УДК 663.15 + 577.15

В.В. КАРЄВІНА, студентка
І.М. ВОЛОШИНА, канд. техн. наук

СПОСОБИ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ ЛІЗОЦИМУ

Розглянуті способи одержання ферментного препарату лізоциму із тваринних, рослинних об'єктів та мікроорганізмів. Охарактеризовані рекомбінантні мікроорганізми Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, які можуть продукувати лізоцим. Описана можливість створення рекомбінантних штамів Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, здатних продукувати стафілококовий лізоцим, що дає можливість створювати нові композиції пробіотиків.

Ключові слова: *лізоцим, фермент, рекомбінантні, способи одержання лізоциму.*

Лізоцим – фермент класу гідролаз, що характеризується широким спектром біологічної активності, зокрема стимулює неспецифічну реактивність організму і має протизапальну та муколітичну дію. В організмі він міститься у слизових оболонках, сльозовій рідині, слині, шкірі, а також у грудному молоці та лейкоцитах [5]. Лізоцим також виявлено у рослинах (хрін, редька, ріпа, капуста, примула), деяких бактеріях і вірусах. Вміст лізоциму в тваринних і рослинних об'єктах коливається в широкому діапазоні. Найбільша його концентрація у білках курячих яєць, хроні та сльозах [3,4].

© В.В.Карєвіна, І.М.Волошина, 2012

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

За хімічним складом лізоцим є білком, що складається з 130 – 150 амінокислотних залишків. Механізм дії лізоциму зводиться до ферментативного розщеплення муреїнового шару бактеріальної клітинної стінки з послідуючим вивільненням мурамової, діамінопімелінової, глутамінової та аспарагінової кислот, глюкозаміну, аланіну, серину та лізину, що призводить до загибелі клітини [2, 5].

Галузі використання лізоциму. Лізоцим використовується у харчовій, фармацевтичній та текстильній промисловостях. У харчовій промисловості лізоцим використовується як консервант, його додають до м'ясного фаршу, що збільшує строк його придатності і пригнічує ріст широкого спектру грампозитивних бактерій, зокрема бактерій роду *Clostridium*, при виробництві сирів і деяких інших молочнокислих продуктів [2, 3, 9]. Також лізоцим може бути використаний в якості стабілізатора смаку рослинних продуктів; в цьому випадку лізоцим розглядають не як харчову добавку, а як фермент при виготовленні вина та пива.

Лізоцим широко застосовується у медицині, тому що є активною сполукою, яка бере участь у специфічній та неспецифічній імунній відповіді. Важливою властивістю лізоциму є здатність спричиняти порушення проникності мембран та метаболізму патогенів, впливати на процеси клітинного росту та диференціації імунних та неімунних клітин. Разом з тим, лізоцим ефективний також проти окремих штамів грамнегативних мікроорганізмів, патогенних вірусів та грибів роду *Candida*. Він перешкоджає проникненню антигенів у внутрішнє середовище організму, стимулює фагоцитоз, підсилює кооперативні функції Т-субпопуляцій лімфоцитів. Відіграє активну роль в нормальному метаболізмі шляхом участі в антитоксичних процесах, перешкоджає вільнорадикальному окисленню та кислотними медіаторами запальних процесів [5]. Лізоцим також використовують у складі лікарських препаратів для внутрішнього та зовнішнього застосування; косметичних

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

засобів для зняття макіяжу з вій та повік; засобів догляду за ротовою порожниною у складі зубних паст та зубних еліксирів. Його застосовують при лікуванні опіків, гнійних процесів, відмороженнях, кон'юнктивітах, ерозії роговиці ока, афтозних стоматитах та інших інфекційних захворюваннях [7].

Новим напрямком застосування лізоциму є його використання у текстильній промисловості замість хімічної обробки вовни, що надає тканині антибактеріальних властивостей. Такий текстиль використовують на споживчому, військовому та медичному ринках [10].

Способи одержання лізоциму. Лізоцим міститься у багатьох біологічних рідинах і тканинах тварин, синтезується бактеріями, грибами, рослинами, птахами і ссавцями. Навіть деякі віруси (зокрема літичні бактеріофаги) мають гени, які відповідають за синтез лізоциму у інфікованих клітинах. Хоча висока концентрація лізоциму виявлена в людській сльозі, у промисловості лізоцим одержують з білків курячих яєць [11, 13].

