

Received: 2014.03.19  
Accepted: 2014.09.12  
Published: 2014.12.21

## Lizozym – występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań

### Lysozyme – occurrence in nature, biological properties and possible applications

Ewa Gajda<sup>1</sup>, Gabriela Bugla-Płoskońska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

#### Streszczenie

Lizozym to białko występujące u zwierząt, roślin, bakterii i wirusów. Znaleźć je można m.in. w ziarnach neutrofilów, makrofagów, a także w surowicy, ślinie, mleku, miodzie i w białku jaja kurzego. Enzym działa hydrolitycznie na wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowe znajdujące się między kwasem *N*-acetylmuraminowym (MurNAc) a *N*-acetylglukozaminą (GlcNAc) peptydoglikanu (PG) bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W królestwie zwierząt zidentyfikowano trzy postacie muramidazy: typ c (kurzy), typ g (gęsi) oraz typ i (obecny u bezkręgowców). Lizozym typu c z białka jaja kurzego jest obecnie modelem do badań nad jego strukturą i funkcją. Aktywność bakteriobójczą muramidaza wykazuje głównie wobec bakterii Gram-dodatnich. Jej działanie cytolityczne na komórki bakterii Gram-ujemnych nie jest w pełni wyjaśnione. Bakterie wykształciły mechanizmy obronne pozwalające im na uniknięcie działania lizozymu. Polegają one m.in. na wytwarzaniu inhibitorów enzymu lub na modyfikacji PG. Lizozym należy do jednych z najlepiej zbadanych enzymów, a mimo to wciąż nie wszystkie aspekty charakteryzujące to białko zostały w pełni poznane. Niewyjaśnione kwestie dotyczące jego biologicznej funkcji to rola muramidazy w procesie bakteriobójczego działania surowicy wobec bakterii Gram-ujemnych. Do jej wyjaśnienia jest stosowana m.in. metoda polegająca na usunięciu lizozymu z surowicy przez adsorpcję na bentonicie (montmorylonit, MMT). Z wykorzystaniem technik dyfraktometrii rentgenowskiej wykazano, że MMT po kontakcie z surowicą ulega delaminacji. Na wyjaśnienie czekają także zagadnienia związane z fałdowaniem muramidazy oraz jego udziałem w powstawaniu amyloidoz.

#### Słowa kluczowe:

lizozym • muramidaza • bakteriobójcze działanie surowicy • montmorylonit

#### Summary

Lysozyme (LZ, muramidase, *N*-acetylmuramylhydrolase) is a protein occurring in animals, plants, bacteria and viruses. It can be found e.g. in granules of neutrophils, macrophages and in serum, saliva, milk, honey and hen egg white. The enzyme hydrolyzes the  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds between *N*-acetylmuramic acid (NAM) and *N*-acetylglucosamine (NAG) of cell wall peptidoglycan (PG) in Gram-positive and Gram-negative bacteria. In the animal kingdom, three muramidase types have been identified: the c-type (chicken type), the g-type (goose-type) and the i-type (invertebrates). The c-type LZ from hen egg white is a model for the study of protein structure and function. Muramidase shows bactericidal activity mainly against Gram-positive bacteria. Cytolytic activity against cells of Gram-negative bacteria has not been proved. Bacterial cells have developed defense mechanisms that allow them to avoid the action of LZ. They are based e.g. on the production of enzyme inhibitors or modification of the PG. LZ is one of the most studied enzymes and yet not

all aspects characterizing this protein are fully understood. One of the most important unresolved issues concerning the biological function of LZ is the role of muramidase in the bactericidal action of serum against Gram-negative bacteria. In order to clarify the function of LZ, the enzyme is e.g. removed from the serum by adsorption onto bentonite (montmorillonite, MMT). By using X-ray diffraction techniques it has been shown that MMT after contact with the serum is delaminated. The problems associated with folding of muramidase and LZ participation in the development of amyloidoses also await explanation.

**Key words:** lysozyme • muramidase • bactericidal action of serum • montmorillonite

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1133100>

**Word count:** 6949

**Tables:** 2

**Figures:** 1

**References:** 105

**Adres autorki:** mgr Ewa Gajda, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, ul. S. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: ewa.gajda@uni.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **EC** – Komisja Enzymatyczna (Enzyme Commission); **EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ethylenediaminetetraacetic acid); **GEWL** – lizozym białka jaja gęsiego (goose egg white lysozyme); **GlcNAc** – N-acetyloglukozamina (N-acetylglucosamine, NAG); **IUBMB** – Międzynarodowa Unia Biochemii i Biologii Molekularnej (International Union of Biochemistry and Molecular Biology); **HEWL** – lizozym białka jaja kurzego (hen egg white lysozyme); **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (high-performance liquid chromatography); **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide); **LZ** – lizozym, muramidaza, N-acetylmuramylohydrolaza (lysozyme, muramidase, N-acetylmuramylhydrolase); **MMT** – bentonit, montmorylonit (bentonite, montmorillonite); **MurNAc** – kwas N-acetylmuraminowy (N-acetylmuramic acid, NAM); **NaCl** – chlorek sodu (sodium chloride); **NSL** – normalna surowica ludzka (normal human serum); **NSP** – normalna surowica pępowinowa (normal cord serum); **OatA** – O-acetylotransferaza (O-acetyltransferase); **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (polymerase chain reaction); **PG** – peptydoglikan (peptidoglycan); **SAXS** – małokątowa dyfraktometria rentgenowska, dyfraktometria niskokątowa (small-angle X-ray scattering); **T4L** – lizozym bakteriofaga T4 (bacteriophage T4 lysozyme); **WAXS** – szerokokątowa dyfraktometria rentgenowska, szerokokątowe rozpraszanie rentgenowskie (wide-angle X-ray scattering); **WTA** – kwasy tejchojowe (wall teichoic acid)

## WPROWADZENIE

Szkocki bakteriolog, Aleksander Fleming (1881-1955) jest znany głównie z odkrycia penicyliny. Jednak w 1921 r., zaobserwował, że kropla śluzu z nosa, która przypadkowo spadła na płytkę z podłożem agarowym, spowodowała liżę rosnących na nim bakterii. To zdarzenie doprowadziło badacza do odkrycia bakteriologicznego czynnika, któremu w 1922 r. nadał nazwę: lizozym [13,30,96].

Pierwsze badania nad lizozymem (LZ, muramidaza, N-acetylmuramylohydrolaza) sięgają jednak jeszcze wcześniejszego okresu, bo aż 1909 roku, kiedy to Pavel Laschtschenko analizował bakteriobójczą aktywność białka jaja kurzego i stwierdził, że jest spowodowana działaniem enzymu [78]. Działanie lityczne białka jaja na komórki *Bacillus subtilis* ustalono pod mikroskopem, określono również wpływ białek obecnych w jajach kręgowców na inne

komórki bakterii – *Bacillus* spp. i *Proteus* spp. Już Fleming uważał, że silna bakteriologiczna substancja zdolna do wywołania szybkiej liży komórek gęstej zawiesiny niektórych bakterii, jest szeroko rozpowszechniona w naturze. Obecnie wiadomo, że występuje we łzach, śluzie nosa, ślinie, surowicy krwi, w wielu tkankach i wydzielinach pochodzenia zwierzęcego oraz w białku jaj. Ze wszystkich przebadanych materiałów to właśnie białko jaja kurzego stanowiło najbogatsze źródło lizozymu. A. Fleming wyizolował także Gram-dodatnie bakterie, które nazwał *Micrococcus lysodeikticus* („wskaźnik liży”), będące jak się okazało, szczególnie wrażliwe na lityczne działanie lizozymu. Jego badania przyczyniły się do ustalenia terminu przyjętego obecnie dla bakteriologicznej substancji, wniosły także wiele informacji o jej występowaniu w przyrodzie. Wynikiem badań prowadzonych przez Fleminga było również opisanie organizmu najlepiej nadającego się do badań nad lizozymem – *M. lysodeikticus* [78,96].

Jednak enzym ten okazał się w ówczesnych czasach bezużyteczny leczniczo, ponieważ nie znalazł zastosowania, jako bezpośrednia substancja bakteriobójcza przeciwko wielu poważnym chorobom nękającym człowieka. Dlatego nie był początkowo uważany za czynnik o podstawowym znaczeniu antybakteryjnym. Po upływie prawie 80 lat, białko to zaczęło służyć jako model do badań nie tylko w mikrobiologii i medycynie, ale także w enzymologii, kryształografii i biologii molekularnej. Jego rola w obronie przed bakteriami Gram-dodatnimi atakującymi zwierzęta została dobrze poznana, a zastosowanie jako środka konserwującego w żywności nadało mu dodatkową wartość użyteczną. Jednak należy wspomnieć, iż wiele aspektów dotyczących biologicznej funkcji lizozymu nadal nie jest w pełni poznanych [13].

### BUDOWA LIZOZYMU

Lizozym (LZ, muramidaza, N-acetylmuramylohydrolaza) należy do układu nieswoistej, humoralnej odpowiedzi immunologicznej [18,27,30,73]. EC 3.2.1.17 to numer EC (Enzyme Commission, Komisja Enzymatyczna) przypisany do LZ według zasad klasyfikacji enzymów opracowanej przez Komitet Nazewnictwa (Nomenclature Committee) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) [25]. Muramidaza występuje u zwierząt, roślin oraz wirusów. Znaleźć ją można w ziarnach neutrofilów, makrofagów i monocytów, również w osoczu krwi, łzach, ślinie oraz wydzielinach śluzowo-surowiczych dróg oddechowych. Występuje również w mleku, miodzie i w białku jaja kurzego. We krwi zdrowego człowieka stężenie LZ zawiera się w przedziale 0,5-2,0 µg/ml, natomiast w ślinie 2,0-5,0 µg/ml [27,30].

Muramidaza jest białkiem występującym w postaci pojedynczego łańcucha peptydowego utworzonego ze 129 reszt aminokwasowych, którego masa cząsteczkowa wynosi 14,4 kDa. W swej budowie nie zawiera grupy prostetycznej. Cztery mostki disiarczkowe stabilizują strukturę natywną LZ. Kształt cząsteczki jest prawie elipsoidalny o wymiarach 4,5 × 3,0 × 3,0 nm. Wiele reszt argininy obecnych w łańcuchu polipeptydowym muramidazy, nadaje jej ogólny ładunek dodatni. Struktura trzeciorzędowa enzymu jest podzielona na dwie domeny przez głęboką szczelinę zawierającą miejsce aktywne, wiążące substrat. Jedna domena składa się głównie ze struktur β, druga natomiast zawiera helisy α. W reakcje enzymatyczne są zaangażowane dwie reszty aminokwasowe: kwasu glutaminowego (Glu35) oraz kwasu asparaginowego (Asp52). Są umiejscowione po przeciwnych stronach szczeliny wiążącej substrat. Proces rozszczepiania wiązania glikozydowego wymaga także udziału cząsteczki wody. Muramidaza ma spoiwą budowę dzięki zgromadzeniu grup hydrofobowych w środku cząsteczki, a wyeksponowaniu grup polarnych na zewnątrz. Samo związanie substratu zachodzi za pomocą sił van der Waalsa i towarzyszy mu zmniejszenie szczeliny [2,13,22,49]. Należy dodać, że jęczmienna chitynaza, bakteryjna chitozanaza, LZ białka jaja gęśiego (goose egg white lysozyme, GEWL), LZ

bakteriofaga T4 (T4L) i LZ białka jaja kurzego (hen egg white lysozyme, HEWL) – wszystkie hydrolizują podobne polisacharydy. Białka te nie wykazują istotnych podobieństw w składzie aminokwasowym, ale mają strukturalnie niezmienny rdzeń, składający się z dwóch helis i trzech nici beta-kartki, które formują wiążącą substrat i katalityczną szczelinę. Enzymy te reprezentują nadrodzinę hydrolaz, która prawdopodobnie powstała na skutek ewolucji dywergentnej. Na podstawie strukturalnych kryteriów Monzingo i wsp. podzielili tę nadrodzinę na rodzinę bakteryjną (chitozanaza i T4L) i eukariotyczną (chitynaza, GEWL). HEWL jest bardziej powiązany z rodziną eukariotyczną niż z rodziną bakteryjną [62]. Przedstawiciele obu wspomnianych rodzin mają w strukturze białka wspólny rdzeń, ale zawierają różne N- i C-terminalne domeny [62].

