

LEŚNIEWSKI GRZEGORZ, KIJOWSKI JACEK

## BUDOWA I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA LIZOZYMU (MURAMIDAZY)

### Streszczenie

W opracowaniu omówiono występowanie i budowę lizozymu (muramidazy) oraz przedstawiono jego strukturę pierwszorzędową i przestrzenną. Podano właściwości fizykochemiczne oraz omówiono czynniki wpływające na aktywność lizozymu. Enzym jest stabilny termicznie w środowisku kwaśnym, natomiast przy wyższych wartościach pH następuje jego inaktywacja. Cukry, sole, poliole, niektóre aminokwasy i przyprawy stabilizują jego aktywność. Lizozym natomiast traci część swej aktywności na skutek łączenia się enzymu ze składnikami żółtka i białka jaja oraz kationami wielowartościowymi.

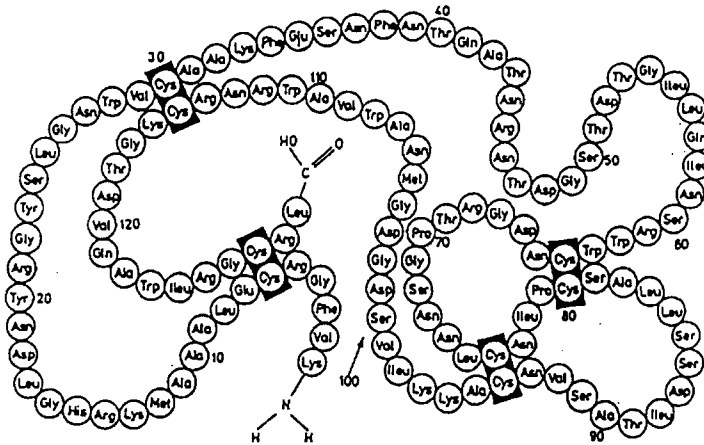
### Wstęp

W 1922 roku Fleming odkrył lityczne działanie białka jaja kurzego w stosunku do niektórych bakterii. Substancją antybakteryjną okazał się składnik białka jaja kurzego, który nazwał lizozymem (lizo – rozkład, zyme – enzym), a bakteriom które szczególnie były wrażliwe na jego działanie nadał nazwę *Micrococcus lysodeikticus* [28]. Lizozym (N-acetylo-muramylhydrolaza E.C. 3.2.1.17) występuje prawie we wszystkich wydzielinach, płynach ustrojowych i tkankach organizmu człowieka i zwierząt. Wyizolowany również został z niektórych bakterii, bakteriofagów i roślin [24]. Lizozym jest enzymem zajmującym szczególnie ważne miejsce w systemie odpornościowym jaj ptaków. Jako składnik białka jaja stanowi on naturalną barierę ochronną treści jaja przed drobnoustrojami. Działanie ochronne polega na niszczeniu bakterii poprzez rozzerwanie wiązań  $\beta(1-4)$  pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozoaminą [28]. Te naturalne właściwości enzymu coraz szerzej wykorzystywane są praktycznie do celów ochronnych, a w tym również w przemyśle spożywczym.

