

Lysozym a jeho použití ve fermentačních technologiích

579 663

Ing. PETR SMOLEK, Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Praha

Klíčová slova: *lysozym, stabilizace, baktérie, fermentace*

Lysozym (E.C. 3.2.1.17.) je název pro skupinu enzymů, které mohou napadat a odbourávat buněčné stěny baktérií. V přírodě se vyskytuje v řadě živočišných i rostlinných sekretů. U člověka byl lysozym nalezen v mateřském mléce, slizách, nosním hlenu, slinách, krevním séru. Nejlépe je prozkoumán, a to po stránce biochemické, fyzikálně-chemické i bakteriologické a farmakologické lysozym ze slepičích vaječných bílků, z nichž je také průmyslově získáván izolací.

Výroba

Lysozym je z bílku, získaného vytloukáním slepičích vajec, izolován izoelektrickým vysolováním nebo adsorpční technikou.

K izoelektrickému vysolování [1, 2] se používá NaCl. Ze sraženiny se lysozym extrahuje zředěnou kyselinou. Extrakt se po filtrace suší v rozprašovací sušárně.

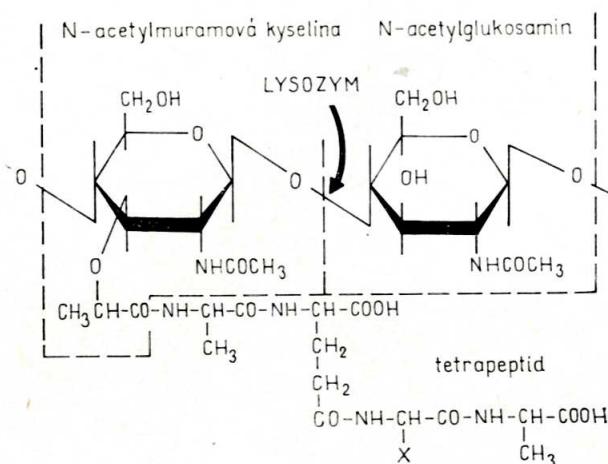
Při adsorpčním způsobu [3] je bílek v kontaktu se slabým katexem, z něhož je lysozym eluován síranem amonným. Před sušením je roztok čistěn na sloupci slabého anexu.

Vlastnosti [4-9]

Lysozym ze slepičích vaječných bílků je bazická bílkovina (pH okolo 10,0) nízké molekulové hmotnosti (13 930) s vysokou stabilitou (při pH 4,5 snáší teplotu

100 °C po dobu 2 minut). Molekula je tvořena 129 aminokyselinami uspořádanými do jediného řetězce se čtyřmi S-S můstky. U enzymu je známa primární, sekundární, terciární a kvarterní struktura i mechanismus účinku aktivního centra včetně jeho lokalizace. Enzym je aktivní v širokém rozmezí pH [2—9], přičemž aktivita závisí na zachování tryptofanových a histidinových zbytků v přítomnosti alespoň dvou S-S můstek. Molekula je představována široce eliptickou molekulou o rozměrech 450 × 300 × 700 nm.

Lysozym je hydrolasa štěpící peptidoglykan. Peptidoglykan (mukopeptid, murein) je látka specifická pro prokaryontní organismy. Je to lineární polymer dvou střídajících se aminocukrů: N-acetylglukosaminu a jeho 3-O-D-laktyl derivátu N-acetylmuramové kyseliny spojených navzájem vesměs β -1,4 vazbami. Na karboxyl kyseliny muramové je vázán tetrapeptid: L-ala - D-glu - R - D-ala, v němž R představuje proměnnou aminokyselinu, např. L-lysin, L,L-diaminopimelovou kyselinu, L-ornithin (obr. 1). Tetrapeptidy jsou vzájemně propojeny. Propojení je dvojího druhu. U gramnegativních baktérií je přímo propojen koncový D-ala jednoho tetrapeptidu s předposlední aminokyselinou druhého tetrapeptidu. U grampozitivních baktérií je spojení zprostředkováno jednou nebo několika dalšími aminokyselinami. Díky propojení tvoří lineární polymery síťovinu. Ta je pevnější u grampozitivních baktérií, kde jsou propojení



Obr. 1. Základní jednotka peptidoglykanu

častější, než u gramnegativních baktérií, kde jsou méně častá (obr. 2). Gramnegativní baktérie mají zřejmě méně takových vrstev, zatímco grampozitivní mnoho.