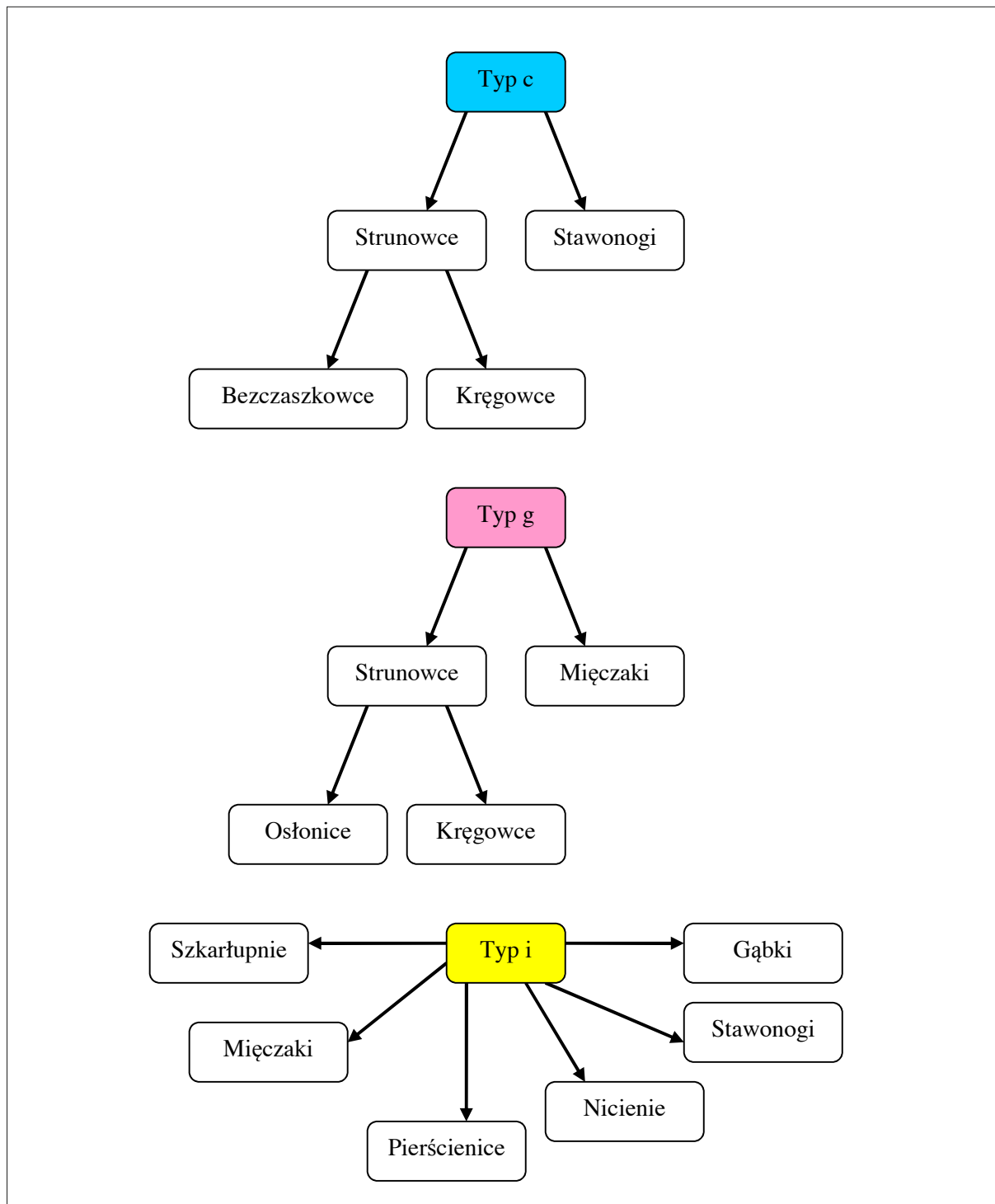
W królestwie zwierząt występują trzy główne postaci LZ: typ c opisany jako kurzy (chicken, conventional type), typ g opisany jako gęsi (goose-type) oraz typ i obecny u bezkręgowców (invertebrate type) [13,31]. Typ c LZ stwierdzono również u bezczaszkowców i stawonogów, typ g u osłonik i mięczaków. Natomiast typ i występuje u szkarłupni, mięczaków, pierścienic, nicieni, stawonogów oraz gąbek (ryc. 1). Modelem do badań nad strukturą i funkcją enzymatyczną jest muramidaza typu c z białka jaja kurzego. Ten rodzaj LZ jest wytwarzany przez większość kręgowców, w tym ssaki [13].

Marsich i wsp. opisali nowy gen bakterii *Helicobacter pylori*, którego ekspresja prowadzi do powstania autolitycznego enzymu zdolnego do degradacji ściany komórkowej Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii [56]. Badacze nadali mu nazwę *lys*. Zaobserwowano jego ekspresję u wielu niespokrewnionych szczepów klinicznych bakterii, co sugeruje, iż jest on konserwatywny u gatunku *H. pylori*. Porównanie nukleotydowej sekwencji *lys* i genu *HP0339 H. pylori* ATCC 26695 ujawniło niemal całkowitą ich identyczność z wyjątkiem obecności 24-nukleotydowej „wstawki” w sekwencji genu *lys*. Kodujące sekwencje *lys* i *HP0339* wykazały natomiast wysoki stopień homologii z kodującą sekwencją genu LZ bakteriofaga T4.

Aby dane białko można było zaklasyfikować, jako nową postać muramidazy, musi spełniać następujące kryteria:

- niska masa molekularna,
- stabilność w kwaśnym pH,
- inaktywacja pod wpływem warunków zasadowych,
- powodować lizę komórek *M. lysodeikticus* [70,80].

LZ jest prawdopodobnie jednym z najlepiej zbadanych enzymów hydrolitycznych (tab. 1). Rentgenograficznie oznaczona struktura molekularna HEWL ogłoszona w 1965 r. [5] była pierwszą strukturą 3D określoną dla molekuly enzymu. Od tego czasu muramidaza służy, jako model do badań procesu fałdowania białek, katalizy enzymatycznej, kryształografii i ewolucji enzymów. Co więcej, ludzki LZ wzbudził ostatnio znaczne zainteresowanie, jako białko amyloidogenne [23].



Ryc. 1. Występowanie różnych typów lizozymu w królestwie zwierząt (na podstawie [13] zmodyfikowano)

Amyloidozy są grupą chorób, które łączy wspólna cecha: pozakomórkowe złogi patologicznych, nierozpuszczalnych białek włóknkowych, odkładających się w jednym bądź też wielu tkankach i narządach. Odkładające się białka tworzące włókienka amyloidu są wynikiem dziedziczonych autosomalnie dominująco amyloidoz rodzinnych. Najczęściej występującą postacią amyloidozy wywołuje zmutowana trans-

tyretyna (rodzinna amyloidoza transtyretynowa). Transtyretyna to białko transportujące tyroksynę oraz wiążące retinol. Jednak zmiany w strukturze apolipoproteiny A-I, gelsoliny, fibrynogenu A $\alpha$  i co ważne – LZ, także są przyczyną amyloidozy. W przypadku mutacji dotyczącej muramidazy, zajmowane złogami białek włóknkowych pozostają nerki, wątroba i śledziona [37].

Tabela 1. Chronologia badań nad lizozymem

Przykłady badań nad strukturą lizozymu	Autorzy
Rentgenograficznie oznaczona struktura 3D HEWL	[5]
Struktura krystaliczna zmutowanej cząsteczki HEWL	[34]
Wpływ temperatury na strukturę LZ	[44]
Struktura GEWL	[95]
Struktura krystaliczna LZ w zależności od stopnia uwodnienia enzymu	[65]
Wpływ sacharozy, sorbitolu i trehalozy na strukturę LZ	[17]
Zmiany w strukturze HEWL pod wpływem działającego ciśnienia	[75]
Analiza krystalograficzna HEWL w obecności alkoholi	[20]
Struktura krystaliczna białka Ivy (inhibitora LZ u bakterii Gram-ujemnych) w kompleksie z HEWL	[1]
Struktura LZ TJL (należącego do typu i) w kompleksie z trimerem N-acetyloglukozaminy	[32]
Struktura krystaliczna HEWL	[89]

Badania struktury enzymu są wymagane do szczegółowego zrozumienia właściwości białka w skali molekularnej lub atomowej. Chemiczna synteza białka jest ważnym i przydatnym narzędziem, ponieważ umożliwia niemal absolutną kontrolę nad kowalencyjną strukturą molekuly enzymu. Próby chemicznej syntezy muramidazy o pełnej długości były podejmowane bezskutecznie już od 1970 r. [39,84]. Dopiero niedawne badania [23] pozwoliły na całkowitą chemiczną syntezę ludzkiego LZ. Syntetyczne białko o dużej czystości i zachowanej aktywności enzymatycznej uzyskano w znacznej ilości. Opracowana metoda umożliwi wytworzenie unikalnych chemicznych analogów muramidazy i jak się uważa znajdzie w przyszłości zastosowanie w wielu dziedzinach badań nad LZ.

### MECHANIZM DZIAŁANIA LIZOZYMU

Enzym działa litycznie w stosunku do ściany komórkowej bakterii. Jego aktywność powoduje rozszczepianie w peptydoglikanie (PG) wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych znajdujących się między atomem C-1 kwasu N-acetylmuraminowego (MurNac) a atomem C-4 N-acetyloglukozaminy (GlcNac). LZ prowadzi więc do rozkładu mureiny na disacharydy GlcNac-MurNac [13,22,27,30]. Aktywność bakteriobójczą muramidaza wykazuje głównie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, a jej cytolityczne działanie na komórki bakterii Gram-ujemnych nie zostało w pełni poznane [27,30,98]. Enzym hydrolizuje również wiązania glikozydowe obecne w chitynie [31].

Dodanie muramidazy do zawiesiny komórek bakterii Gram-dodatnich powoduje szybkie jej przejście. Bakterie *M. luteus* (*M. lysodeikticus*) są poddawane lizie już przy stężeniu LZ wynoszącym 1  $\mu$ g/ml. Spektrofotometryczny pomiar zmiany absorbancji zawiesiny bakterii *M. lysodeikticus* w badanym roztworze wykorzystuje się do oznaczania aktywności enzymatycznej LZ [73,85].