Одержання лізоциму із яєчного білку. Курячі яйця містять відносно велику кількість лізоциму. Із яєчного білка лізоцим отримують методами прямої кристалізації при додаванні 5% NaCl з наступною очисткою лізоциму дворазовою перекристалізацією, іонообмінною хроматографією і ультрафільтрацією [6]. Лізоцим, очищений за допомогою іонообмінної хроматографії, може бути використаний для його для послідуючих модифікацій. Модифікацію ферменту можна проводити хімічним, термо-хімічним, тепловим і мембранним методами. Метод виділення і модифікації лізоциму може бути використаний для отримання ферменту з високою активністю. Лізоцим, і особливо його модифікована форма, може бути використаний або знайшов своє використання не лише в харчовій промисловості, але і в медицині, фармакології і ветеринарнії [11].

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Одержання лізоциму з крові ссавців. В організмі ссавців лізоцим знаходиться у сльозовій та слинній рідинах, у крові, молоці та слизових оболонках. Лізоцим з сироватки крові очищують за допомогою хроматографії з подальшою ідентифікацією методом лізування *Micrococcus lysodeictus*. [3,4,9,10]

Лізоцим отриманий із курячого білка та крові ссавців характеризується різною бактерицидною активністю. Порівняльна характеристика отриманого таким чином ферменту наведена у таблиці, з якої видно, що лізоцим крові ссавців має більшу бактерицидну дію по відношенню до деяких видів мікроорганізмів, ніж лізоцим курячого яйця [8,10].

Таблиця

Бактерицидна активність лізоциму

Вид мікроорганізмів	Зона затримки росту, мм	
	крові ссавців	курячого яйця
Escherichia coli ATCC 25922	3,3	1,6
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	2,0	2,0
Bordetella bronchiseptica ATB 32 GN(V 1.1)	1,9	1,7
Serratia marcescens ATCC 8100	1,7	1,6
Bacillus subtilis BGA	3,6	3,8
Staphylococcus lentus API Staph (V 2.0)	3,9	3,7
Staphylococcus aureus ATCC 25923	0,0	0,0
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	0,2	0,2

Одержання лізоциму безхребетних. Наявність лізоциму у безхребетних була вперше доведена у 1975 році, коли він був виділений із морських зірок червоного астеріасу (*Asterias rubens*) родини *Forcipulatida*. Пізніше лізоцим виявили у морського двостулкового молюска *Venerupis philippinarum*, морської раковини *Lunella coronata* і дощового черв'яка *Eisenia fetida*. Лізоцим безхребетних ще недостатньо вивчений, але відомо, що його активність нижче, ніж лізоцим ссавців [4,6].

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Одержання лізоциму за допомогою мікроорганізмів.

Одержання стафілококового лізоциму. Стафілококи представляють собою велику групу грампозитивних мікроорганізмів. Вони широко розповсюджені у навколишньому середовищі, а деякі види являються збудниками низки хвороб у людей та тварин. Одним з відомих стафілококів є золотистий стафілокок – *Staphylococcus aureus*, який упродовж всього XX століття був одним з найбільш значимих патогенів у медичній практиці. *Staphylococcus aureus* може викликати широкий спектр захворювань – від шкірних інфекцій до тяжких септичних станів з можливим летальним наслідком. Основною екологічною нішею *Staphylococcus aureus* є апокринові залози, розташовані в передніх відділах носової порожнини людини[4,6,8,13].

Staphylococcus aureus за певних умов здатен синтезувати бактеріальний лізоцим. У бактеріального лізоциму, на відміну від яєчного, більш широкий спектр літичної дії. Лізоцим *Staphylococcus aureus* діє на грампозитивні бактерії і здатен руйнувати клітинні стінки деяких видів стафілококів. Крім того, мікробний лізоцим взаємодіє з іншими групами гідролітичних ферментів, що призводить до більшого сумарного літичного ефекту. На сьогодні промисловий спосіб отримання препаратів стафілококового лізоциму не розроблений, хоча не викликає сумніву, що одержання стафілококового лізоциму більш економічно вигідно, ніж одержання лізоциму і курячих яєць. Використання *Staphylococcus aureus* у промислових масштабах ускладнюється через його патогенність. Одним з підходів до вирішення даної проблеми є клонування гену, що детермінує синтез стафілококового лізоциму та передача його непатогенним мікроорганізмам. Штам *Staphylococcus aureus* 118 продукує лізоцим із високою бактерицидною активністю, тому його використання для клонування гену лізоциму є найбільш доцільним [1,4,14].

