for biomedical applications, including antibacterial agents.

Based on the results, the following conclusions were obtained:

1. Chicken egg white cystatin both in monomeric as well as dimeric form demonstrates the antibacterial activity against most of the tested bacterial strains.
2. The effects of the antibacterial activity of chicken egg white cystatin in the monomeric and dimeric form are similar and not statistically different among themselves.
3. The antimicrobial activity of chicken egg white cystatin in the monomeric and dimeric form is variable and depends on the type of the bacterial strain, temperature and time of incubation.
4. Chicken egg white cystatin in the monomeric and dimeric form is effective for the first 6-12 hours. In order to prolong its activity would be beneficial to add other substances with the synergistic effect with cystatin or re-adding cystatin only.
5. Chicken egg white cystatin in the monomeric and dimeric form can be used as a natural antibacterial substance in the treatment of humans and animals and as a food preservative.

X. DOKUMENTACJA PRACY

1. Spis tabel

Tabela 1. Podłoża mikrobiologiczne wykorzystane w badaniach	24
Tabele 2-12. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) cystatyny w formie monomercznej w surowiczej albuminie wołowej (BSA) z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS) dla następujących szczepów testowych:	
Tabela 2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811	28
Tabela 3. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	28
Tabela 4. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	29
Tabela 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	29
Tabela 6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	30
Tabela 7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	30
Tabela 8. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	30
Tabela 9. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	31
Tabela 10. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843	31
Tabela 11. <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	31
Tabela 12. <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	32
Tabele 13-23. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) cystatyny w formie dimerznej w surowiczej albuminie wołowej (BSA) z dodatkiem zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS) dla następujących szczepów testowych:	
Tabela 13. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811	32
Tabela 14. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	33
Tabela 15. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33
Tabela 16. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	34
Tabela 17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	34
Tabela 18. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	34
Tabela 19. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	35

Tabela 20. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	35
Tabela 21. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843	35
Tabela 22. <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	36
Tabela 23. <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	36

2. Spis rycin

Ryciny 1a-18a. Krzywe przeżycia szczepów testowych na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny:

Rycina 1a. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 20°C	38
Rycina 2a. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 37°C	40
Rycina 3a. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 20°C	42
Rycina 4a. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 37°C	45
Rycina 5a. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 20°C	48
Rycina 6a. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 37°C	50
Rycina 7a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 20°C	52
Rycina 8a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 37°C	55
Rycina 9a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 20°C	58
Rycina 10a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 37°C	60
Rycina 11a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 20°C	62
Rycina 12a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 37°C	65
Rycina 13a. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 20°C	67
Rycina 14a. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 37°C	70
Rycina 15a. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 20°C	72
Rycina 16a. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 37°C	75
Rycina 17a. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 20°C	78
Rycina 18a. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 37°C	80

Ryciny 1b-18b. Porównanie wzrostu szczepów testowych na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny:

Rycina 1b. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 20°C	38
Rycina 2b. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 37°C	40
Rycina 3b. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 20°C	43
Rycina 4b. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 37°C	45
Rycina 5b. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 20°C	48
Rycina 6b. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 37°C	50
Rycina 7b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 20°C	53
Rycina 8b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 37°C	55
Rycina 9b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 20°C	58
Rycina 10b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 37°C	60
Rycina 11b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 20°C	63
Rycina 12b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 37°C	65
Rycina 13b. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 20°C	68
Rycina 14b. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 37°C	70
Rycina 15b. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 20°C	73
Rycina 16b. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 37°C	75
Rycina 17b. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 20°C	78
Rycina 18b. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 37°C	80

Ryciny 1c-18c. Porównanie średnich ilości bakterii szczepów testowych na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny:

Rycina 1c. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 20°C	39
Rycina 2c. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 37°C	41
Rycina 3c. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 20°C	44
Rycina 4c. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 37°C	46
Rycina 5c. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 20°C	49