Tabela 2. Zakres działania lizozymu wobec bakterii, wirusów i grzybów

Przykłady organizmów, względem których lizozym wykazuje aktywność	Autorzy
Bakterie Gram-dodatnie <i>Bacillus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Micrococcus</i> <i>Sarcina</i> <i>Streptococcus</i>	[41]
Bakterie Gram-ujemne <i>Salmonella</i> <i>Brucella</i> <i>Klebsiella</i> <i>Shigella</i> <i>Neisseria</i> <i>Escherichia</i>	[41,71,79,88]
Wirusy HIV-1	[46]
Grzyby <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Pythium aphanidermatum</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Candida albicans</i>	[54,55,90]

Muramidaza działa, według doniesień literaturowych, również wobec niektórych gatunków grzybów [54,55,90], a także wpływa hamująco na aktywność wirusa HIV-1 (tab. 2) [46]. Enzym ma ponadto właściwości przeciwnowotworowe [81]. Ostatnie badania [38,45] wskazują natomiast, iż LZ występujący u komarów (*Anopheles gambiae*, *Anopheles dirus*) ułatwia u tych żywicieli rozwój pasożytniczych pierwotniaków z rodzaju *Plasmodium*, będących czynnikami etiologicznymi malarii. Lizozym typu c-1 występujący u *A. gambiae* wiąże się do oocyst *Plasmodium*. Wyciszenie genu *LYSC-1* u tych komarów znacznie zmniejsza intensywność



zarażenia i częstość występowania pasożytniczych pierwotniaków. Podobne wyniki uzyskano dla *A. dirus*, u którego wyciszenie genu *AdLys c-1* spowodowało redukcję liczby oocyst *Plasmodium*.

Na lityczne działanie LZ wpływają: temperatura, pH i stężenie chlorku sodu (NaCl) w środowisku. Zwiększenie aktywności litycznej enzymu odnotowano przy temperaturze wzrastającej do 60°C. Wartość pH, przy której obserwuje się maksymalną lizę komórek *M. lysodeikticus* zawiera się między 6,0 a 7,0. Niewielka liza komórek bakterii obserwowana jest natomiast przy nieobecności NaCl w środowisku. Na podatność bakterii na aktywność muramidazy wpływają też warunki hodowli. Każdy czynnik działający na stabilność struktury powierzchni komórki (ściany komórkowej i błony protoplazmatycznej) lub każda substancja blokująca interakcję LZ z jego substratem (np. kwaśne polimery), zmienia wynik litycznej aktywności enzymu [78].

O tym, że muramidaza jest bardzo stabilna w kwaśnych roztworach świadczy to, iż ogrzewanie do temperatury 100°C w pH nieprzekraczającym 8,5 nie powoduje utraty aktywności enzymatycznej. Stopniowa inaktywacja LZ występuje natomiast powyżej pH 9,0. Stabilność termiczna w dużej mierze warunkują obecne w cząsteczce cztery mostki dwusiarczkowe. W roztworach o niewielkiej sile jonowej i pH w zakresie 5,0-9,0 możliwa jest dimeryzacja enzymu, powyżej 9,0 może nawet nastąpić oligomeryzacja [31].

Działanie muramidazy na komórki bakterii zależy od fazy wzrostu hodowli bakteryjnej. Wrażliwość komórek *Lactobacillus fermenti* na działanie LZ jest największa podczas wykładniczej fazy wzrostu tych bakterii. Komórki *L. fermenti* pochodzące ze stacjonarnej fazy wzrostu są odporne na działanie muramidazy. Ponadto komórki z wczesnej fazy stacjonarnej do optymalnej aktywności muramidazy wymagają wyższej temperatury, niż te będące w fazie wzrostu wykładniczego. Chemiczna modyfikacja PG, która występuje podczas przejścia bakterii Gram-dodatnich z fazy wzrostu wykładniczego do fazy stacjonarnej może wyjaśniać zwiększoną ich odporność na LZ. Modyfikacje mogą być różnego typu, np. obecność grup O-acetylowych w PG, brak grup N-acetylowych w PG, przyłączenie kwasów teichojowych do PG lub występowanie wolnych grup aminowych w części peptydowej PG [66].

LZ był długo uznawany za enzym, który ma małe znaczenie w odporności przeciwbakteryjnej, ponieważ tylko nieliczne organizmy wydawały się bezpośrednio wrażliwe na jego działanie. Okazało się jednak, że muramidaza, oprócz dobrze znanej aktywności wobec niektórych szczepów *Bacillus* i *Micrococcus*, działa także na większość *Enterobacteriaceae*. Na komórki Gram-ujemne LZ nie działa jednak bezpośrednio, ale są one na niego podatne, jeżeli będą zastosowane dodatkowe czynniki, np. EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), wysokie pH czy polimyksyna. Wpływ różnych czynników wspomagających działanie LZ, polega prawdopodobnie na dezorganizacji lipoprotein ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, co w rezultacie umożliwia dostęp enzymu do substratu [67,68,76,77,91,93].

Działanie EDTA lub LZ powoduje lizę bakterii *Vibrio succinogenes*, ale tylko wtedy, jeśli komórki są zawieszony w środowisku hipotonicznym przy zasadowym pH. Działanie LZ na mrożone i rozmrażane bakterie nie powoduje dużej utraty makromolekuł z komórki. Traktowanie komórek muramidazą w neutralnym pH oraz w obecności EDTA, powoduje tworzenie się z nich form kulistych (protoplastów), które jednak nie tracą wiele swoich komponentów komórkowych. Możliwe, że zarówno rozmrażanie jak i zamrażanie oraz użycie EDTA przy neutralnym pH, ułatwiają działanie LZ na mukopeptyd bakteryjny [99].

Bakteriobójcza aktywność normalnej surowicy ludzkiej (NSL), przypuszczalnie wymaga współdziałania LZ i układu dopełniacza (komplementu). Układ dopełniacza może więc działać tak jak EDTA, przygotowując miejsce docelowe dla działania LZ przez dezintegrację błony zewnętrznej [91].

W latach 50. XX w. Warren i wsp. przeprowadzili badania mające na celu określenie wpływu temperatury i acetonu na działanie LZ wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* [92]. Pomiar zmętnienia ogrzewanej zawiesiny komórek *P. aeruginosa* w buforze fosforanowym (pH 7,0) zawierającym LZ wykazał lizę bakterii, ale jej stopień był mniejszy w temperaturze 100°C w czasie 10 min od obserwowanej w temperaturze 60°C w czasie 1 godziny. Dodanie muramidazy do zawiesiny pałeczek *P. aeruginosa* uprzednio traktowanych acetonem jeszcze bardziej działało litycznie niż po zastosowaniu ogrzewania komórek bakterii. Natomiast dodanie LZ do ogrzanych i traktowanych acetonem pałeczek *P. aeruginosa* spowodowało znacznie większą ich lizę od obserwowanej bez dodania muramidazy. Warren i wsp. uznali więc, że komórki *P. aeruginosa*, które były uprzednio ogrzane lub traktowane acetonem ulegają lizie spowodowanej działaniem LZ [92]. Również wiele innych traktowanych wcześniej acetonem bakterii Gram-ujemnych (włączając w to niektóre patogenne gatunki), ulega lizie pod wpływem działania LZ. Możliwe, że ogrzewanie lub stosowanie acetonu jest niezbędne w procesie lizy, ponieważ sprawia, że substrat w ścianie komórkowej dla enzymu staje się bardziej dostępny. Prawdopodobnie aceton wpływa na zwiększenie wrażliwości komórek *P. aeruginosa* na działanie muramidazy przez jego oddziaływanie na lipidy błony zewnętrznej tych bakterii. Badacze zaobserwowali także, że LZ jest aktywny w szerokim zakresie pH – 5,0-9,0. Stwierdzili również, iż enzym wykazuje silniejsze działanie w 37 lub 50°C niż w 24°C, a żadnej lizy komórek nie odnotowuje się w 4°C. Te obserwacje są zgodne z podobnymi wykazanymi dla bakterii *M. lysodeikticus* [92].

## WYSTĘPOWANIE LIZOZYMU U KRĘGOWCÓW

### Ryby

Muramidaza u ryb, podobnie jak u innych kręgowców, odgrywa ważną rolę w mechanizmach obronnych gospodarza przed infekcjami. LZ u tych zwierząt występuje głównie w tkankach bogatych w leukocyty. Znaleźć go można na skórze, w skrzelach, w przewodzie pokarmowym, a więc w miejscach, gdzie ryzyko inwazji bakteryjnej jest duże. Muramidaza ryb w odróżnieniu od ssaczej ma

istotną antybakteryjną aktywność nie tylko względem Gram-dodatnich bakterii, ale również wobec Gram-ujemnych, nawet w przypadku braku aktywności układu dopełniacza. LZ może również uczestniczyć w zapobieganiu pionowej (wertikalnej – z matki na potomstwo) transmisji niektórych patogenów ryb, choć jego działanie nie przyczynia się do zabicia komórek np. bakterii *Renibacterium salmoninarum*, które wywołują choroby nerek u tych kręgowców [102].

Aktywność enzymatyczna LZ może się zmieniać w zależności od płci ryb, ich wieku, pory roku, temperatury wody, pH, występujących infekcji oraz stopnia nasilenia czynników stresowych [80]. Pstrąg tęczy (*Oncorhynchus mykiss*) w warunkach stresu wywołanego dużym zanieczyszczeniem wody ma zmniejszone stężenie LZ w surowicy. Zwiększoną aktywność enzymu w surowicy obserwowano natomiast u karpia (*Cyprinus carpio*) zainfekowanego bakteriami *Aeromonas punctata* bądź narażonego na inwazję pierwotniakami *Eimeria subepithelialis* [102]. Stężenie LZ w surowicy u jednego z gatunków karpia jest wyższe w porach letnich i deszczowych, ale niższe w sezonie zimowym, co wskazywać może na większą podatność tych ryb na zakażenia w okresie zimowym [80].

Niektóre gatunki ryb zawierają typ g muramidazy w miejscach narażonych na wpływy środowiska i/lub zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną, takich jak: skrzela, jelito czy wątroba [87].

## Płazy

Lizozym u płazów został wykryty podczas badań [64] prowadzonych nad etiologią jednego z nowotworów u żab leopardowych (*Rana pipiens*). Zauważono, że organy dorosłych zdrowych osobników tych żab zawierają enzymy bakteriolityczne. Po przeprowadzeniu dodatkowych testów okazało się, że enzymy te stanowią osiem form LZ. Wszystkie te izoenzymy muramidazy wykryto w nerkach badanych zwierząt, natomiast wątroba oraz śledziona zawierała siedem form, skóra sześć, jajnik pięć, a surowica tylko dwie. Największe stężenie LZ stwierdzono w śledzionie, a następnie w nerkach, wątrobie, skórze i jajniku. Surowica zawierała bardzo niewielkie ilości enzymu. Pod względem największej aktywności muramidazy w określonym narządzie – jajnik zajmował najwyższą pozycję [70].