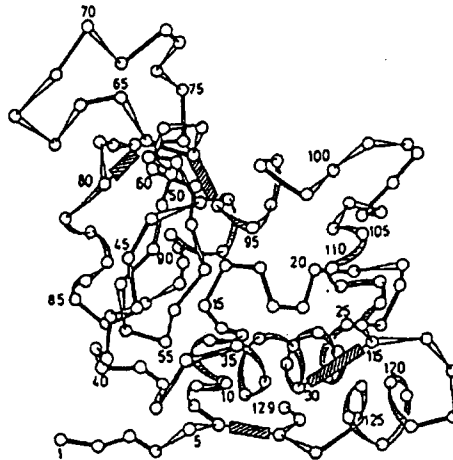
## Charakterystyka lizozymu

Podstawowym, niezwykle bogatym źródłem lizozymu (muramidazy) jest białko jaja ptaków. Stanowi on około 3.5 % części białkowej jaja kurzego, około 1.2 % białka jaja kaczego i około 0.6 % białka jaja gęsiego. Wyizolowany z białka jaja kurzego jest jednym z najlepiej poznanych enzymów. Występuje jako pojedynczy łańcuch polipeptydowy składający się ze 129 aminokwasów, w którym N-końcowym aminokwasem jest zawsze lizyna, a C-końcowym – leucyna. Lizozym jest białkiem o niskiej masie cząsteczkowej około 14500 Da i wykazuje charakter zasadowy. Stopień zasadowości dla lizozymów pochodzących z różnych źródeł jest różny zależnie od liczby zasadowych aminokwasów obecnych w cząsteczce. Decyduje to o wartości pH punktów izoelektrycznych, która waha się od 9.6 do 11.0. W cząsteczce lizozymu występują cztery wiązania poprzeczne w postaci mostków dwusiarczkowych, które powodują jego dużą stabilność. Strukturę pierwszorzędową lizozymu jaja kurzego przedstawiono na rys. 1. Podobną grupę pod względem struktury pierwszorzędowej stanowią muramidazy wyizolowane z łez, śliny, śledziony i mleka, natomiast odmienną strukturę wykazuje lizozym białka gęsiego oraz pochodzenia roślinnego, bakteryjnego i bakteriofagowego [21]. Przestrzenną strukturę lizozymu przedstawił w 1965 roku Philips [23]. Cząsteczka enzymu jest zwarta o kształcie zbliżonym do elipsoidy, o wymiarach 4.5x3.0x3.0 nm. Sposób jej pofałdowania jest bardzo złożony (rys. 2), a wiele fragmentów łańcucha polipeptydowego występuje w konformacji rozwiniętej. W jednym z odcinków łańcuch polipeptydowy ulega zagięciu, umożliwiając równoległe ułożenie dwu części tego łańcucha. Układ stabilizowany jest wiązaniami wodorowymi pomiędzy grupami peptydowymi i zbliżony jest do regularnej struktury drugorzędowej. Wnętrze lizozymu jest niemal całkowicie niepolarne. Podobnie jak w większości białek oddziaływania hydrofobowe spełniają ważną rolę w procesie fałdowania lizozymu. Określenie szczegółowej, przestrzennej struktury lizozymu nie było jednoznaczne z poznaniem jego mechanizmu katalitycznego. Nie można było bowiem bezpośrednio ustalić położenia miejsca aktywnego, gdyż w przeciwieństwie do niektórych innych białek, lizozym nie zawiera grupy prostetycznej, która umożliwia odróżnienie miejsca aktywnego od reszty cząsteczki. Dopiero badania rentgenograficzne oddziaływań lizozymu z inhibitorami umożliwiły identyfikację aktywnego centrum. Okazało się, że jedynymi, położonymi blisko hydrolizowanego wiązania glikozowego resztami, które mogą brać czynny udział w katalizie są reszty kwasu asparaginowego 52 (Asp-52) i glutaminowego 35 (Glu-35). Reszta kwasu asparaginowego znajduje się po jednej stronie wiązania glikozydowego, a kwasu glutaminowego - po drugiej. Kwas asparaginowy znajduje się w otoczeniu ściśle polarnym i jest akceptorem wodoru, natomiast kwas glutaminowy usytuowany jest w rejonie niepolarnym i jest donorem wodoru. Szczegółowy mechanizm katalityczny lizozymu przedstawił Philips w 1966

roku [23]. Autor wykazał również, że modyfikacja chemiczna wszystkich grup karboksylowych z wyjątkiem Glu-35 i Asp-52 nie prowadzi do utraty aktywności enzymatycznej lizozymu. Modyfikacja Asp-52 powoduje całkowitą utratę aktywności enzymatycznej lizozymu. Stanowi to jeszcze jeden dowód na umiejscowienie centrum aktywnego enzymu.



Rys. 1. Struktura pierwszorzędowa jaja kurzego wg Canfielda [4].



Rys. 2. Model struktury lizozymu jaja kurzego wg Philippsa [23].

### Czynniki wpływające na aktywność lizozymu

Przeprowadzone badania wpływu różnych czynników na właściwości lizozymu wykazały, że odczyn środowiska, w którym enzym jest rozpuszczony, temperatura,

dodatek substancji chemicznych oraz zdolność lizozymu do tworzenia związków kompleksowych mają ogromny wpływ na jego aktywność.