Rycina 6c. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 37°C	51
Rycina 7c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 20°C	54
Rycina 8c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 37°C	56
Rycina 9c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 20°C	59
Rycina 10c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 37°C	61
Rycina 11c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 20°C	64
Rycina 12c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 37°C	66
Rycina 13c. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 20°C	69
Rycina 14c. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 37°C	71
Rycina 15c. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 20°C	74
Rycina 16c. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 37°C	76
Rycina 17c. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 20°C	79
Rycina 18c. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 37°C	81

Ryciny 1d-18d. Liczebność [średnia, odchylenie standardowe (SD) i błąd standardowy (SE)] szczepów testowych na podłożu Muellera - Hinton z dodatkiem 100 µg monomeru oraz dimeru cystatyny:

Rycina 1d. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 20°C	39
Rycina 2d. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23811, temperatura 37°C	41
Rycina 3d. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 20°C	44
Rycina 4d. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, temperatura 37°C	46
Rycina 5d. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 20°C	49
Rycina 6d. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, temperatura 37°C	51
Rycina 7d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 20°C	54
Rycina 8d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, temperatura 37°C	56
Rycina 9d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 20°C	59
Rycina 10d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, temperatura 37°C	61
Rycina 11d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 20°C	64

Rycina 12d. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, temperatura 37°C	66
Rycina 13d. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 20°C	69
Rycina 14d. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, temperatura 37°C	71
Rycina 15d. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 20°C	74
Rycina 16d. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, temperatura 37°C	76
Rycina 17d. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 20°C	79
Rycina 18d. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> PCM 843, temperatura 37°C	81

XI. BIBLIOGRAFIA

1. ABDALLAH F.B., CHAHINE J.M. (1999): Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 263, 912 – 920.
2. AGARWALA K.L., KAWABATA S., HIRATA M., MIYAGI M., TSUNASAWA S., IWANAGA S. (1996): A cysteine protease inhibitor stored in the large granules of horseshoe crab hemocytes: purification, characterization, cDNA cloning and tissue localization. *J. Biochem.* 119, 85–94.
3. ANASTASI A., BROWN M.A., KEMBHAVI A.A., NICKLIN M.J.H., SAYERS C.A., SUNTER D.C., BARRETT A.J. (1983): Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem. J.* 211, 129-138.
4. ANDREWS J.M. (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 1, 5-16.
5. ARAI S., KURODA M., MATSUMOTO I., WATANABE H., ABE K. (1995): Molecular cloning of cereal cystatins and evaluation of their antiviral and antipest effects. *Genetically Modified Foods*, 11, 124–133.
6. BABAY Z., AL-WAKEEL J., ADDAR M., MITTWALLI A., TARIF N., HAMMAD D., ALI N., AL-ASKAR A., CHOUDHARY A.R. (2005): Serum cystatin C in pregnant women: reference values, reliable and superior diagnostic accuracy. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 32, 3, 175-179.
7. BLANKENVOORDE M.F.J., HENSKENS Y.M.C., VAN'T HOF W., VEERMAN E.C.I., AMERONGEN, N.A.V. (1996): Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biological Chemistry*, 377, 12, 847-850.
8. BLANKENVOORDE M.F.J., VAN'T HOF W., WALGREEN-WETERINGS E., VAN STEENBERGEN M.T.J., BRAND H.S., VEERMAN E.C.I., AMERONGEN, N.A.V. (1998): Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biological Chemistry*, 11, 1371-1375.