Struktura molekuly lysozymu umožňuje porozumět jeho katalytickému působení. V molekule enzymu je hluboká rýha, která pojímá substrát — peptidoglykan. Při hydrolyze část lysozymového řetězce změní svou prostorovou polohu a vstupuje do vazby se substrátem. Mezi substrátem a reaktivními skupinami enzymu lze zajistit velký počet vedlejších vazeb. Jeden ze sacharidových kruhů je nucen změnit konformaci židličkovou na téměř rovinnou, která má prutí. Potřebnou energii dodávají vedlejší valence. Změnou konformace substrátu se energeticky zvýhodní štěpení vazby C-O-C. Nyní přistupuje H^+ z Glu-35, reaguje s glykosidovým kyslíkem a vazba se štěpi, přičemž na C-1 napjatého kruhu zůstává karboniový ion a stabilizuje se karboxylovou skupinou Asp-52. Jakmile oddisocioval první štěp, přistupuje molekula vody a atakuje karboniový ion; připojí se OH^- , tím je dokončena hydrolyza a oddisociouje druhý štěp. Enzym pak může atakovat další molekulu substrátu.

Enzym je vysoce účinný na některé grampozitivní baktérie, jejichž stěna je vlastním substrátem enzymu. Obecně mají grampozitivní baktérie pevnější buněčné stěny v závislosti na vyšším obsahu peptidoglykanu, a jsou proto k lysozemu citlivější než baktérie gramnegativní. Konečné prasknutí buněčného obsahu však závisí na osmotickém tlaku média. Gramnegativní baktérie jsou účinkem lysozemu rozrušovány za účasti ethylendiaminetetraoctové kyseliny (Chelatonu), nebo po časné uvolnění povrchových plastických vrstev buněčné stěny, např. působením detergentů.

Lysozym zasahuje i do metabolismu baktérií. Příčinou inhibičního účinku je tvorba rozpustných i nerazpustných komplexů s lipoproteiny a fosfolipidy.

Použití

Baktericidních vlastností lysozemu je využíváno v potravinářství, medicíně a kosmetice. Další oblastí, ve které by mohl být enzym využíván, jsou fermentační technologie.

Přídavek lysozemu do fermentační půdy zvyšuje produkci antibiotik [10, 11].

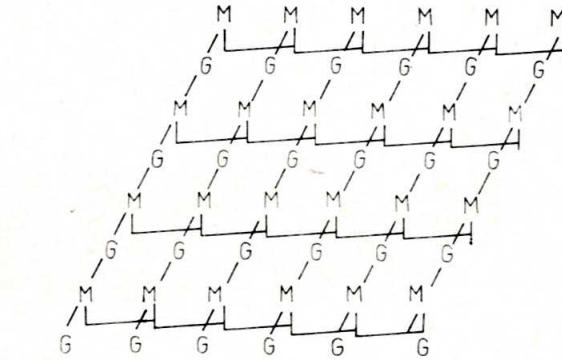
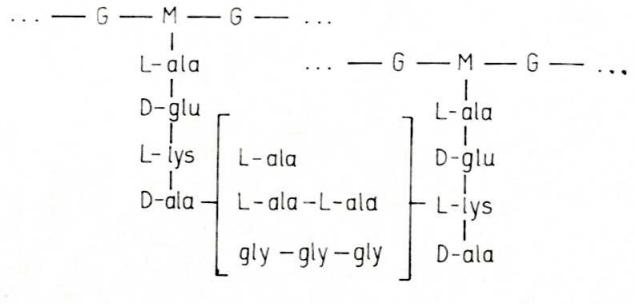
Jiná možnost se nabízí při výrobě bakteriálních bílkovin [12] nebo extrakci bakteriálních enzymů [13, 14].

V Japonsku se lysozemu používá ke konzervování saké [15–18]. Přídavek 3,7 g lysozemu/hl s následnou pasteurací 5 minut při 60 °C nebo kombinace 1 g/hl lysozemu a 1 g/hl glukosoxidasy (E.C.1.1.3.4) podstatně prodloužila skladovatelnost, bez ovlivnění organoleptických vlastností saké. Enzym je stabilní, k jeho inaktivaci dochází až dlouhodobou pasteuraci.

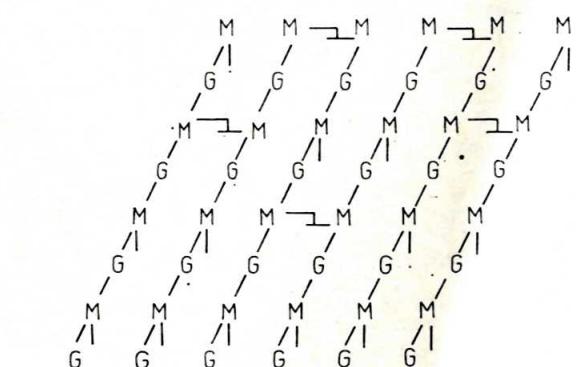
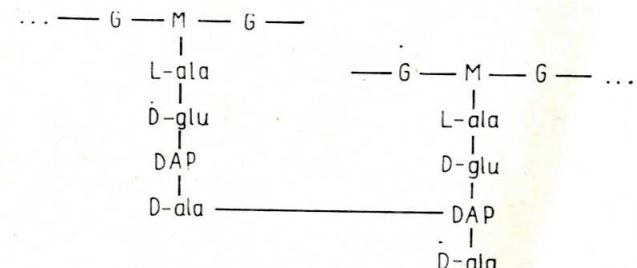
Bylo navrhnuто vyzkoušet lysozym při výrobě piva, lihu, limonád a asanaci výrobních zařízení [19]. Jinou možností je sterilizace vzduchu [20].