## Gady

Na temat LZ u gadów zgromadzone dotychczas informacje są niewielkie. Wyizolowano i scharakteryzowano muramidazę z białka jaja, ale nie wiadomo czy jest obecna w innych tkankach. Niemniej jednak enzymy te są uważane za ważne czynniki uczestniczące w interakcji z bakteriami. Zasugerowano, że brak ich litycznej aktywności u gadów wobec komórek *Aeromonas hydrophila* może się przyczynić do zwiększonej ich zjadliwości w omawianej grupie kręgowców. Bez bezpośrednich dowodów doświadczalnych stwierdzenie to pozostaje jednak nadal tylko przy-

puszczeniem. Wśród innych badanych szczepów bakterii Gram-ujemnych, *Vibrio cholerae* był najbardziej podatny na działanie LZ gadów, a *P. aeruginosa* miał niewielką wrażliwość [13]. U gadów enzym wykryto u jaszczurek i kilku gatunków żółwi. LZ żółwia *Trionyx gangeticus* wykazuje podobne enzymatyczne właściwości, co LZ kurzy. Porównanie muramidaz pochodzących z takich gatunków gadów jak: żółwiak chiński (*Pelodiscus sinensis*), żółwiak sundajski (*Amyda cartilaginea*) oraz żółw zielony (*Chelonia mydas*) doprowadziło do stwierdzenia, że każda z nich miała różną lityczną aktywność przeciwko kilku szczepom zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych bakterii. Żaden z LZ nie był natomiast skutecznym wobec szczepów, które były patogenne dla gadów [105].

## Ptaki

LZ u ptaków można znaleźć przede wszystkim w ich jajach. Niektóre białka jaj tych zwierząt zawierają tylko muramidazę typu g (np. u gęsi rasy emden), inne tylko LZ typu c (np. u kury), ale też zdarza się, że w ich skład mogą wchodzić oba typy enzymu (występujące np. u czarnego łabędzia) [13]. Porównując LZ kurzy i gęsi, enzym kurzy ma kilkakrotnie mniejszą aktywność od gęsiego w swym działaniu litycznym na ściany komórek bakterii [31].

## Ssaki

Spośród ssaków, szczególną uwagę należy zwrócić na grupę przeżuwaczy, u których rodzina genów kodujących LZ prawdopodobnie występowała już 40-50 mln lat temu, a rozdział jej dla różnych gatunków nastąpił około 25 mln lat temu. Dlatego też LZ wydaje się jednym z najstarszych i niezmiennych białek w tej grupie zwierząt. Należy jednak zaznaczyć, że u przeżuwaczy występuje niewielkie stężenie tego enzymu w surowicy krwi. Natomiast u takich zwierząt jak banteng (*Bos javanicus*) i lama (*Lama glama*) nie wykryto muramidazy w surowicy [29].

Aktywność enzymatyczna LZ u bydła jest zbliżona do występującej u koni i jednocześnie jest o 50-100% większa niż u psa. Ilość i aktywność enzymu w surowicy u wszystkich przeżuwaczy jest zależna od pory roku, stanu fizjologicznego oraz wieku zwierząt. Duże stężenie muramidazy stwierdzono we łzach kóz [7,19].

Stężenie LZ w surowicy określone u żubra (*Bison bonasus*) zawierało się w zakresie 2,10-6,40 µg/ml ze średnią wartością w przedziale 3,91-4,02 µg/ml ustaloną dla różnych grup badanych zwierząt. Nigdy nie osiągnęło poziomu 10 µg/ml, który jest wymagany do skutecznego przeprowadzenia procesu lizy. Sugeruje to, że niespecyficzna odporność żubra wobec patogennych bakterii oparta na zawartości muramidazy w surowicy musi być uznana za bardzo niską [29].

W odniesieniu do LZ występującego w surowicy świni, psa i bydła, LZ surowicy koni ma dwa razy większą aktywność. Jego ilość (podobnie jak u bydła) jest zależna od sezonu, rasy i stanu fizjologicznego zwierząt. W komórkach

polimorfonuklearnych psów, LZ występuje w podobnym stężeniu jak u świń [7,19].

Dimitrov i wsp. oznaczyli stężenie LZ w surowicy owiec w badaniach mających na celu określenie związku między wrażliwością zwierząt na stres a ilością muramidazy w surowicy [21]. Najwyższe stężenie enzymu występowało u owiec spokojnych (0,300 mg/ml), natomiast najniższe stwierdzono u zwierząt zaniepokojonych, zdenerwowanych (0,173 mg/ml). Wskazuje to, że muramidaza jest obecna u owiec w dużej ilości, ale na jej stężenie w surowicy mają wpływ różne czynniki, takie jak np. stres, które mogą znacznie obniżyć jej zawartość.

Typ g LZ ma u ssaków mniejsze znaczenie niż typ c. Ekspresja genu postaci g LZ jest swoista tkankowo i różni się między zwierzętami. U człowieka wykazano ją w komórkach nerki osób dorosłych zainfekowanych uropatogennymi szczepami bakterii *E. coli*, u myszy w języku i skórze, a u kur w jelicie [87].

#### FUNKCJE LIZOZYMU ZWIĄZANE Z MECHANIZMAMI NIEENZYMATYCZNYMI

Początkowo LZ definiowano tylko przez jego zdolność do lizy komórek niektórych bakterii. Nieenzymatyczny sposób działania LZ, jaki zaobserwowano na wczesnych etapach badań nad tym białkiem, polegał na aglutynacji komórek bakteryjnych. Muramidaza, wspólnie z innymi podobnymi komponentami, może być przyciągana przez negatywnie naładowane grupy na powierzchni komórki bakterii, których neutralizacja powoduje aglutynację. Ponadto wiele substancji, w tym proste syntetyczne związki powierzchniowo czynne i naturalnie występujące kwasowe polimery bakteryjnego pochodzenia, mogą się łączyć z LZ [78].

Według niektórych autorów cząsteczki LZ w warunkach *in vitro* mogą się przedostawać przez błony biologiczne zbudowane ze związków fosfatydyloglicerolu, fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy [63,103]. Inni badacze twierdzą [24], że najbardziej prawdopodobny mechanizm bakteriobójczej aktywności muramidazy polega na zaburzeniu struktury błony zewnętrznej bakterii. Właściwość ta, wykazana dla HEWL oraz T4L, została potwierdzona w doświadczeniach na bakteriach, grzybach oraz protoplastach ziemniaków, przy czym nie stwierdzono jej w teście hemolitycznym z użyciem komórek ssaczy [24].

Muramidaza ma istotne właściwości przeciwwzapalne [69]. Enzym hamuje chemotaksję aktywowanych leukocytów. Jest też zdolny do bezpośredniej modulacji kaskadowo przebiegających reakcji dopełniacza w czasie jego aktywacji. LZ, niektóre białka mleka oraz ligandy o niskiej masie molekularnej (np. cytryniany, fosforany), mają miejsca wiążące o dużym powinowactwie do wapnia i dlatego mogą być inhibitorami komplementu. Chelatują bowiem dwuwartościowe jony wymagane do aktywacji dopełniacza [69]. Jony wapnia są niezbędne do aktywacji drogi klasycznej komplementu [51].

Do innych właściwości LZ należy, przez uszkodzenie ścian komórkowych bakterii i fragmentowanie PG, inicjowanie powstawania przeciwciał, a także wiązanie się do DNA wirusów i tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów, co przyczynia się do ich inaktywacji [48].

Niedawno LZ został zidentyfikowany, jako białkowy feromon termitów. Stwierdza się jego występowanie w jajach i gruczołach ślinowych tych owadów. Ta nowa funkcja muramidazy podkreśla duży wpływ patogennych drobnoustrojów na ewolucję zachowań społecznych u termitów [59].

#### ZASTOSOWANIE LIZOZYMU W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

Muramidaza ma właściwości, które pozwalają na zastosowanie jej w celu konserwacji żywności. Stężenie LZ w białku jaja kurzego wynosi około 3,2 mg/ml, w mleku krowim prawie 0,13 µg/ml, a w ludzkiej sianie około 65 µg/ml. Kalafior zawiera około 27,6 µg/ml muramidazy, a kapusta około 2,3 µg/ml. Użycie więc takiego naturalnie obecnego w wielu produktach spożywczych LZ, w ilości zawierającej się w przedziale 10-100 µg/ml nie może stanowić zagrożenia toksykologicznego. Bakteriostatyczne i bakteriobójcze własności enzymu są dobrze zbadane, a w ciągu ostatnich lat pojawiają się nowe przykłady antybakteryjnych mechanizmów działania LZ, niezależnych od jego aktywności hydrolitycznej [58].

Komisja Ekspertów WHO/FAO ds. stosowania dodatków do żywności w 1992 r. uznała muramidazę za środek bezpieczny i zezwoliła na wykorzystanie jej przy produkcji i utrwalaniu żywności. Enzym jest stosowany w skali przemysłowej m.in. w Australii, Austrii, Belgii, Danii, Francji, Japonii, Niemczech i Włoszech [41]. LZ może być użyty, jako dodatek do przetworów, środek powlekający oraz jako składnik roztworów, którymi spryskuje się lub w których moczy się gotowe spożywcze wyroby [6].

W Japonii opatentowano procedury dotyczące utrwalania świeżych warzyw, owoców, ryb i mięsa przede wszystkim za pomocą pokrycia ich powierzchni LZ. Na przykład patent jednej z firm dotyczy sposobu przechowywania ostryg i krewetek w niskich temperaturach po uprzednim traktowaniu ich wodnym roztworem muramidazy i NaCl. Sposoby konserwacji z użyciem LZ zostały też opracowane dla takich typowych wschodnich potraw jak: sushi, sałatka japońska czy kluski chińskie [41].

W przemyśle serowarskim prowadzono dotąd najbardziej intensywne badania wiążące się ze stosowaniem LZ. Muramidazę używa się do produkcji serów dojrzewających w celu redukcji liczby bakterii kwasu masłowego, głównie *Clostridium tyrobutyricum*. Enzym przyczynia się także do poprawy cech sensorycznych sera, nie wpływając na proces produkcji i jego dojrzewanie [6,41,43,94]. LZ wykorzystano podczas produkcji sera edamskiego, gdzie wprowadzono go bezpośrednio do układu jeszcze przed dodaniem podpuszczki. Otrzymano pozytywny wynik mikrobiologiczny przy zastosowaniu LZ o aktywności 500 U/ml (co odpowiada dodatkowi białka jaja w ilości około 0,6%). Zarówno czysty enzym, jak i białko jaja kurzego wykazywały zbliżo-



ną efektywność [41]. Muramidaza jest także wykorzystywana do kontrolowania obecności bakterii kwasu mlekowego w piwie, spełniając tę samą rolę przy produkcji wina [16,28]. Okazało się, że LZ jest także silnym inhibitorem bakterii *hiochia* (np. *Lactobacillus heterohiochi*, *Lactobacillus homohiochi*) w sake (20% alkoholu, pH 4,0-4,5), a po roku przechowywania w alkoholu w temperaturze pokojowej jego aktywność wynosi 85% wartości początkowej [41,101].

Dla przetworów mięsnych typu kielbasy wołowe, salami oraz kielbasy wiedeńskie, także wykorzystano różne procedury ich konserwacji z użyciem LZ (dodatek białka do wyrobów, środek powlekający przetwory oraz składnik roztworów, w których moczy się osłonki i gotowe produkty). Dla kielbasy wołowej najlepszy efekt uzyskano, kiedy do mieszanki pekującej zawierającej chlorek i azotyn sodu dodano muramidazę [41]. Również inne wyniki badań wskazują, że dodatek enzymu do wyrobów mięsnych, korzystnie wpływa na zmniejszenie stopnia ich zanieczyszczenia poprodukcyjnego oraz istotnie przedłuża trwałość w czasie przechowywania w chłodniach [53].