9. BODE W., ENGH R., MUSIL D., THIELE U., HUBER R., KARSHIKOVL A., BRZIN J., KOS J., TURK V. (1988): The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* vol.7, 8, 2593–2599.
10. BODNAR L., WCISŁO G. B., ŻELICHOWSKI G., RAĆZKA A., WAŃKOWICZ Z., SZCZYLIK C. (2008): Cystatyna C jako wskaźnik filtracji kłębuszkowej nerek u kobiet chorych na raka jajnika. *Pol. Merk. Lek.*, XXIV, 142, 307-311.
11. BRAND H.S., LERNER U.H., GRUBB A., BEERTSEN W., AMERONGEN A.V.N., EVERTS V. (2004): Family 2 cystatins inhibit osteoclast - mediated bone resorption in calvarial boneexplants . *Bone (NY)* 35 (3), 689-696.
12. BRUŻEWICZ SZ. (2004) Ocena aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktu tarczycy bajkalskiej. Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Wrocław.
13. BURBIANKA M., PLISZKA A. BURZYŃSKA H. (1983): Mikrobiologia żywności. PZWL, Warszawa.
14. CANILLAC N., MOUREY A. (2001): Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* 18, 261-268.
15. CARSON C.F., COOKSON B.D., FARRELLY H.D., RILEY T.V. (1995): Susceptibility of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 421-424.
16. CHAWLA R., PATIL G.R., SINGH A.K. (2011): High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *J. Food Sci. Technol.* 48, 3, 260-268.
17. COLLINS A.R., GRUBB A. (1998): Cystatin D, a natural salivary cysteine protease inhibitor, inhibits coronavirus replication at its physiologic concentration. *Oral Microbiology and Immunology*, Vol. 13, Issue 1, 59–61.
18. CORK M.J., DANBY S.G., VASILOPOULOS Y., HADGRAFT J., LANE M.E., MOUSTAFA M., GUY R.H, MACGOWAN A.L., TAZI-AHNINI R., WARD S.J. (2009): Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 1892-1908.

19. COSENTINO S., TUBEROSO C.I.G., PISANO B., SATTA M., MASCIA V., ARZEDI E., PALMAS F. (1999): *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 130-135.
20. COX J.L. (2009): Cystatins and cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.*, 14, 463-474.
21. DAS L., DATTA N., BANDYOPADHYAY S., DAS P.K. (2001): Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J. Immunol.* 166, 4020-4028.
22. DELAQUIS P.J., STANICH K., GIRARD B., MAZZA G. (2002): Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 101-109.
23. DICKINSON D.P. (2002): Salivary (SD-Type) Cystatins: Over One Billion Years in the Making–But to What Purpose? *Critical Rev. in Oral Biology and Medicine.* 13, 6, 485-508.
24. EUCAST (2000): Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Eucast definitive document 3.1, Clinical Microbiology and Infection* 6, 509-515.
25. FILLER G., BÖKENKAMP A., HOFMANN W., T., BRICON LE, MARTÍNEZ-BRÚ C., GRUBB A. (2005): Cystatin C as a marker of GFR - history, indications, and future research. *Clin. Biochemistry*, 38, 1, 1-8.
26. GACKO M., ŁAPIŃSKI R., GUZOWSKI A., WOROWSKA A., KORDECKI K. (2003): Aktywność i stężenie inhibitorów proteinaz osocza krwi chorych z tętniakiem aorty brzusznej. *Chirurgia Polska*, 5, 4, 189-193.
27. GIANSANTI F., ROSSI P., M. ASSUCCI M.T., BOTTI D., ANTONINI G., VALENTI P., SEGANTI L. (2002): Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. *Biochem. Cell. Biol.* 80, 125 – 130.
28. GOŁĄB K., GBUREK J., JUSZCZYŃSKA K., TRZISZKA T., POLANOWSKI A. (2012): Stabilizacja monomerycznej cystatyny z białka jaja kurzego. *Przemysł Chem.* 5, 741-744.
29. GOŁĄB K., WARWAS M. (2005): Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 14, 5, 1001–1010.