Matsuoka i wsp. [19] wykazali stabilność lizozymu w kwaśnych roztworach (przy pH 4.5 i w 100°C był stabilny przez 3 minuty, a przy pH 5.3 i w 100°C – 30 minut). Stosując spadek enzymatycznej aktywności jako kryterium, Beychok i Warner [3] wykazali, że stabilność enzymu była maksymalna w zakresie temperatur 85–95°C przy wartości pH ok. 5.5. Przy zwiększaniu pH powyżej 6,0 stabilność wyraźnie spadała. Gorini i Felix [16] ogrzewali lizozym w temperaturze 70°C w buforze boranowym o pH 7.9 i po 30 minutach nastąpił 25 % spadek jego aktywności. Badania Cunninghama i Lineweavera [8] wykazały, że lizozym rozpuszczony w buforze fosforanowym o pH 6.2 i ogrzewany w temperaturze 62.5°C był ponad 50-krotnie stabilniejszy niż lizozym w białku jaja (pH 9.0) ogrzewany w tej samej temperaturze. Inaktywacja lizozymu zależała od wartości pH i wynosiła 10 % dla pH równego 7.0 i ponad 95 % dla pH 9.0. Inaktywacja lizozymu nie występowała w buforze fosforanowym w temperaturze 62.5°C nawet przy pH 9.0 ale w temperaturze 65°C przy tej samej wartości pH inaktywacja nastąpiła już po 10 minutach. W kolejnej pracy [9] ci sami autorzy wykazali, że spadek aktywności lizozymu był większy w białku jaja w niższych temperaturach niż w buforze fosforanowym ponieważ grupy siarkowodorowe owoalbuminy redukowały przynajmniej jedno połączenie dwusiarczkowe w lizozymie. Przedstawione wyniki badań wskazują, że lizozym odporny jest na ogrzewanie w kwaśnych roztworach, osiągając maksymalną stabilność przy pH około 5.5. Szybko jednak ulega inaktywacji w środowisku zasadowym. Czynnikiem stymulującym aktywność lizozymu przy wyższych wartościach pH jest bufor fosforanowy.

Badania dotyczące zmian denaturacyjnych lizozymu wykazały, że wpływają one w znacznym stopniu na obniżenie aktywności enzymu. Frasco i in. [13] zastosowali spektroskopię w podczerwieni do zbadania mechanizmu cieplnej denaturacji lizozymu. Zewnętrzne niepolarne reszty aminokwasowe nie odgrywały poważniejszej roli w zmianach denaturacyjnych, ale woda uwolniona z zewnętrznych polarnych reszt aminokwasowych odgrywała decydującą rolę w zainicjowaniu tych procesów. Woda migrowała do wewnętrznych wiązań peptydowych powodując pęcznienie i odfałdowanie białka. Mechanizm zjawiska tłumaczono redukcją krystaliczności białka i zwiększeniem jego całkowitej powierzchni. Wraz z dodawaniem wody do systemu następowała zmiana wiązań typu peptyd-peptyd na wiązania typu peptyd-woda, co było przyczyną dalszego pęcznienia i odfałdowania białka.

Chang i Carr [5] wykazali, że lizozym jest nieaktywny w wodzie destylowanej. Przez długi czas sądzono, że po usunięciu wody z roztworu, w którym rozpuszczono lizozym zachodzą w nim niewielkie bądź nie zachodzą żadne zmiany strukturalne. Baker i in. [2] badali właściwości lizozymu w trzech rodzajach prób: zliofilizowanych,

całkowicie odwodnionych a potem nawodnionych w warunkach bardzo wysokiej wilgotności powietrza, porównując je z właściwościami w roztworze wodnym. Wyniki badań wskazują, że lizozym po zliofilizowaniu nie posiada tej samej konformacji co lizozym znajdujący się w roztworze wodnym.

