

Prof. Dr. EDWARD GALAS, Dr. STANISŁAW BIELECKI, Dr. TADEUSZ ANT CZAK, Politechnika Łódzka, Institut Biochemii Technicznej, Łódź, PLR

Termínem lytické enzymy je obecně označován systém biokatalyzátorů, které kontrolují proces biodegradace buněčné stěny. Spektrum účinnosti těchto systémů je určeno zastoupením jednotlivých enzymových aktivit, které jsou různé, jde-li o degradaci buněčné stěny bakterií, kvasinek, mycelií vláknitých hub, popř. stěny rostlinných buněk. V této souvislosti jsou klíčové enzymové aktivity jednotlivých systémů různé. Obecně lze říci, že lytické systémy jsou založeny na účinku muramidázy, jednotlivých typů glukonáz a mananáz, chitinázy, celololytických enzymů, nutná je i přítomnost proteáz a lipáz.

Lytické systémy hrají významnou úlohu v interakci makroorganismu s mikroorganizmem i vzájemné interakci mikroorganismů [1]. Kromě destrukce mikroorganismu, která je indukována degradací jeho buněčné stěny, lze za biologickou úlohu těchto systémů pokládat i jejich přesně kontrolovanou činnost v procesu výstavby buněčné stěny, tedy procesu, který podmiňuje růst buňky i její autoreprodukcii. Aplikace lytických systémů v laboratorní a průmyslové praxi umožňuje jemné otevření buňky, což je nutnou podmínkou izolace fragilních biopolymerů i funkčních struktur a komponentů [2, 3].

Chemoterapeutický význam těchto systémů ilustruje preparát lyzostatin, jehož baktericidní aktivita v případě populace *Staphylococcus aureus* je v porovnání s účinkem penicilinu až 10× vyšší [4]. V případě populace *Candida albicans* byl mykocidní účinek lytického systému (*Oerskovia xanthioneolytica*) znásoben přítomností amfotericinu B [5], což ukazuje na možnost vy-

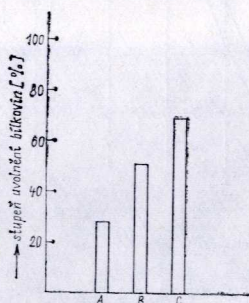
užití synergismu účinku lytických systémů a antibiotik. Zmíněný systém obsahoval α -mananázu, dvě β -1,3-glukanázy, β -1,6-glukanázu, chitinázu, β -glukozidázu a proteázu. Uvedené možnosti jsou zejména aktuální v souvislosti s léčbou mykóz kvasinkového původu.

Vývoj uvedené problematiky začíná izolací a popsáním účinku lysozymu (β -1,4-muramidázy, EC 3.2.1.17), který byl v roce 1922 izolován z vaječného bílku Alexandrem Flemingem. Spektrum účinku tohoto enzymu je omezeno na bakteriální buňky s dobře dostupným mukopeptidem. V této souvislosti jsou proto mnohem žádřejší komerční multienzymové systémy s širokým spektrem účinku. Příkladem mohou být preparáty s obchodním názvem „Lytic enzyme L1“ (BDH Chemicals) a preparáty „Lytic enzyme 2“ a „Lytic enzyme 3“, které vyrábí japonská firma Kyowa Hakko Kogyo [6]. Preparáty jsou mikrobiálního původu a mohou být aplikovány komplementárně [7]. Z nejnovějších preparátů lze uvést Novozym 234 (firma Novo), který je vícesložkovým enzymovým systémem produkovaným kmenem *Trichoderma harzianum*. Přítomnost α -1,3-glukanázy, laminarinázy, xylanázy, chitinázy, celololytických enzymů a proteázy podmiňuje, že tento preparát je použitelný pro biodegradaci stěn kvasinek, mycelií imperfektních hub a rostlinných buněk [8].

Stručně shrnuto, biodegradace buněčné stěny je předmětem zájmu v těchto souvislostech: a) enzymové odbourání stěny za definovaných podmínek je jednou z metodických možností studia struktury buněčné stěny; b) extracelulárně indukovaná biodegradace stěny je optimální metodou přípravy buněčných protoplastů;

c) biodegradace stěny je principem metody desintegrace buňky s možným použitím v laboratorní i průmyslové praxi.

Otázka optimálního způsobu biodegradace buněčných stěn je rovněž součástí problematiky přípravy tzv. bílkovin jednobuněčných organismů. V této souvislosti odstranění buněčných stěn znamená především odstranění těžko stravitelného polysacharidového komponentu, potenciálních alergenů i látek vyvolávajících imunitní odpověď konzumenta [9, 10]. V těchto případech je kontrolovaná biodegradace stěny nezastupitelná procesem autolýzy nebo chemickými metodami [11]. Důvodem jsou negativní stránky těchto způsobů, a to především délka procesu a toxicita získaných preparátů bílkovin. Chemické způsoby destrukce buňky negativně



Obr. 1. Stupeň uvolnění bílkovin v populaci *Candida utilis* procesem autolýzy (A), mechanické desintegrace (B) a účinkem lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228 (C)

Tabulka 1. Obsah sušiny a bílkovin v produktu 8 h enzymové destrukce buněk *Candida utilis* provedené při pH 6,5

		Intaktní buňky	Produkt
Sušina	g	17,55	11,2
	%	100	63,8
Bílkoviny	g	9,36	5,79
	%	100	61,9

ovlivňují i vlastnosti a nutriční hodnotu finálního bílkovinného produktu [10]. Destrukce stěny fyzikálními způsoby (ultrazvuk, vysokotlaková dezintegrace) je pro nákladné zařízení i drahý provoz preferována spíše laboratorní praxí [12].