30. GRASZKIEWICZ A., KAŻMIERSKA M., NIEDBALSKA J. (2007): Wpływ dodatku preparatów mineralno-huminowych oraz przeciwutleniaczy do paszy niosek na aktywność lizozymu i cystatyny w białku jaj. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5, 54, 360 – 366.
31. HAĆ-SZYMAŃCZUK E., MROCZEK J. (2006): Zastosowanie techniki wysokich ciśnień w technologii żywności, a szczególnie w przetwórstwie mięsa. *Medycyna Wet.*, 62, 6, 637-640.
32. HODEK P., STIBOROVA M. (2003): Chicken antibodies – superior alternative for conventional immunoglobulins. *Proc. Indian natn Sci Acad.* B69, 4, 461-468.
33. HRYNIEWICZ W., SULIKOWSKA A., SZCZYPA K., KRZYSZTOŃ-RUSSJAN J., GNIADKOWSKI M. (2002): Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Mikrobiologia Med.* 32, 3, 12-39.
34. HUGHEY V.L., WILGER P.A., JOHNSON E.A. (1989): Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 55, 3, 631-638.
35. HUNTINGTON J.A., STEIN P.E. (2001): Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B* 756, 189 – 198.
36. IBRAHIM H.R., SUGIMOTO Y., AOKI T. (2000): Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1523 (2-3), 196 – 205.
37. IMIELA J., LEWANDOWICZ A. (2007): Cystatyna C w diagnostyce przewlekłej choroby nerek. *Nefrol. Dial. Pol.*, 11, 126-132.
38. JANKOWSKA A.K., WASZKIEL D., KOWALCZYK A. (2007): Ślina jako główny składnik ekosystemu jamy ustnej część I. Mechanizm wydzielania i funkcje. *Wiad. Lek.*, 60, 3-4, 148–154.
39. JASIR A., KASPRZYKOWSKI F., KASPRZYKOWSKA R., LINDSTRÖM V., SCHALEN C., GRUBB A. (2003): New antimicrobial cystatin C-based peptide active against gram-positive bacterial pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiresistant coagulase-negative staphylococci. *APMIS* 111, 1004–1010.

40. JASIR A., KASPRZYKOWSKI F., LINDSTRÖM V., SCHALÉN C., GRUBB A. (2004): New antimicrobial peptide active against Gram-positive pathogens. *Indian Journal of Medical Research, Suppl.*, 119, 74-76.
41. JIANG S.T., TZENG S.S., WU W. T., CHEN G.H. (2002): Enhanced expression of chicken cystatin as a thioredoxin fusion form in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS and its effect on the prevention of surimi gel softening. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 13, 3731–3737.
42. KANDEMIR N., YEMENICIOGLU A., MECITOGU C., ELMACI Z., ARSLANOGLU A., GOKSUNGUR Y., BAYSAL T. (2005): Production of antimicrobial films by incorporation of partially purified lysozyme into biodegradable films of crude exopolysaccharides obtained from *Aureobasidium pullulans* fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 343-350.
43. KATO T., IMATANI T., MIURA T., MINAGUCHI K., SAITOH E., OKUDA K. (2000): Cytokine-inducing activity of family 2 cystatins. *Biol. Chem.* 381, 11, 1143-1147.
44. KENNEDY A.R. (1993): Anticarcinogenic activity of protease inhibitors overview. *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents*, 9-64.
45. KOŁACZKOWSKA A., KOŁACZKOWSKI M., SOKOŁOWSKA A., MIECZNIKOWSKA H., KUBIAK A., ROLKA K., POLANOWSKI A. (2010): The antifungal properties of chicken egg cystatin against *Candida* yeast isolates showing different levels of azole resistance. *Mycoses*, 53, 4, 314-20.
46. KONDURI S.D., YANAMANDRA N., SIDDIQUE K., JOSEPH A., DINH D.H., OLIVERO W.C., GUJRATI M., KOURAKLIS G., SWAROOP A., KYRITSIS A.P., RAO J.S. (2002): Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene*, 21, 8705 – 8712.
47. KOPEĆ W., SKIBA T., KORZENIOWSKA M., BOBAK Ł., TRZISZKA T. (2005): Activity of protease inhibitors and lysozyme of hen's white depending on feed modification and egg storage. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14/55, SI 1, 79-83.
48. KOS J., KRAŠOVEC M., CIMERMAN N., NIELSEN H. J., CHRISTENSEN I. J., BRÜNNER N. (2000): Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: Relation to Prognosis. *Clin. Cancer Res.* 6, 505-511.