LZ może w określonych warunkach odznaczać się większym zakresem właściwości, które poszerzają zakres jego antybakteryjnej aktywności. Wynikiem modyfikacji muramidazy, która powoduje zmianę monomeru enzymu w dimer i wyższe oligomery jest pojawienie się nowych właściwości LZ. Inkubując jaja w skorupkach lub samo białko jaja w temperaturze 40°C można doprowadzić do oligomeryzacji enzymu [47,48]. LZ w nowej postaci traci pewną część swojej hydrolitycznej aktywności, jednak wykazuje silniejsze działanie antybakteryjne na bakterie Gram-dodatnie oraz zwiększa zakres aktywności na bakterie Gram-ujemne (w tym liczne bakterie chorobotwórcze). W wyniku dimeryzacji ujawnia się nowa aktywność enzymu, która wiąże się z odsłonięciem obszaru hydrofobowego w cząsteczce. Zwiększa to zdolność przenikania LZ przez membranę, co tłumaczy większą skuteczność działania względem bakterii Gram-ujemnych [35,47,48].

Prowadzone prace badawcze dotyczące sposobów modyfikacji LZ mają na celu otrzymanie zwiększonej aktywności enzymu [14,15,47,48]. Wyniki wskazują, że niezależnie od sposobu modyfikacji muramidazy, uzyskane po modyfikacji preparaty mają większą biologiczną aktywność przeciwdrobnoustrojową i szerszy zakres działania antybakteryjnego. Stwarza to możliwość na lepsze zastosowanie LZ w przemyśle spożywczym [48].

### ZNACZENIE LIZOZYMU W MEDYCYNIE

Muramidaza jest wykorzystywana w leczeniu zakażeń bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych. Preparaty LZ w postaci sztyftów lub maści mogą być aplikowane na błony śluzowe jamy ustnej, gardła, do oczu czy na skórę. Lecnicze gumy do żucia z dodatkiem LZ są stosowane w schorzeniach jamy ustnej i przyzębia. Enzym wykorzystuje się także w leczeniu chorób nowotworowych ze względu na właściwości przeciwbólowe. Jest ponadto środkiem wspomagającym antybiotykoterapię oraz

działanie antyseptyków, kortykosteroidów i enzymów proteolitycznych [31,72].

LZ w połączeniu z antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi zachowuje silne bakteriobójcze działanie. Dlatego też terapia złożona z obu tych elementów, może skutecznie hamować bakteriamię i prowadzić do uniknięcia posocznicy [50].

Peptydy uzyskane z LZ, mimo braku aktywności enzymatycznej, działają bakteriostatycznie. Budzą zainteresowanie ze względu na małą masę cząsteczkową i brak odczynu alergicznego po zastosowaniu w preparatach leczniczych. Odczyn alergiczny może być obserwowany w odpowiedzi na zastosowanie muramidazy. Mine i wsp. opracowali peptydy, z których jeden hamował rozwój Gram-ujemnych bakterii *Escherichia coli* K-12, a drugi bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* [31,60].

Muramidaza ma właściwości, które mogą zostać wykorzystane w celowanym transporcie leków do nerek. LZ, jako białko niskocząsteczkowe (< 30 kDa) bądź też w połączeniu z lekami: kaptopryl-LZ, naproksen-LZ, są łatwo przesączone przez kłębuszek nerkowy. Następnie rozpadają się w lizosomach komórek kanalika bliższego. Zastosowanie leku w postaci kompleksu z muramidazą umożliwia manipulowanie szybkością uwalniania leku w nerce. Białka niskocząsteczkowe odkładają się tylko w nerce, stąd też unika się szkodliwych następstw, jakie mogłyby wystąpić w wyniku oddziaływania na inne komórki organizmu człowieka. Celowany transport leku do nerek może poprawić nie tylko terapię chorób nerek, ale także chorób sercowo-naczyniowych [31,33].

Ilość LZ w organizmach ludzi albo zwierząt może być wskaźnikiem występowania zmian patologicznych. W celu rozpoznania wirusowego lub bakteryjnego zapalenia opon mózgowych stosowane jest oznaczanie zawartości LZ w surowicy krwi. Ilość muramidazy wyizolowana z kału ludzi dorosłych jest wykorzystywana, jako wskaźnik występujących zmian chorobowych jelit, a duża zawartość u osób po 40 roku życia może wskazywać na nowotwór odbytu [41].

Muramidaza podobnie jak niektóre inne białka wyizolowane z jaj (głównie kurzych), np. owomucyna, awidyna, cystatyna, jest stosowana w testach immunologicznych typu ELISA [31].

### MECHANIZMY OBRONNE BAKTERII CHRONIĄCE JE PRZED DZIAŁANIEM LIZOZYMU

Udział LZ w systemie obronnym wielu taksonomicznie odległych organizmów, takich jak np. rośliny, bezkręgowce czy kręgowce wskazuje na jego ewolucyjny sukces, jako czynnika bakteriobójczego. W związku z tak powszechnym występowaniem i skutecznością antybakteryjną, nie dziwi, że bakterie wykształciły mechanizmy pozwalające im uniknąć działania tego enzymu [11].

Pałeczki *E. coli* zawierają peryplazmatyczne białko Ivy, będące inhibitorem LZ. Działa swoiście w stosunku do typu c

i g muramidazy, które występują u kręgowców. Jego hamująca właściwość odpowiada strukturalnemu i ewolucyjnemu powiązaniu poszczególnych postaci LZ [12].

Wykryto, że aktywność hamującą działanie muramidazy typu c ma peryplazmatyczne białko PliC *Salmonella* Enteritidis oraz lipoproteiny MliC *P. aeruginosa* i *E. coli* [11,104]. Jest to nowa klasa inhibitorów, których homologi są powszechne wśród *Proteobacteria*, co wskazuje na ich udział w interakcji bakteria-gospodarz. Dla pałeczek z rodzaju *Salmonella* taki rodzaj oporności może mieć istotne znaczenie w przeżywalności mikroorganizmów wewnątrz makrofaagów, które wytwarzają cały zestaw antybakteryjnych substancji, w tym również LZ. Należy dodać, że PliC oraz MliC nie są w żaden sposób powiązane z białkiem Ivy.

Możliwe działanie bakteryjnych inhibitorów muramidazy może wykraczać poza ich neutralizujące działanie względem LZ. PG jest uważany za silny czynnik wpływający na odporność wrodzoną przez interakcję ze specyficznymi receptorami gospodarza. Szczególne znaczenie mają fragmenty PG powstające w wyniku działania enzymów litycznych. Wpływ bakteryjnych inhibitorów LZ na fragmentację PG przez muramidazę, przyczynia się więc do zaburzeń w funkcjonowaniu układu immunologicznego gospodarza [11,104].

Swoiste bakteryjne inhibitory LZ wykryto również dla typu i muramidazy – białko PliI oraz typu g – PliG. Początkowo PliG wyizolowano z pałeczek *E. coli*, ale domniemane jego homologi można znaleźć w 15-20 innych rodzajów *Proteobacteria*. Wiele bakterii ma więcej niż jeden rodzaj inhibitora LZ. U np. *Salmonella* stwierdzono obecność genów *pliC*, *mliC* i *pliG*. Może to być związane z tym, iż niektóre zwierzęta wytwarzają dwa typy muramidazy, a bakterie często mają więcej niż jednego gospodarza, kręgowca lub bezkręgowca [87].

W ostatnich latach wykazano [3,4], że *S. aureus* jest oporny na działanie LZ ze względu na modyfikację PG przez O-acetylowanie w pozycji C-6 MurNac za pomocą O-acetylotransferazy (OatA). Badania wskazują ponadto, iż kwasy teichojoyowe (wall teichoic acid, WTA) oraz stopień usieciowania PG również przyczyniają się do oporności gronkowców na hydrolityczną aktywność LZ. W badaniach zastosowano różne metody, takie jak analiza genomu, PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy), Southern blotting, badanie wrażliwości bakterii na LZ i sprawdzenie O-acetylacji PG za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), aby określić, u których gatunków gronkowców PG jest zmodyfikowany. Badania wykazały, że kwas muraminowy był O-acetylowany tylko u patogennych, opornych na działanie LZ bakterii (np. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*). Wszystkie niepatogenne gatunki były wrażliwe na działanie LZ. Można wskazać wrażliwe gatunki (np. *S. carnosus*, *S. gallinarum* i *S. xylosum*) i nadwrażliwe gatunki (np. *S. equorum*, *S. lentus* i *S. arlettae*). U wszystkich podatnych na działanie LZ gatunków gronkowców, analizowany PG był de-O-acetylowany. Kiedy wykonano transformację genu *oatA* od opornego na LZ szczepu *S. aureus* do komórek

wrażliwej bakterii *S. carnosus*, odpowiednie transformanty także stały się odporne na muramidazę [3].

#### **ROLA LIZOZYMU W PROCESIE BAKTERIOBÓJCZEJ AKTYWNOŚCI SUROWICY ORAZ ZNACZENIE MONTMORYLONITU, JAKO CZYNNIKA ADSORBUJĄCEGO LIZOZYM Z SUROWICY**

Wilson i Spitznagel badali antybakteryjne działanie przeciwciał, komplementu i LZ przez analizę zmian ultrastrukturalnych i biochemicznych, które wywołują te składowe surowicy u szczepów gładkich bakterii *E. coli* [97]. Przeciwciała (przy nieobecności muramidazy), powodowały wraz z układem dopełniacza uwolnienie z błony zewnętrznej do 72% fosfolipidów znakowanych fosforem  $^{32}\text{P}$  i do 85% małych bakteryjnych komponentów. Kwas nukleinowy znakowany fosforem  $^{32}\text{P}$  nie został uwolniony. Wykazano nabrzmienie komórek bakterii oraz wygładzenie prawidłowo „pomarszczonych” zewnętrznych warstw ściany komórkowej. Błona cytoplazmatyczna była zniszczona, a struktury wewnątrzkomórkowe uległy dezorganizacji. Kiedy LZ został dodany do układu: przeciwciała i komplement – znakowane fosforem  $^{32}\text{P}$  makromolekularne składniki komórki były z niej uwalniane. Uszkodzenie struktury obejmowało utratę sztywności ściany komórkowej oraz jej przerwanie. Zauważono fragmentację mukopeptydowej warstwy ściany komórkowej. Przeciwciała wraz z LZ (przy braku komplementu) nie wywoływały uwalniania znaczącej ilości fosforu  $^{32}\text{P}$  z komórek bakterii [97].

W literaturze można znaleźć także badania wskazujące, że muramidaza surowicy ludzkiej nie jest bezpośrednio zaangażowana w reakcje bakteriobójcze *in vitro* względem szczepów *E. coli* [57]. Wynika to z obserwacji procesów biochemicznych, które dowodzą, że chociaż uwolnienie komponentów PG i liza komórek są opóźnione i zmniejszone w odpowiedzi na neutralizację LZ, to wzrastająca przepuszczalność oraz hamowanie syntezy białek i RNA postępują nadal, podobnie jak w przypadku obecności aktywnego enzymu. Wydaje się więc, że LZ pełni rolę wspomagającą, ułatwiającą „wejście” składowych komplementu do leżącej głębiej, pod bogato usieciowaną warstwą PG, błony komórkowej.

Schreiber i wsp. podobnie sugerują, że zmiany w błonie zewnętrznej powodowane działalnością składowych komplementu, pozwalają na dostęp LZ do warstw PG i jego enzymatyczną degradację [83]. Badacze wskazują tym samym, iż sama muramidaza jest niewystarczającym czynnikiem potrzebnym do wystąpienia lizy komórek bakterii Gram-ujemnych.