Lysozym je používán k přípravě bakteriálních protoplastů a sferoplastů [např. 21–24], potřebných k získání nových kmenů.

Praktickým využitím lysozemu k biologické stabilizaci piva se zabývalo Pokusné a vývojové středisko státního podniku Pivovery a sladovny, VTOS Praha Braník.



a)



b)

Obr. 2. Peptidoglykan a schéma propojení jeho lineárních makromolekul v jednovrstevnou síťovinu u (a) grampozitivních a (b) gramnegativních baktérií. G — N-acetylglucosamin, M — N-acetylmuramová kyselina, DAP — L,L-diaminopimelová kyselina

Literatura

- [1] USA pat. 2 579 455, 1955.
- [2] SSSR pat. 712 438, 1980.
- [3] Brit. pat. 1155 793, 1969.
- [4] OSSERMAN E. F., CANFIELD E., BEYCHOK S.: *Lysozyme*, 1. vydání Academic Press, New York, 1974.
- [5] JOLLES P.: *Angew. Chem.* **76**, 1964, s. 20.
- [6] RUTTLOFF, H.: *Industrielle Enzyme*, 1. vyd. VEB Fachbuchverlag, Leipzig, 1978.
- [7] FASOLD, H.: *Die Struktur der Proteine*, 1. vyd. Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
- [8] METZLER, D. E.: *Biochemistry*, 1. vyd. Academic Press, New York, 1977.
- [9] WISEMAN, A.: *Příručka enzymové technologie*, SNTL, Praha 1980.
- [10] Fr. pat. 2 051 711, 1971.
- [11] Jap. pat. 8 032 358, 1980 In: C. A. **94**, 84 545 m, 1972.
- [12] CS pat. 153 886, 1975.
- [13] Jap. pat. 77 114 088, 1977 In: C. A. **88**, 35 857 d, 1978.
- [14] Jap. pat. 77 117 483, 1977 In: C. A. **88**, 35 862 b, 1978.
- [15] YAJIMA, M., HIDAKA Y., MATSUOKA, Y.: *Hakko Kogaku Zasshi* **46**, 1968, s. 782 In: C. A. **70**, 46 247j, 1969.
- [16] MIZUO, Y., YOSHIO, H., YOSHITAKA, M.: *J. Ferment. Technol.* **46**, 1968, s. 782.
- [17] Jap. pat. 7 103 115, 1971 In: C. A. **75**, 128 509 p, 1971.
- [18] Jap. pat. 8 035 105, 1980 In: C. A. **94**, 45 591 a, 1981.
- [19] SMOLEK, P.: Možnosti využití lysozymu ve fermentačních technologiích. VI. konference racionalizace fermentačních procesů a ekonomické informace. Zvíkovské podhradí 1983.
- [20] USA pat. 3849 254, 1975.
- [21] SUD, I. J.: *Indian J. Pathol. Bacteriol.* **9**, 1966, s. 313.
- [22] Fr. pat. 2293 44440, 1976.
- [23] MATSUSHITA, K., SHINAGAWA, E., ADACHI O., AMEYAMA M.: *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1981, s. 1515.
- [24] Eur. pat. 64 680, 1981.

Smolek, P.: Lysozym a jeho použití ve fermentačních technologiích. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 11, s. 331—333.

V článku jsou popsány základní fyzikální i chemické vlastnosti, mechanismus účinku aktivního centra a možnosti aplikací enzymu lysozymu ve fermentačních technologiích.

Смолек, П.: Лизозим и его применение в ферментационных технологиях. Квас. прум., **35**, 1989, № 11, стр. 331—333.

В статье описаны основные физические и химические свойства, механизм действия активного центра и возможности приложения энзима лизозима в ферментационных технологиях.

Smolek, P.: Lysozym and Its Use in Fermentation Technologies. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 11, pp. 331—333.

Lysozym enzyme is described with respect to its principal physical and chemical properties. The mechanism of the effect of its active centre as well as possible applications of this enzyme in fermentation technologies are discussed.

Smolek, P.: Lysozym und seine Anwendung in den Fermentations-Technologien. Kvas. prům., **35**, 1989, Nr. 11, S. 331—333.

In dem Artikel werden die physikalischen und chemischen Grundeigenschaften, der Mechanismus der Wirkung des Aktivzentrums und die Applikationsmöglichkeiten des Enzyms Lysozym in den Fermentationstechnologien beschrieben und erörtert.