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Одержання лізоциму з мікроорганізмів нормальної мікрофлори людини. На даний момент існують одиничні роботи по клонуванню гену стафілококового лізоциму у клітин *E. coli*, але у неї слабий рівень експерсії цих генів. *Lactobacillus plantarum* і *Lactobacillus fermentum* є представниками нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту. *Lactobacillus plantarum* зазвичай можна виявити у таких продуктах, як квашена капуста, солоні огірки, у розсолі оливок, закваски а також у сирах, ферментованих ковбасах і в'яленій рибі. *Lactobacillus fermentum* є основою пробіотиків та деяких лікарських засобів [1,4,13].

Була виявлена експресія гена, що кодує синтез стафілококового лізоциму в клітинах штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3, що не має власної лізоцимної активності. Продукція лізоциму в клітинах інших гібридних штамів *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 і *L. fermentum* 81T-B5, що характеризуються різним рівнем власної лізоцимної активності, перевищувала початковий рівень продукції ферменту [4].

Вперше були отримані рекомбінантні штами лактобацил, яким було введено ген, що кодує синтез стафілококового лізоциму, які нарівні з підвищеним рівнем лізоцимоутворення, мали підвищений рівень антагоністичної активності особливо по відношенню до клітин майже всіх клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* [1,4,9].

Вченими активно розробляються нові види пробіотиків, на основі рекомбінантних штамів сінної палички, дріжджів, лактобацил, кишкової палички. Сконструйовані штами лактобацил, що мають підвищений рівень лізоцимоутворення і характеризуються високою антагоністичною активністю щодо умовно патогенних штамів бактерій, можуть бути рекомендовані в якості потенційних штамів для створення високоефективних пробіотиків [4].

Одержання лізоциму мікроорганізмів роду Bacillus. Бактерії *B. subtilis* широко розповсюджені в оточуючому середовищі. Різноманіття метаболічних процесів *B. subtilis* і відсутність патогенності стало

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

причиною того, що представники цього виду стали широко використовуватися в різних галузях промисловості для одержання ферментів, антибіотиків та харчових добавок.

Для створення рекомбінантного продуцента стафілококового лізоциму був використаний протеазодефіцитний мутант *Bacillus subtilis*. Ген, який кодує синтез лізоциму стафілококів був отриманий із *S. aureus* 118 і перенесений у клітини *B. subtilis* AJ73 в складі вектора pLFi4. Створений рекомбінантний штам *B. subtilis* AJ73 є непатогеннім і продукує в 2,5 рази більше лізоциму ніж вихідний штам *S. aureus* 118, що робить його перспективним для промислового одержання лізоциму [4,12,14].

Одержання фагового лізоциму. У геномі ряду бакреріофагів є гени, що містять інформацію про синтез лізоциму. Інфіковані фагами клітини починають продукувати лізоцим, який руйнує їх клітинну стінку і бактеріофаги виходять у навколишнє середовище.

На сьогодні здійснено клонування, сиквенування і експресію гену лізоциму бактеріофага FMV грамнегативних бактерій *Pseudomonas aeruginosa* в клітинах дріжджів. Порівнюючи ефективність експресії лізоциму у клітинах *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia pastoris*, було показано, що в лабораторних умовах *S. cerevisiae* є більш ефективним продуцентом фагового лізоциму, ніж *P. pastoris*. Також були проведені дослідження щодо перенесення генів фага SF6 у *Bacillus subtilis*, з метою створення рекомбінантного штаму здатного синтезувати фаговий лізоцим [12].

Висновки. Розглянули способи одержання лізоциму із тваринної та рослинної сировини, а також за допомогою мікроорганізмів. Найбільш перспективним є метод одержання стафілококового та фагового лізоциму за допомогою непатогенних генетично-модифікованих мікроорганізмів. Також перспективним є можливість створення нових

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

видів пробіотиків на основі рекомбінантних представників нормальної мікрофлори людини з лізоцим-продукуючою активністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Kolman H., Kolman R., Siwicki A. K., Szczepkowska B.* Some humoral effects in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) after lysozyme dimmer application in bath // Archive of Polish Fisheries. — 2000. — V. 8. — P. 171–180.