Wykazano, że traktowanie surowicy bakteriami *E. coli* (dwukrotnie, występujące kolejno po sobie), usuwa większość jej bakteriolitycznej aktywności. Zauważono ponadto, że hemolityczny komplement nie został wyraźnie „naruszony” [91]. Zakładając, że utrata bakteriolitycznego działania surowicy, spowodowana kontaktem z bakteriami, była związana ze stratą przeciwciał, dodano do niej surowicę podgrzaną do 56°C (co powodowało jej inaktywację). Uzyskano wówczas częściowe przywrócenie aktywności. Obserwacje te uznano początkowo za dowód udziału przeciwciał w reakcji bakte-

riolitycznej, do czasu aż zauważono, iż krystaliczny LZ białka jaja dodany w ilościach śladowych, również był zdolny odtworzyć bakteriolityczną aktywność surowicy traktowanej bakteriami. Sugerowało to, że LZ był ważnym czynnikiem usuwanym z surowicy podczas jej wymieszania z bakteriami. Wykonano więc badania z użyciem komórek *M. lysodeikticus* i stwierdzono, że początkowy poziom muramidazy w surowicy wynosił 5,2 µg/ml [91]. Po pierwszym traktowaniu bakteriami spadł do 2,4 µg/ml, a po drugim do 0,9 µg/ml. Ogrzanie surowicy przez 30 min w 56°C nie miało dostrzegalnego wpływu na aktywność LZ. Zaobserwowano ponadto, że LZ białka jaja wykazywał stabilność termiczną podczas ogrzewania w obecności białek surowicy, która była podobna do stabilności termicznej wykazywanej przez endogenny LZ surowicy. Potwierdzono to eksperymentem, w którym 20 µg/ml LZ białka jaja dodano do surowicy, w której wykazano początkową aktywność LZ na poziomie 4 µg/ml. Po ogrzaniu przez 30 min w 56°C, całkowita aktywność muramidazy w testowanej surowicy wyniosła 20 µg/ml, wskazując, że mniej niż 20% aktywności zostało utracone. Wykazano dodatkowo, że EDTA bez muramidazy nie działało litycznie [91].

Badania prowadzone już w latach 60 XX w. wskazywały na udział endogennego LZ w bakterioobójczej aktywności surowicy. Dowiedziono tego przez adsorpcję surowicy na bentonicie (montmorylonit, glina smektyczna), który w założeniu, jakie poczyniono usuwa ten enzym z surowicy. Surowica traktowana bentonitem ma tylko niewielką aktywność bakterioobójczą względem bakterii *E. coli*, ale stawała się bardzo aktywna, kiedy dodano do niej LZ białka jaja [91].

Gliny smektyczne, takie jak montmorylonit, są również nazywane bentonitami. Dlatego też w nomenklaturze używa się często zamiennie określenia montmorylonit i bentonit [9,73,86]. Montmorylonit (MMT) należy do krzemianów warstwowych i jest głównym składnikiem bentonitu. Bentonit jest skałą ilastą (ilem pęczniącym) [52,73,86]. MMT ma zdolność pochłaniania dużych ilości wody, a wraz z nią także pierwiastków biogenych i substancji chemicznych. Na zdolności adsorpcyjne MMT wpływa jego pakietowa struktura oraz obecność słabych oddziaływań van der Waalsa [27,73].

Niektórzy badacze sądzą [9], że najskuteczniejszy przebieg procesu zabijania bakterii występuje wtedy, kiedy wszystkie elementy surowicy współpracują ze sobą. Do badania roli tej kooperacji pomocna jest wspomniana wyżej metoda, w której usuwa się muramidazę z surowicy w wyniku jej adsorpcji na bentonicie [9,26]. Przy jej zastosowaniu wykazano, iż LZ może być brany pod uwagę, jako ważny czynnik w bakterioobójczej aktywności normalnej surowicy bydłowej oraz NSL dla większości badanych serowarów *Salmonella* O48 [9].

MMT, oprócz LZ, usuwa z surowicy również inne jej komponenty. Sugeruje się, że są to: składowe C1q i C3 układu dopełniacza, immunoglobulina IgG, properdyna oraz jony wapnia. Może to tłumaczyć utratę właściwości bakterioobójczych surowicy po kontakcie z MMT [9,36].

Za pomocą metod WAXS (wide-angle X-ray scattering, szerokokątowa dyfraktometria rentgenowska, szerokokątowa

rozpraszanie rentgenowskie) i SAXS (small-angle X-ray scattering, małokątowa dyfraktometria rentgenowska, dyfraktometria niskokątowa) udało się wykazać, że MMT po kontakcie z surowicą ludzką i bydłową, zmienia swoją strukturę przestrzenną [9,10,27].

MMT ma regularną, tworzącą warstwy budowę. Prześnienie międzywarstwowa wyznaczona według prawa Bragga wynosi 1,1 nm. Najprostszym sposobem zbadania mechanizmu adsorpcji białek surowicy przez MMT jest kontrolowanie rozmiarów tej przestrzeni za pomocą wspomnianych technik dyfraktometrii rentgenowskiej (X-ray diffraction). Okazało się, że struktura minerału po kontakcie z surowicą (eksfoliacji surowicą) ulega delaminacji i traci uporządkowaną budowę [8,9,10]. Aby dowiedzieć się, jakie białko powoduje wspomnianą zmianę struktury, MMT potraktowano roztworem albuminy, roztworem LZ oraz dla porównania, roztworem zawierającym mieszaninę obu tych ważnych białek surowicy. Nie zaobserwowano jednak w żadnym przypadku procesu delaminacji. Wskazuje to, że zmiany struktury przestrzennej MMT są spowodowane przez niezidentyfikowane jeszcze białko lub przez synergistyczną adsorpcję kilku komponentów surowicy, w tym LZ. Bardziej prawdopodobny wydaje się drugi mechanizm. W przypadku surowicy pozbawionej jonów wapnia nie obserwuje się delaminacji struktury minerału, co wskazuje na decydujący wpływ tych kationów na cały proces adsorpcji [9].

W celu ustalenia, jaką rolę LZ odgrywa w zjawisku delaminacji MMT, użyto powszechnie dostępnego źródła enzymu, jakim jest białko jaja kurzego. Przypuszcza się, że dodatni ładunek muramidazy, utrzymujący się w szerokim zakresie pH, powinien nie tylko wspomagać wiązanie się innych białek jaja kurzego do MMT, ale również wpływać stabilizująco na zaadsorbowane molekuly. Roztwór pochodzący z białka jaja kurzego wykorzystany w eksperymentach zawierał cztery najważniejsze jego białka: LZ (o masie cząsteczkowej 14,4 kDa), owomukoid, owoalbuminę oraz owotransferynę [42]. Owoalbumina jest proteiną o masie cząsteczkowej 44,5 kDa i stanowi 54% wszystkich protein jaja kurzego. Owotransferyna stanowi 12% wszystkich protein białka jaja kurzego. Owomukoid natomiast to glikoproteina o masie 28 kDa stanowiąca 10-11% protein białka jaja [31].

Wykazano [42], że w pierwszych sekundach proces adsorpcji na MMT zachodzi najbardziej efektywnie dla transferyny i albumin. Adsorpcja LZ jest o wiele mniejsza, a owomukoid prawie wcale nie odkłada się na płytkach MMT. Po upływie 40 s od początku procesu zaobserwowano nieznaczny wzrost w przebiegu adsorpcji muramidazy, zwiększenie adsorpcji owomukoidu, a także spadek pochłaniania albumin. Po 60 s adsorpcja wszystkich białek z wyjątkiem transferyny niemal ustaje, zaś po około 300 s następuje gwałtowny wzrost w przebiegu adsorpcji owomukoidu. Razem z tym białkiem zwiększa się także adsorpcja LZ. Po upływie 900 s proces ustaje i żadne z białek nie jest już adsorbowane przez MMT. Wynika stąd wniosek, że zjawisko adsorpcji jest związane z sekwencyjnym, zależnym od czasu przyłączaniem się kolejnych białek do MMT [42].

Jedynie muramidaza (ze wszystkich czterech wspomnianych białek) ma ładunek dodatni, co powinno sprzyjać jej wiązaniu przez MMT. Omówione jednak wyżej wyniki wskazują, że na początku procesu adsorpcji (0-20 s), na MMT „osadzają” się głównie owoalbumina i owotransferyna, mimo ich ujemnego ładunku. Świadczy to, iż wytworzenie pierwszej warstwy białek na powierzchni minerału nie zależy od elektrostatycznych interakcji między białkami a MMT. Na tym etapie można przypuszczać, że wspomniane proteiny wiążą się na powierzchni MMT przez pewne specyficzne interakcje. Badacze doszli do wniosku, że za dezintegrację warstwowej struktury minerału odpowiada głównie adsorpcja owotransferyny i owoalbuminy. Wydaje się, że LZ nie bierze udziału podczas delaminacji, a jego ilość zaadsorbowana przez MMT jest niewielka [42]. Dzięki metodom WAXS i SAXS pojawiają się nowe możliwości badań nad interakcją LZ z innymi białkami, np. białkami obecnymi w jajach kręgowców lub białkami układu dopełniacza.

Rola LZ w procesie bakteriobójczej aktywności surowicy wobec bakterii Gram-ujemnych jest niewyjaśniona i budzi wciąż wiele kontrowersji [9].

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez Mokrą-Latajką i wsp. [61] wskazują, że 60% badanych szczepów *Salmonella* było zabijanych tylko w surowicy, w której dopełniacz był aktywowany na drodze klasycznej oraz obecny był LZ. 20% szczepów bakterii było wrażliwych, kiedy w surowicy aktywna była ścieżka klasyczna układu dopełniacza bez udziału muramidazy, a pozostałe 20% wykazywało podatność na działanie surowicy, w której aktywowane były niezależne mechanizmy: komplement aktywowany na drodze klasycznej bez udziału LZ oraz komplement aktywowany na drodze alternatywnej w obecności LZ. Badacze Ci wykazali również, iż szczepy bakterii Gram-ujemnych typu gładkiego, mające kompletny lipopolisacharyd (LPS) – postaci S były wrażliwe tylko na kompletną ludzką surowicę, co oznacza, że wszystkie jej bakteriobójcze czynniki (łącznie z LZ) są potrzebne do wywołania spadku przeżywalności tych bakterii w surowicy. Aby zabić komórki bakterii o skróconym LPS (typu R, postaci szorstkie), konieczna była aktywacja różnych mechanizmów antybakteryjnych [61].

Wolska i wsp. stwierdzili, że obecność muramidazy w surowicy świńskiej i bydłowej pełni ważną funkcję w ich reakcji bakteriobójczej, ponieważ usunięcie enzymu wywołało 69% obniżenie aktywności surowicy świńskiej wobec komórek bakterii *P. aeruginosa* i 78% spadek działania surowicy bydłowej wobec komórek tych bakterii [100]. Wpływu LZ na komórki *P. aeruginosa* nie zauważono natomiast w 50% surowicy ludzkiej [100].

Bardzo ciekawe są wyniki wykazujące, iż wpływ LZ na proces bakteriobójczy surowicy ujawnia się w niskich stężeniach surowicy ludzkiej, ponieważ w 1% NSL, z której usunięto LZ odnotowano bardzo wyraźne obniżenie bakteriobójczego działania surowicy. Natomiast 10% NSL

pozbawiona enzymu była tak samo bakteriobójcza wobec komórek bakterii jak przed usunięciem z niej LZ [82].