49. KOWALSKA M. (1989): Właściwości immunologiczne lizozymu. *Medycyna Wet.* 45, 323-327.
50. KOVACS-NOLAN J., PHILLIPS M., MINE Y. (2005): Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.* 53, 22, 8421-8431.
51. KROL J., KOPITZ C., KIRSCHENHOFER A., SCHMITT M., MAGDOLEN U., KRUGER A., MAGDOLEN V. (2003): Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer by bi- and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems. *Biol. Chem.*, 384, 1097-1102.
52. LARSSON A., MALM J., GRUBB A., HANSSON L.O. (2004): Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 64, 25-30.
53. LEVY E. (2008): Cystatin C: a potential target for Alzheimer's treatment. *Expert Rev. Neurotherapeutics*, 8, 5, 687-689.
54. LI D.K., LIN H., KIM S.M. (2007): Application of recombinant chum salmon cystatin to alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi to prevent gel weakening. *J. of Food Science*, 72, 5, 294-299.
55. LUTGENS S.P.M., CLEUTJENS K.B.J.M., M.J.A.P. DAEMEN, HEENEMAN S. (2007): Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *The FASEB Journal*, 21, 3029-3041.
56. LYNDRUP M.L. (1973): The Isolation and Fractionation of Chicken Egg White Ovomucin. *Preparative Biochemistry*, 3, 2, 135-148.
57. MALICKI A. (2000): Mikrobiologia jaj i przetworów jajowych. W: TRZISZKA T. (red.): *Jajczarstwo: nauka, technologia, praktyka*. Wyd. Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
58. MALICKI A., TRZISZKA T., POLANOWSKI A., SZPAK M., SZYPLIK K., JANIK P. (2013): Kompozycja o synergistycznym działaniu przeciwdrobnoustrojowym i zastosowanie kompozycji o synergistycznym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Zgłoszenie patentowe nr P.403577, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
59. MALICKI A., TRZISZKA T., SZPAK M., JARMOLUK A., JANIK P., ŻRÓDŁOWSKA-DANEK J. (2011): Technologiczne i mikrobiologiczne aspekty wpływu lizozymu na trwałość mięsa drobiowego. *Przemysł Chem.*, 5, 904-906.

60. MALICKI A., TRZISZKA T., SZPAK M., ŻRÓDŁOWSKA-DANEK J. (2010): Badania nad zastosowaniem lizozymu i octanu sodu w celu przedłużenia trwałości mięsa drobiowego. *Medycyna Wet.*, 66, 10, 699-701.
61. MALINOWSKA-PAŃCZYK E., KOŁODZIEJSKA I. (2007): Wpływ połączonego działania wysokiego ciśnienia i innych czynników na mikroorganizmy. *Medycyna Wet.*, 63, 5, 515-518.
62. MINE Y. (2008): *Egg bioscience and biotechnology*. Wiley-interscience.
63. MINE Y. (2007): Egg proteins and peptides in human health-chemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design* 13, 9, 875-884.
64. MINE Y., KOVACS-NOLAN J. (2004): Biologically active hen egg components in human health and disease. *J. of Poultry Science*, 41, 1-29.
65. MINE Y., KOVACS-NOLAN J. (2005): New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. XIth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Doorwerth, The Netherlands, 23-26 May.
66. MOLENDĄ J. (2010): *Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego*. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
67. MOLENDĄ J. (2007): Wybrane niekonwencjonalne metody utrwalania żywności. *Medycyna Wet.*, 63, 9, 1016-1020.
68. MUKHERJEE S., UKIL A., DAS P.K. (2007): Immunomodulatory peptide from cystatin, a natural cysteine protease inhibitor, against leishmaniasis as a model macrophage disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 5, 1700-1707.
69. NAKIMBUGWE D., MASSCHALCK B., ANIM G., MICHIELS C.W. (2006): Inactivation of gram-negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic pressure. *International J. of Food Microb.*, 112, 1, 15, 19-25.
70. NICPOŃ J., PASŁAWSKA U., (2013a): Kardioprotekcyjny wpływ suplementu diety – superlecycyny bogatej w DHA, wit. A + wit. E, uzyskanego z nowej generacji jaj. Projekt Ovocura, zadanie nr 9.
71. NICPOŃ J., POPIEL J. (2013b): Zastosowanie ovocystatyny z białka jaja w terapii atopowego zapalenia skóry u psów. Projekt Ovocura, zadanie nr 9.