Badano również wpływ alkoholi na strukturę i właściwości lizozymu. Tribout i Leonis [27] określając oddziaływanie metanolu, etanolu i n-propanolu na enzym wykazali, że efektywność alkoholi jako denaturanta białka wzrastała wraz ze wzrostem długości łańcucha wodorowęglowego. Zjawisko wyjaśniane jest w kategoriach hydrofobowego mechanizmu interakcji alkohol-białko w łańcuchu bocznym. Yashitake i Shinchiro [29] badali aktywność lizozymu w alkoholu i w 5 % wodnym roztworze kwasu octowego. Lizozym o stężeniu 10–50  $\mu\text{g/ml}$  rozpuszczony w sake utrzymywał 100 % aktywność przez 20 tygodni w temperaturze 37°C, a w temperaturze 65°C przez 1 godzinę. Natomiast w 5 % wodnym roztworze kwasu octowego, lizozym o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  po dwóch tygodniach przechowywania stracił 60 % swej początkowej aktywności, po 10 tygodniach – 95 %, a po 20 tygodniach wystąpił całkowity brak aktywności. Brak aktywności w tym roztworze obserwowano również już po jednej godzinie ogrzewania w temperaturze 65°C.

Back i wsp. [1] badali wpływ cukrów i polioliów (alkoholi wielowodorotlenowych) na stabilność lizozymu. Roztwory białka ogrzewano ze stałą szybkością aż do osiągnięcia temperatury denaturacji enzymu. Dodatek cukrów i polioliów podnosił temperaturę denaturacji lizozymu, a wielkość efektu zależała od właściwości cukrów lub polioliów. W 50 % roztworze sorbitolu przy pH 3.0 temperatura denaturacji lizozymu wzrosła o 18.5°C. Autorzy sugerują, że zjawisko powodowane było efektami hydrofobowymi interakcji cukrów i polioliów, które zmniejszały tendencje do całkowitego przejścia grup hydrofobowych ze środowiska polarnego do niepolarnego. Yashitake i Shinchiro [29] również wykazali wzrost cieplnej stabilności lizozymu w roztworach cukrów. Aktywność enzymu o stężeniu 20  $\mu\text{g/ml}$  w 60 % roztworze cukrów wzrosła nawet przy obniżeniu wartości pH roztworu z 6.0 do 3.2. Wyniki te potwierdzone zostały przez Proctora i Cunninghama [25]. Autorzy wykazali, że aktywność lizozymu o stężeniu 200  $\mu\text{g/ml}$  w 40 % roztworze glukozy wzrosła do 110 % jego aktywności początkowej, a w 20 % syropie kukurydzianym do 105 %. Autorzy przetestowali również wpływ 22 aminokwasów oraz 13 przypraw na aktywność lizozymu. Stwierdzono, że spośród aminokwasów najwyższy wzrost wystąpił w 5 % roztworach histydyny (114 % jego początkowej aktywności) i lizyny (112 %). Powyżej 100 % początkowej aktywności uzyskano również dla glicyny (107 %), cysteiny (106 %), treoniny (104 %), seryny (103 %) i argininy (102 %). Największe obniżenie aktywności wystąpiło dla tryptofanu do 83 % aktywności początkowej. Spośród przypraw ponad 100 % aktywność uzyskano dla pieprzu (105 %), musztardy (101.3 %) i

sosu sojowego (100 %), a poniżej 100 % dla chili (96 %), papryki (93.5 %) i cynamonu (84 %).