Stwierdzono, że jednorazowa adsorpcja surowicy na bentonicie (z użyciem 5 mg MMT na mililitr surowicy), obniża stężenie LZ z 2,5 µg/ml do mniej niż 0,12 µg/ml [91]. Miano komplementu było przy tym nieznacznie zmniejszone. Jednak aktywność lityczna względem komórek *E. coli* wyraźnie się obniżyła, a dodanie LZ do 2 µg/ml przywróciło aktywność surowicy do pierwotnego stanu. Sama muramidaza na poziomie 5 µg/ml nie wykazywała bakteriologicznego działania na komórki *E. coli* [91].

Badania prowadzone przez Jankowskiego potwierdzają, iż LZ jest usuwany z surowicy po kontakcie z MMT, ale wskazują także, że pewna jego część nadal w niej pozostaje [36]. Autor zaobserwował, że w surowicy pępowinowej poddanej procesowi adsorpcji na bentonicie występuje mniejsze stężenie muramidazy w porównaniu z surowicą wyjściową. We wspomnianych badaniach użyto pulę składającą się z trzech surowic pępowinowych (NSP – normalna surowica pępowinowa). Należy dodać, że w zastosowanej przez autora metodzie, użyto 5 mg bentonitu na 1 ml surowicy. Być może mniejsza ilość MMT nie była wystarczająca do całkowitego usunięcia LZ z surowicy [36].

Wyniki badań własnych (dane niepublikowane) wykazały, że po procesie adsorpcji na MMT surowica końska oraz owcza tracą antybakteryjną aktywność wobec bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Dahlem oraz *S. enterica* subsp. *salamae* serowar Erlangen. Jednak po zwiększeniu objętości surowicy owczej (do 4 lub 8 ml), która miała kontakt ze stałą ilością MMT (10 mg), obserwowano spadek przeżywalności pałeczek *S. Erlangen* w surowicy. Po traktowaniu MMT, w obu wspomnianych surowicach zwierzęcych nie wykryto aktywności enzymatycznej LZ, a stężenie białka całkowitego w tak modyfikowanych surowicach zmniejszyło się, choć obie surowice różnią się pod względem ilości zaadsorbowanych przez bentonit białek. Wyniki uzyskane z elektroforezy SDS-PAGE białek surowicznych wskazują natomiast, że MMT z dwóch badanych surowic kręgowców usuwa białko, którego masa cząsteczkowa zawiera się w przedziale 93,8-96,2 kDa. W podanym zakresie mas mieszczą się czynniki B i składowa C6 układu dopełniacza.

Celem obecnie prowadzonych badań nad procesem adsorpcji białek jaja kurzego na MMT jest opracowanie metody służącej do otrzymywania stabilnych hybrydowych kompleksów: eksfoliowany montmorylonit-molekuły białek, która nie wymagałaby zastosowania modyfikacji chemicznych [42]. Natomiast celem badań prowadzonych nad zjawiskiem delaminacji MMT w surowicy jest uzyskanie nanonapełniacza kompozytów polimerowych mającego bakteriobójcze lub bakteriostatyczne właściwości [40]. Nasuwać się może jeszcze pytanie czy proces adsorpcji jest odwracalny i czy istnieje możliwość odzyskania związanych przez MMT protein. Jeśli desorpcja okazałaby się skuteczna, bentonit mógłby znaleźć zastosowanie, jako materiał do separacji białek [73].



## PODSUMOWANIE

Przedstawione w pracy informacje mają na celu zwrócić uwagę na wielość i złożoność aspektów charakteryzujących LZ. Rozległe i szczegółowe badania prowadzone nad enzymem, nie wyjaśniły dotychczas wszystkich jego funkcji i procesów, w które białko to jest zaangażowane. Oprócz podstawowego działania litycznego LZ na ściany komórek bakteryjnych, podawane są inne liczne

właściwości muramidazy. Różne sposoby modyfikacji enzymu stwarzają możliwość lepszego wykorzystania tego białka w przemyśle spożywczym i medycynie. Za interesowanie badaczy skupia się również wokół mechanizmów obronnych bakterii, pozwalających im uniknąć działania LZ oraz udziału muramidazy w procesie bakteriobójczej aktywności surowicy. Ta wielość i różnorodność właściwości LZ czyni z białka wciąż interesujący przedmiot badań.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Abergel C., Monchois V., Byrne D., Chenivresse S., Lembo F., Lazaroni J.C., Claverie J.M.: Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 6394-6399
- [2] Artymiuk P.J., Blake C.C., Grace D.E., Oatley S.J., Phillips D.C., Sternberg M.J.: Crystallographic studies of the dynamic properties of lysozyme. *Nature*, 1979; 280: 563-568
- [3] Bera A., Biswas R., Herbert S., Götz F.: The presence of peptidoglycan *o*-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect. Immun.*, 2006; 74: 4598-4604
- [4] Bera A., Biswas R., Herbert S., Kulauzovic E., Weidenmaier C., Peschel A., Götz F.: Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 280-283
- [5] Blake C.C., Koenig D.F., Mair G.A., North A.C., Phillips D.C., Sarma V.R.: Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, 1965; 206: 757-761
- [6] Borowiak R., Leśniewski G.: Próba zwiększenia funkcjonalności preparatów otrzymanych metodą wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012; 5: 124-134
- [7] Buczek J., Deptuła W., Gliński Z., Jarosz J., Stosik M., Wernicki A.: Immunologia porównawcza i rozwojowa zwierząt. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poznań 2000
- [8] Bugla-Płoskońska G., Kiersnowski A., Futoma-Kołoch B., Doroszkiewicz W.: Cooperation between lysozyme and complement system in bactericidal action of human serum – is everything already clear? *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2008; 33: 37-42
- [9] Bugla-Płoskońska G., Kiersnowski A., Futoma-Kołoch B., Doroszkiewicz W.: Killing of Gram-negative bacteria with normal human serum and normal bovine serum: use of lysozyme and complement proteins in the death of *Salmonella* strains O48. *Microb. Ecol.* 2009; 58: 276-289
- [10] Bugla-Płoskońska G., Kiersnowski A., Futoma-Kołoch B., Doroszkiewicz W.: Serum as an environment to live or not to live for Gram-negative bacteria: relationship between lysozyme and complement system in killing *Salmonella* O48 strain. W: *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, red.: A. Mendez-Vilas. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore 2009, 523-527
- [11] Callewaert L., Aertsen A., Deckers D., Vanoirbeek K.G., Vanderkelen L., Van Herreweghe J.M., Masschalck B., Nakimbugwe D., Robben J., Michiels C.W.: A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000019
- [12] Callewaert L., Masschalck B., Deckers D., Nakimbugwe D., Atanassova M., Aertsen A., Michiels C.W.: Purification of Ivy, a lysozyme inhibitor from *Escherichia coli*, and characterisation of its specificity for various lysozymes. *Enz. Microb. Technol.*, 2005; 37: 205-211
- [13] Callewaert L., Michiels C.W.: Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.*, 2010; 35: 127-160
- [14] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of lysozyme modified by the membrane technique. *EJPAU Food Sci. Technol.*, 2003; 6: 1-6
- [15] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009; 228: 841-845
- [16] Daeschel M.A., Bruslind L., Clawson J.: Application of the enzyme lysozyme in brewing. *MBAA TQ*, 1999; 36: 219-222
- [17] Datta S., Biswal B.K., Vijayan M.: The effect of stabilizing additives on the structure and hydration of proteins: a study involving tetragonal lysozyme. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2001; 57: 1614-1620
- [18] Dembczyński R., Białas W., Jankowski T.: Wykorzystanie dwufazowej ekstrakcji wodnej do separacji lizozymu z białka jaja kurzego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009; 5: 5-17
- [19] Deptuła W., Buczek J.: *Zarys immunologii ssaków*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1998
- [20] Deshpande A., Nimsadkar S., Mande S.C.: Effect of alcohols on protein hydration: crystallographic analysis of hen egg-white lysozyme in the presence of alcohols. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2005; 61: 1005-1008
- [21] Dimitrov I., Djorbineva M., Sotirov L., Tanchev S.: Influence of fearfulness on lysozyme and complement concentrations in dairy sheep. *Revue Méd. Vét.*, 2005; 156: 445-448
- [22] Doonan S.: *Białka i peptydy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008
- [23] Durek T., Torbeev V.Y., Kent S.B.: Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 4846-4851
- [24] Düring K., Porsch P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W.: The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.*, 1999; 449: 93-100
- [25] Enzyme nomenclature database. <http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.17> (12.09.2013)
- [26] Feingold D.S., Goldman J.N., Kuritz H.M.: Locus of the action of serum and the role of lysozyme in the serum bactericidal reaction. *J. Bacteriol.*, 1968; 96: 2118-2126
- [27] Futoma-Kołoch B., Bugla-Płoskońska G.: Efektywność bakteriobójczego działania surowicy wynikająca z obecności układu dopełniacza i lizozymu wobec bakterii, które unikają odpowiedzi immunologicznej organizmu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 471-484
- [28] Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A.: Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1997; 48: 49-54
- [29] Gill J.: Serum lysozyme level in the European bison, *Bison bonasus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1995; 110B: 235-240
- [30] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007