72. OCHIENG J., CHAUDHURI, G. (2010): Cystatin Superfamily. *J. Health Care Poor Underserved*, 21, 1 Suppl., 51–70.
73. PARAOAN L., GRIERSON I. (2007): Focus on molecules: Cystatin C. *Experimental Eye Research* 84, 1019-1020.
74. PELLEGRINI A., HULSMIEIER A.J., HUNZIKER P., THOMAS U. (2004): Proteolytic fragments of ovoalbumin display antimicrobial activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1672, 76–85.
75. PELLEGRINI A., THOMAS U., VON FALLENBERG R., WILD P. (1992): Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *J Appl. Bacteriol*, 72, 3, 180-187.
76. PIRTTILÄ T. J., MANNINEN A., JUTILA L., NISSINEN J., KÄLVIÄINEN R., VAPALAHTI M., IMMONEN A., L. PALJÄRVI, KARKOLA K., ALAFUZOFF I., MERVAALA E., PITKÄNEN A. (2005): Cystatin C expression is associated with granule cell dispersion in epilepsy. *Annals of Neurology*, 58, 2, 211–223.
77. SALEH Y., ZIOLKOWSKI P., SIEWINSKI M., MILACH J., MARSZALIK P., RYBKA J. (2001): The combined treatment of transplantable solid mammary carcinoma in wistar rats by use of photodynamic therapy and cysteine proteinase inhibitor. *In Vivo*, 15, 4, 351–357.
78. SAXENA I., TAYYAB S. (1997): Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, 1, 13-23.
79. SHAH A., BANO B. (2009): Cystatins in health and diseases. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 15, 43–48.
80. SILVETTI T., BRASCA M., LODI R., VANONI L., CHIOLERIO F., DE GROOT M., BRAVI A. (2010): Effects of Lysozyme on the Microbiological Stability and Organoleptic Properties of Unpasteurized Beer. *J. Inst. Brew.* 116, 1, 33–40.
81. SOSNOWSKA A., TRZISZKA T., POLANOWSKI A., BUBEL F. (2011): Substancje biologicznie czynne w surowcu jajczarskim, ich znaczenie biomedyczne oraz technologiczne możliwości otrzymywania na skalę przemysłową. *Przemysł Chem.*, 5, 1029-1034.
82. STEVENS L. (1991): EGG white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 100, 1, 1-9.