W wielu przeprowadzonych badaniach wykazano wpływ chlorku sodu na aktywność lizozymu. Stwierdzono, że enzym aktywowany jest przy małym dodatku NaCl i inaktywowany przy dużym. Kravchenko i wsp. [18] wykazali, że sól jest niezbędna dla enzymatycznego działania lizozymu, a optymalne jej stężenie waha się w granicach 0.05–0.10 mola. Chang i Carr [5] stosując dodatki chlorku sodu, fosforanu potasu i Tris-u wykazali, że aktywacja lizozymu w niskich stężeniach soli najbardziej skorelowana była z niespecyficznym efektem siły jonowej, a inaktywacja przy wyższych stężeniach soli zależała od stężenia kationów. Przy danej sile jonowej wielowartościowe kationy były silniejszymi inhibitorami niż kationy jednowartościowe. Efekt zmian kationowych zależał od zmian wartości pH w taki sposób, że optimum kationowej koncentracji zmniejszało się wraz ze wzrostem wartości pH. Dla roztworu o stężeniu 50 nM jednowartościowe kationy osiągały maksimum działania przy wartości pH 7.0, ale przy pH 9.0 były one bardzo silnymi inhibitorami. Lizozym tworzy układy kompleksowe z różnymi substancjami często tracąc przy tym swą aktywność. Ważnym odkryciem dotyczącym zdolności lizozymu do tworzenia związków kompleksowych było stwierdzenie, że nawet nieznaczna ilość żółtka zmieszana z białkiem jaja drastycznie obniża pianistość białka. Przyczyny zjawiska były niejasne aż do czasu przeprowadzenia licznych prac badawczych dotyczących białek jaja. Już Fleming i Allison [12] stwierdzili, że zmieszanie białka jaja z taką samą ilością żółtka obniżało jego antybakteryjne działanie. Cunningham i Cotterill [7] wykazali, że składniki żółtka jaja, a zwłaszcza lipowitelina inaktywują lizozym rozpuszczony w buforze fosforanowym o pH 6,2. Zastosowanie techniki chromatografii jonowymiennej do badania białka jaja zanieczyszczonego żółtkiem dostarczyło nowych informacji o zachodzących w nim zmianach. Na chromatogramach czystego białka jaja zarejestrowane były trzy piki lizozymu, a dla białka jaja zanieczyszczonego żółtkiem obserwowano tylko dwa piki lizozymu. Natomiast całkowity brak lizozymu w rozdziale chromatograficznym zanieczyszczonego żółtkiem białka stwierdził Parkinson [22]. Galyean i wsp. [15] przeprowadzili szereg testów, które potwierdziły, że żółtko już w ilości 10 % całkowicie inaktywuje lizozym w pierwszych minutach reakcji, ale po dłuższym czasie reakcji liza komórek nadal miała miejsce. Przy niższych wartościach pH odwirowanie białka zanieczyszczonego żółtkiem zwiększało aktywność lizozymu. Częściowe uaktywnienie lizozymu następowało również po dodaniu chlorku sodu i mocznika. Wskazuje to, że mechanizm obniżania aktywności lizozymu powodowany jest elektrostatycznymi oddziaływaniami pomiędzy enzymem a składnikami żółtka. Połączenie polimerowe  $\beta(1-4)$  N-acetylo-glukozaaminowe jest substratem lizozymu. Polisacharydowe pentamery i wyższorzędowe polimery są łatwo rozszczepiane przez lizozym, lecz monomery, dime-

ry, trimery i tetramery są inhibitorami dla lizozymu [24]. Inne substancje inaktywizujące lizozym, z którymi enzym łatwo tworzy związki kompleksowe nawet w środowisku naturalnym to białka jaja takie jak owomucyna [6], konalbumina [10], owoalbumina [9].

Wielu autorów badało również wpływ kationów na aktywność lizozymu. Stwierdzono, że wielowartościowe kationy znajdujące się w roztworze, takie jak dwuwartościowy kobalt [20], magnez [14], rtęć [26] i miedź [11] obniżają enzymatyczną aktywność lizozymu ale tylko w relatywnie wysokich stężeniach ( $10^{-3}$ – $10^{-2}$  M), natomiast jod już w małych stężeniach nieodwracalnie inaktywuje lizozym w kwaśnym lub neutralnym środowisku [24]. Według McDonalda i Philipa [20] jony metali prawdopodobnie łączą się z grupami karboksylowymi Glu-35 i Asp-52 inaktywując w ten sposób centrum aktywne lizozymu.

## Podsumowanie

Ostatnie lata przyniosły wiele informacji o lizozymie, jego budowie i metodach oznaczania. Wyjaśniono jego skład aminokwasowy i strukturę przestrzenną. Działania te spowodowały wzrost zainteresowania praktycznym wykorzystaniem enzymu. W pracy dokonano przeglądu informacji dotyczących budowy lizozymu oraz jego aktywności. Enzym charakteryzuje się dużą stabilnością w środowisku kwaśnym, lecz szybko ulega inaktywacji w środowisku zasadowym. Alkohole nie powodują denaturacji enzymu, natomiast stabilizują go cukry, poliole i chlorek sodu. Niektóre aminokwasy jak histydyna i lizyna wpływają na wzrost aktywności lizozymu. Podobne działanie wykazują również niektóre przyprawy jak np. pieprz. Natomiast kompleksy lizozymu z niektórymi substancjami takimi jak składniki żółtka i białka jaja obniżają aktywność enzymu. Substancjami obniżającymi aktywność lizozymu są również polisacharydowe monomery, dimery, trimery i tetramery oraz wielowartościowe kationy.