- [31] Gołęb K., Warwas M.: Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2005; 14: 1001-1010
- [32] Goto T., Abe Y., Kakuta Y., Takeshita K., Imoto T., Ueda T.: Crystal structure of *Tapes japonica* lysozyme with substrate analogue: structural basis of the catalytic mechanism and manifestation of its chitinase activity accompanied by quaternary structural change. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 27459-27467
- [33] Haas M., Moolenaar F., Meijer D.K., De Zeeuw D.: Specific drug delivery to the kidney. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2002; 16: 489-496
- [34] Hadfield A.T., Harvey D.J., Archer D.B., MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Radford S.E., Lowe G., Dobson C.M., Johnson L.N.: Crystal structure of the mutant D52S hen egg white lysozyme with an oligosaccharide product. *J. Mol. Biol.*, 1994; 243: 856-872
- [35] Ibrahim H.R., Higashiguchi S., Koketsu M., Juneja L.R., Kim M., Yamamoto T., Sugimoto Y., Aoki T.: Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44: 3799-3806
- [36] Jankowski S.: Badania nad rolą dopełniacza i przeciwciał w bakteriobójczym działaniu normalnej surowicy pępowinowej wobec pałeczek *Salmonella*. *Immunologia Polska*, 1988; 13: 233-244
- [37] Jurczyszyn A., Skotnicki A.B.: Postępy w badaniach nad molekularną patogenezą amyloidozę oraz implikacje kliniczne. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2004; 13: 669-676
- [38] Kajla M.K., Shi L., Li B., Luckhart S., Li J., Paskewitz S.M.: A new role for an old antimicrobial: lysozyme c-1 can function to protect malaria parasites in *Anopheles* mosquitoes. *PLoS One*, 2011; 6: e19649
- [39] Kenner G.W.: The Bakerian lecture. Towards synthesis of proteins. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1977; 197: 237-253
- [40] Kiersnowski A., Serwaczak M., Kułaga E., Futoma-Kołoch B., Bugla-Płoskońska G., Kwiatkowski R., Doroszkiewicz W., Pigłowski J.: Delamination of montmorillonite in serum – a new approach to obtaining clay-based biofunctional hybrid materials. *Appl. Clay Sci.*, 2009; 44: 225-229
- [41] Kijowski J., Leśniewski G.: Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności w diagnostyce medycznej i farmakologii. *Biotechnologia*, 1995; 2: 130-140
- [42] Kolman K., Steffen W., Bugla-Płoskońska G., Skwara A., Pigłowski J., Butt H.J., Kiersnowski A.: Exfoliation of montmorillonite in protein solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, 2012; 374: 135-140
- [43] Koterska B., Poznańska S., Lewicki C., Ryduzik W.: Inhibition of butyric acid fermentation in cheese by addition of lysozyme in the form of egg-white. *Dodatek Naukowy*, 1972; 4: 5-7
- [44] Kurinov I.V., Harrison R.W.: The influence of temperature on lysozyme crystals. Structure and dynamics of protein and water. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 1995; 51: 98-109
- [45] Lapcharoen P., Komalamisra N., Rongsriyam Y., Wangsuphachart V., Dekumyoy P., Prachumsri J., Kajla M.K., Paskewitz S.M.: Investigations on the role of a lysozyme from the malaria vector *Anopheles dirus* during malaria parasite development. *Dev. Comp. Immunol.*, 2012; 36: 104-111
- [46] Lee-Huang S., Huang P.L., Sun Y., Huang P.L., Kung H.F., Blithe D.L., Chen H.C.: Lysozyme and RNases as anti-HIV components in  $\beta$ -core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 2678-2681
- [47] Leśniewski G.: Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. *Nauka Przyr. Technol.*, 2009; 3: 1-18
- [48] Leśniewski G., Borowiak R.: Wpływ warunków środowiskowych na zmianę właściwości lizozymu w białku jaj kurzych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012; 3: 77-87
- [49] Leyko W.: *Biofizyka dla biologów*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1983
- [50] Liang A.H., Sugawara N., Ohno N., Adachi Y., Yadomae T.: Effect of O-antigenic polysaccharide of *Escherichia coli* on endotoxin neutralizing activity of lysozyme. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1998; 21: 79-87
- [51] Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I.: *Immunology*, Seventh Edition. Mosby Elsevier, 2006
- [52] Malesa M.: Nanonapełniacze kompozytów polimerowych. Część I. Krzemiany warstwowe. *Elastomery*, 2004; 8: 12-17
- [53] Malicki A., Jarmoluk A., Brużewicz S.: Wpływ dodatku lizozymu na trwałość i bezpieczeństwo mikrobiologiczne kielbas w osłonce barierowej. *Acta Sci. Pol. Medicina Veterinaria*, 2003; 2: 29-36
- [54] Marquis G., Garzon S., Strykowski H., Auger P.: Cell walls of normal and lysozyme-damaged blastoconidia of *Candida albicans*: localization of surface factor 4 antigen and vicinal-glycol staining. *Infect. Immun.*, 1991; 59: 1312-1318
- [55] Marquis G., Montplaisir S., Garzon S., Strykowski H., Auger P.: Fungitoxicity of muramidase. Ultrastructural damage to *Candida albicans*. *Lab. Invest.*, 1982; 46: 627-636
- [56] Marsich E., Zuccato P., Rizzi S., Vetere A., Tonin E., Paoletti S.: *Helicobacter pylori* expresses an autolytic enzyme: gene identification, cloning, and theoretical protein structure. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 6270-6279
- [57] Martinez R.J., Carroll S.F.: Sequential metabolic expressions of the lethal process in human serum-treated *Escherichia coli*: role of lysozyme. *Infect. Immun.*, 1980; 28: 735-745
- [58] Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E.G.R., Michiels C.W.: Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001; 67: 339-344
- [59] Matsuura K., Tamura T., Kobayashi N., Yashiro T., Tatsumi S.: The antibacterial protein lysozyme identified as the termite egg recognition pheromone. *PLoS One*, 2007; 2: e813
- [60] Mine Y., Ma F., Lauriau S.: Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 1088-1094
- [61] Mokracka-Latajka G., Jankowski S., Grzybek-Hryniewicz K., Krzyżanowska B.: The mechanism of bactericidal action of normal human serum against *Salmonella* rods. *Acta Microbiol. Pol.*, 1996; 45: 169-180
- [62] Monzingo A.F., Marcotte E.M., Hart P.J., Robertus J.D.: Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into prokaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nat. Struct. Biol.*, 1996; 3: 133-140
- [63] Mudgil P., Torres M., Millar T.J.: Adsorption of lysozyme to phospholipid and meibomian lipid monolayer films. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2006; 48: 128-137
- [64] Nace G.W., Suyama T., Iwata T.: The relationship between a lysozyme-like enzyme and frog adenocarcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1965; 126: 204-221
- [65] Nagendra H.G., Sukumar N., Vijayan M.: Role of water in plasticity, stability, and action of proteins: the crystal structures of lysozyme at very low levels of hydration. *Proteins*, 1998; 32: 229-240
- [66] Neujahr H.Y., Börstad B., Logardt I.M.: Factors affecting the resistance of *Lactobacillus fermenti* to lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1973; 116: 694-698
- [67] Noller E.C., Hartsell S.E.: Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae*. I. Lysis by four lytic systems utilizing lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1961; 81: 482-491
- [68] Noller E.C., Hartsell S.E.: Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae*. II. Pre- and co-lytic treatments potentiating the action of lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1961; 81: 492-499

- [69] Ogundele M.O.: A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. *Mediators Inflamm.*, 1998; 7: 363-365
- [70] Ostrovsky D.S., Snyder J.A., Iwata T., Izaka K.I., Maglott D.S., Nace G.W.: Frog lysozyme. I. Its identification, occurrence as isozymes, and quantitative distribution in tissues of the leopard frog, *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 1976; 195: 279-290
- [71] Peterson R.G., Hartsell S.E.: The lysozyme spectrum of the gram-negative bacteria. *J. Infect. Dis.*, 1955; 96: 75-81
- [72] Proctor V.A., Cunningham F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1988; 26: 359-395
- [73] Ralla K., Sohlhng U., Riechers D., Kasper C., Ruf F., Scheper T.: Adsorption and separation of proteins by a smectitic clay mineral. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2010; 33: 847-861
- [74] Ratajczak P., Białas W., Dembczyński R., Grajek W., Jankowski T.: Ekstrakcja dwufazowa lizozymu z białka jaja kurzego. *Zywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004; 3: 40-52
- [75] Refaee M., Tezuka T., Akasaka K., Williamson M.P.: Pressure-dependent changes in the solution structure of hen egg-white lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 2003; 327: 857-865
- [76] Repaske R.: Lysis of gram-negative bacteria by lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956; 22: 189-191
- [77] Repaske R.: Lysis of gram-negative organisms and the role of versene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1958; 30: 225-232
- [78] Salton M.R.: The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 1957; 21: 82-100
- [79] Salton M.R., Pavlik J.G.: Studies of the bacterial cell wall. VI. Wall composition and sensitivity to lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960; 39: 398-407
- [80] Saurabh S., Sahoo P.K.: Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.*, 2008; 39: 223-239
- [81] Sava G., Benetti A., Ceschia V., Pacor S.: Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review). *Anticancer Res.*, 1989; 9: 583-591
- [82] Schiller N.L., Alazard M.J., Borowski R.S.: Serum sensitivity of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain. *Infect. Immun.*, 1984; 45: 748-755
- [83] Schreiber R.D., Morrison D.C., Podack E.R., Müller-Eberhard H.J.: Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. *J. Exp. Med.*, 1979; 149: 870-882
- [84] Sharp J.J., Robinson A.B., Kamen M.D.: Synthesis of a polypeptide with lysozyme activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 1973; 95: 6097-6108
- [85] Shugar D.: The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952; 8: 302-309
- [86] Spychaj T., Heneczkowski M., Pięłowski J., Oleksy M., Kowalczyk K., Kiersnowski A., Galina H.: Modyfikowane bentonity (montmorylonity) jako podstawa rozwoju nanomateriałów polimerowych w kraju. *Inżynieria Materiałowa*, 2006; 6: 1296-1302
- [87] Vanderkelen L., Van Herreweghe J.M., Vanoirbeek K.G., Baggerman G., Myrnes B., Declerck P.J., Nilsen I.W., Michiels C.W., Callewaert L.: Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011; 68: 1053-1064
- [88] Ved'mina E.A., Pasternak N.A., Shenderovich V.A., Zhuravleva T.P., Andrusenko I.T.: Sensitivity of Gram-negative microflora to lysozyme. *Antibiotiki*, 1979; 24: 746-750
- [89] Wang J., Dauter M., Alkire R., Joachimiak A., Dauter Z.: Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2007; 63: 1254-1268
- [90] Wang S., Ng T.B., Chen T., Lin D., Wu J., Rao P., Ye X.: First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 327: 820-827
- [91] Wardlaw A.C.: The complement-dependent bacteriolytic activity of normal human serum. I. The effect of pH and ionic strength and the role of lysozyme. *J. Exp. Med.*, 1962; 115: 1231-1249
- [92] Warren G.H., Gray J., Bartell P.: The lysis of *Pseudomonas aeruginosa* by lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1955; 70: 614-619
- [93] Warren G.H., Gray J., Yurchenco J.A.: Effect of polymyxin on the lysis of *Neisseria catarrhalis* by lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1957; 74: 788-793
- [94] Wasserfall F.E., Voss E., Prokopek D.: Studies on cheese ripening. V. The use of lysozyme instead of nitrate to inhibit late blowing of cheese. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.*, 1976; 28: 3-16
- [95] Weaver L.H., Grütter M.G., Matthews B.W.: The refined structures of goose lysozyme and its complex with a bound trisaccharide show that the "goose-type" lysozymes lack a catalytic aspartate residue. *J. Mol. Biol.*, 1995; 245: 54-68
- [96] Wiesner J., Vilcinskas A.: Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 2010; 1: 440-464
- [97] Wilson L.A., Spitznagel J.K.: Molecular and structural damage to *Escherichia coli* produced by antibody, complement, and lysozyme systems. *J. Bacteriol.*, 1968; 96: 1339-1348
- [98] Witholt B., Heerikhuizen H.V., De Leij L.: How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane? *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 443: 534-544
- [99] Wolin M.J.: Lysis of *Vibrio succinogenes* by ethylenediaminetetraacetic acid or lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1966; 91: 1781-1786
- [100] Wolska K., Bukowski K., Anusz Z., Jakubczak A.: Bakteriobójcza aktywność surowicy ludzkiej, świńskiej i bydłowej wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1999; 51: 339-345
- [101] Yajima M., Hidaka Y., Matsuoka Y.: Studies on egg-white lysozyme as a preservative of sake. *J. Ferment. Technol.*, 1968; 46: 782-788
- [102] Yano T.: The nonspecific immune system: humoral defence. W: The fish immune system. Organism, pathogen, and environment, red.: G. Iwama, T. Nakanishi. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1996, 106-110
- [103] Yuan B., Xing L.L., Zhang Y.D., Lu Y., Luo Y.Y., Mai Z.H., Li M.: Penetration and saturation of lysozyme in phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B.*, 2007; 111: 6151-6155
- [104] Yum S., Kim M.J., Xu Y., Jin X.L., Yoo H.Y., Park J.W., Gong J.H., Choe K.M., Lee B.L., Ha N.C.: Structural basis for the recognition of lysozyme by MliC, a periplasmic lysozyme inhibitor in Gram-negative bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 378: 244-248
- [105] Zimmerman L.M., Vogel L.A., Bowden R.M.: Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.*, 2010; 213: 661-671

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.