2. *Биотехнология* органических кислот и ферментных препаратов: учебное пособие / Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. – 80 с.

3. *Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В.* Определение активности ферментов. Справочник. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.

4. *Жаданова Л.В.* Клонирование генов, кодирующих синтез лизоцима *Staphylococcus aureus* и лизостафина *Staphylococcus simulans*, их экспрессия в гетерологичных хозяевах: дис. канд биол. наук: 03.00.07: защищена 2004 г./ Жданова Людмила Владимировна. – М., 2004. – 139 с.

5. *Вершигора А. Ю.* Імунологія. — К.: Вища шк., 2005. – 599 с.

6. Патент Российской Федерации №2342431 «Способ получения авидина и лизоцима» / Суворовцев В.И., Борзенков В.М., Хатюнин Ю.И., Теймуразов М.Г. – Опубл. 27.12.2008 р. Бюл. № 11.

7. *Zhang X., Sun M., Wang Q.Y., Wang Y.J., Liu J.Z.* Screening condition for lysozyme production of marine bacteria S-12-86 // Journal of Fishery Sciences of China – 2007. – № 14, V. 3. – P.425-429.

8. *X.Zhang, Y.J. Wang, M. Sun, X. Ren, Y. Zou, Q.Y. Wang, W. Wang*. Purification and properties of lysozyme from a marine strain // Annals of Microbiology. – 2008. – № 58, V. 1. – 89-94.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

9. *A. Pellegrini, S. Waiblinger, R. von Fellenberg*. Purification of equine neutrophil lysozyme and its antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria // Veterinary Research Communications. – 1991. – № 15. – 421-435.

10. *I.P. Baskova, L.L. Zavalova, A.V. Basanova, A.V. Sass*. Separation of Monomerizing and Lysozyme Activities of Destabilase from Medicinal Leech Salivary Gland Secretion. // Biochemistry. – 2001. – №. 12, V. 66, P. 1368-1373.

11. *J.M. Herreweghe, C.W. Michiels.* Invertebrate lysozymes: Diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function. // J. Biosci. – 2012. – № 2, V. 37. – P. 327–348.

12. *M. Verma.* Molecular Cloning and Sequencing of Lysozyme Gene of Bacteriophage SF6 of *Bacillus subtilis*. // Current Microbiology. – 1996. – V. 13. – P. 299-301.

13. *J.M. Van Herreweghe, L. Vanderkelen, L. Callewaert, A. Aertsen, G. Compernolle, P.J. Declerck, C.W. Michiels*. Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme. // Cell. Mol. Life Sci. –2010. – V. 67. – P. 1177–1188.

14. *L. Vanderkelen, J.M. Van Herreweghe, K.G.A. Vanoirbeek, G. Baggerman, B. Myrnes, P.J. Declerck, I.W. Nilsen,C. W. Michiels, L. Callewaert*. // Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. // Cell. Mol. Life Sci. – 2011. – V. 68. P. 1053–1064.

Надійшла до редколегії жовтень 2012 р.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

В.В. КАРЕВИНА,
И.Н. ВОЛОШИНА

СПОСОБИ ПОЛУЧЕННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ЛИЗОЦИМА

Описаны способы получения ферментного препарата лизоцима из животных, растительных объектов и микроорганизмов. Охарактеризованы рекомбинантные микроорганизмы Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, которые могут продуцировать лизоцим. Показана возможность создания рекомбинантных штаммов Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, способных продуцировать стафилококковый лизоцим, благодаря чему можно создавать новые композиции пробиотиков.

Ключевые слова: *лизоцим, фермент, рекомбинантный, способы получения лизоцима.*

Karevina V.,
Voloshyna I.

Methods for the Production of Enzyme Lysozyme

The methods for the production of enzyme lysozyme from animal tissues, plant biomass and microorganisms are described. The recombinant bacterial strains of *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum* were constructed for production of lysozyme. It was shown the construction of recombinant strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* producing lysozyme lysing cells of staphylococci. These strains could be used in the composition of new probiotics.

Keywords*: lysozyme, production, recombinant strain, lactobacilli, probiotics.*

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com