## LITERATURA

- [1] Back J.F., Oakenful D., Smith M.B.: *Biochemistry*, **18**, 1979, 5191.
- [2] Baker L.J., Hansen A.M.F., Rao P.B., Bryan W.P.: *Biopolymers*, **22**, 1983, 1637.
- [3] Beychok S., Warner R.C.: *Journal of American Chemical Society*, **81**, 1959, 1892.
- [4] Canfield R.E.: *Journal Biol. Chem.*, **238**, 1963, 2698.
- [5] Chang K.Y., Carr C.W.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **229**, 1979, 496.
- [6] Cotterill O.J., Winter A.R.: *Poultry Science*, **34**, 1954, 679.
- [7] Cunningham F.E., Cotterill O.J.: *Poultry Science*, **50**, 1971, 1013.
- [8] Cunningham F.E., Lineweaver H.: *Food Technology*, **19**, 1965, 136.
- [9] Cunningham F.F., Lineweaver H.: *Poultry Science*, **66**, 1967, 1472.
- [10] Ehrenpreis S., Warner R.C.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **61**, 1956, 187.
- [11] Feeney R.E., Macdonnel L.R., Ducaey E.D.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **61**, 1956, 72.
- [12] Fleming A., Allison V.D.: *Lancet*, **206**, 1924, 1303.

- [13] Frasco C.B., Karmas E., Gilbert S.G.: *Internat. Cong. of Food Science Technical Abstracts*, 1978, 170.
- [14] Gallo A.A., Swift T.J., Sable J.Z.: *Biochemical and Biophysical Research Com.*, **43**, 1971, 1232.
- [15] Galyean R.D., Cotterill O.J., Cunningham F.E.: *Poultry Science*, **51**, 1972, 1346.
- [16] Gorini L. Felix F.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **10**, 1953, 128.
- [17] Klotz I.M., Walker E.M.: *Archives of Biochemistry and Biophysics Acta*, **18**, 1948, 319.
- [18] Kravchenko N.A., Kaganamowa K.A., Kuniecow Y.D.: *Biokhimiia*, **32**, 1967, 618.
- [19] Matsuoka Y., Hidaka Y., Yashima M.: Patent japoński Nr 41-150, 1966.
- [20] McDonald C.C., Philips W.D.: *Biochemical and Biophysical Research Commun.*, **35**, 1966, 43.
- [21] Panfil-Kuncewicz H.: *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, **15**, 1988, 218.
- [22] Parkinson T.L.: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **18**, 1967, 208.
- [23] Philips D.C.: *Organic Chemistry of Life*, red. M. Calvin, W.A. Pryor, Freeman & Co., San Francisco, 1966
- [24] Proctor V.A., Cunningham F.E.: *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **26**(4), 1988, 359.
- [25] Proctor V.A. Cunningham F.E.: *Proceedings of the 4th European Symposium on: The Quality of Eggs and Egg Products*, Doorwerth, Netherlands, 1991, s. 201.
- [26] Ting D.C.Y., Schrier E.E.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25**, 1977, 158.
- [27] Tribout M., Leonis J.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **405**, 1975, 82.
- [28] White A., Handler P., Smith E.L., Hill R. L. Lehman I. R.: *Principles of Biochemistry*.
- [29] Yashitake S., Shinichiro A.: *New Food Industry*, **19**, 1977, 17.

## STRUCTURE AND CHARACTERISTIC OF LYZOZYME (MURAMIDASE)

### S u m m a r y

In the paper the structure of lysozyme (muramidase) and factors affecting lysozyme activity (temperature, chemicals and complexes) were reviewed. Lysozyme has been found to be heat stable in acidic solutions, but to be inactivated quickly in alkaline conditions. Sugar, salt, polyols, some amino acids and spices stabilized lysozyme. Enzyme complexes with egg yolk and some eeg-white components and polyvalent cations inactivated lysozyme. ☒