83. SUGIMOTO Y., SANUKI S., OHSAKO S., HIGASHIMOTOI Y., KONDOI M., KURAWAKI J., IBRAHIM H.R., AOKI T., KUSAKABE T., KOGA K. (1999): Ovalbumin in Developing Chicken Eggs Migrates from Egg White to Embryonic Organs while Changing Its Conformation and Thermal Stability. *Journal of biological chemistry*, 274, 16, 11030–11037.
84. TRZISZKA T. (2000): *Jajczarstwo: Nauka, technologia, praktyka*. Wyd. Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
85. TRZISZKA T., SALEH Y., KOPEĆ W., WOJCIECHOWSKA - SMARDZ I., OZIEMBŁOWSKI M. (2004a): Changes in the activity of lysozyme and cystatin depending on the age of layers and egg treatment during processing. *Archiv Gefluegelk* 68, 6, 275-279.
86. TRZISZKA T., SALEH Y., KOPEĆ W., SIEWIŃSKI M., WĘSIERSKA E. (2004b): Effect of hen's age on the level of cystatin in the chicken egg white. *Inter. J. Poultry Sci.*, 3, 471–477.
87. TURK V., BODE W. (1991): The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.*, 285, 2, 213-219.
88. TURK V., STOKA V., TURK D. (2008): Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in Bioscience*, May 1, 5406-5420.
89. URWIN P.E., GREEN J., ATKINSON H.J. (2003): Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. *Molecular Breeding* 12, 3, 263-269.
90. VALENTI P., VISCA P., ANTONINI G., ORSI N. (1985): Antifungal activity of ovotransferrin towards genus *Candida*. *Mycopathologia*, 89, 169 – 175.
91. VAN COILLIE E., DE BLOCK J., REYBROECK W. (2004): Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (16), 4975–4978.
92. VERDOT L., LALMANACH G., VERCROYSSSE V., HOEBEKE J., GAUTHIER F., VRAY B. (1999): Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon- γ -activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis. *Eur. J. Biochem.* 266, 1111-1117.

93. VIS E.H., PLINCK A.F., ALINK G.M., VAN BOEKEL M.A.J.S. (1998): Antimutagenicity of Heat-Denatured Ovalbumin, before and after Digestion, As Compared to Caseinate, BSA, and Soy Protein. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (9), 3713–3718.
94. WARWAS M., KACZMAREK U., GOŁĄB K. (2000): Udział proteaz cysteinowych i cystatyn w patogenezie i diagnostyce laboratoryjnej chorób przyzębia. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 54, 879–894.
95. WATANABE K., TSUGE Y., SHIMOYAMADA M., OGAMA N., EBINA T. (1998): Antitumor effects of pronase - treated fragments, glycopeptides, from ovomucin in hen egg white in a double grafted tumor system. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3033-3038.
96. WĘSIERSKA E. (2006): Czynniki jakości mikrobiologicznej spożywczych jaj kurzych. *Medycyna Wet.*, 62, 1222-1228.
97. WĘSIERSKA E., SALEH Y., TRZISZKA T., KOPEĆ W., SIEWIŃSKI M., KORZEKWA K. (2005): Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. *World J. of Microbiology and Biotechnology*, 21, 59-64.
98. XUNHUI X., JIANZHOU Z., XIAOQIANG D., DINGGUANG X., YUSHEN R. (2004): Clinical value of serum cystatin C by ELISA for estimation of glomerular filtration rate. *J. of Clin. Lab. Analysis*, 18, 2, 61–64.
99. YUSTE J., MOR-MUR M., GUAMIS B., PLA R. (2000): Combination of high pressure with nisin or lysozyme to further process mechanically recovered poultry meat. *High Pressure Res.*, 19, 85-90.
100. ZALESKI S.J. (1985): *Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa.
101. ZAVASNIK-BERGANT T. (2008): Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Frontiers in Bioscience*, May 1, 4625-4637.
102. ZEEUWEN P.L., VAN VLIJMEN-WILLEMS I.M., OLTHUIS D., JOHANSEN H.T., HITOMI K., HARA-NISHIMURA I., POWERS J.C., JAMES K.E., OP DEN CAMP H.J., LEMMENS R., SCHALKWIJK J. (2004): Evidence that unrestricted legumain activity is involved in disturbed epidermal cornification in cystatin M/E deficient mice. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 13, 10, 1069-1079.

103. ŽEROVNIK E., CIMERMAN N., KOS J., TURK V., LOHNER K. (1997): Thermal denaturation of human cystatin C and two of its variants; comparison to chicken cystatin. *Biological Chemistry*, 378, 10, 1199-1203.