Tyto důvody spolu se skutečností, že nadprodukce lytických systémů je pravděpodobně vlastností řady mikroorganismů [13, 14], motivují značný zájem o přípravu technických preparátů těchto enzymů.

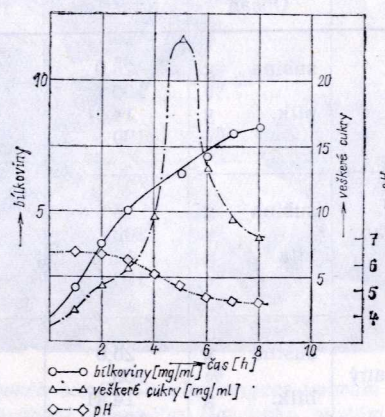
V této souvislosti následující část shrnuje výsledky experimentální práce Institutu technické biochemie v Lodži, která byla zaměřena na studium a aplikaci multienzymového lytického systému, který je extracelulárně produkován populací *Streptomyces* sp. 1228. Identifikovanými enzymy tohoto systému jsou β -1,3-, β -1,6-glukanáza, chitináza a proteáza [15, 16]. Jeho aktivita byla testována (po separaci z bezbuněčného filtrátu kultury producenta) v případě průmyslových kultur kmenů *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces uvarum*. Účinnost tohoto preparátu (ilustrovanou stupněm uvolnění bílkovinné složky) ukazuje ve srovnání s procesem autolýzy a mechanické dezintegrace buněk *Candida utilis* obr. 1. V nekontrolovaných pod-

Tabulka 2. Obsah sušiny a bílkovin v produktu enzymové destrukce buněk *Candida utilis* provedené při pH 6,5 (5 h) a pH 6 (3 h)

		Intaktní buňky	Produkt
Sušina	g	17,55	12,87
	%	100	73,3
Bílkoviny	g	9,36	6,85
	%	100	73,2

Tabulka 3. Obsah sušiny a bílkovin v produktu enzymové destrukce buněk *Candida utilis* provedené při pH 6,5 (5 h) a pH 8 (3 h)

		Intaktní	Produkt
Sušina	g	17,55	10,58
	%	100	60,7
Bílkoviny	g	9,36	7,29
	%	100	77,9



Obr. 2. Uvolnění bílkovinné a sacharidové složky v populaci *Candida utilis* vystavené účinku lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228 při neregulovaném pH

mínkách je proces biodegradace stěny a destrukce buňky provázen poklesem pH (obr. 2). Vzhledem k tomu, že snížení pH do oblasti hodnot izoelektrického bodu uvolněných bílkovin vede ke vzniku bílkovinných sraženin, byl celý proces sledován v prostředí s konstantním pH (obr. 3, tab. 1). Z hlediska množství uvolněných bílkovin je možno účinnost daného lytického systému zvýšit kontrolovaným snížením pH (obr. 4, tab. 2). Vzhledem k vyšší rozpustnosti bílkovin při vyšším pH je možno celkovou výtěžnost uvolněných bílkovin zvýšit i kontrolovaným zvýšením pH (obr. 5, tab. 3).

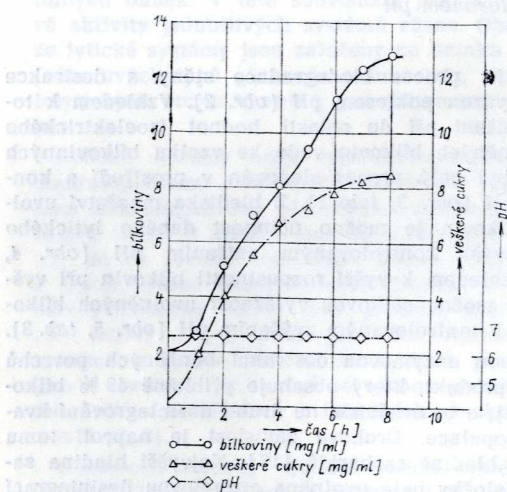
Sledovanou enzymovou destrukcí buněčných povrchů je získán produkt, který obsahuje přibližně 43 % bílkovin (tab. 4), a to nezávisle na druhu desintegrace kvasinkové populace. Druhá závislost je naproti tomu výrazná v hladině sacharidů [17]. Nejvyšší hladina sacharidové složky byla uvolněna enzymovou desintegrací pekařského droždí (26–37 %), nejnižší desintegrací odpadních pivovarských kvasnic (12–14 %). V této souvislosti bylo zároveň prokázáno, že hladina sacharidů (popř. celková hladina redukcujících látek) je v produktech enzymové destrukce buněk vždy vyšší ve srovnání

Tabulka 4. Obsah bílkovin, sacharidů a redukujících látek v intaktních kvasinkových buňkách a produktu jejich enzymové destrukce

Intaktní buňky Produkt	Bílkoviny N × 6,25	Sacharidy %	Redukující látky μg · g ⁻¹ suš.
Sacch. cerevisiae Produkt	48,3 39,4—46,7	49,1 26,3—45,4	5,5 8,4—29,0
Candida utilis Produkt	42,4 40,7—41,2	26,0 16,9—17,7	2,0 28,7—50,0
Sacch. uvarum Produkt	52,1 42,2—46,7	23,9 12,4—13,8	4,0 22,2—49,1

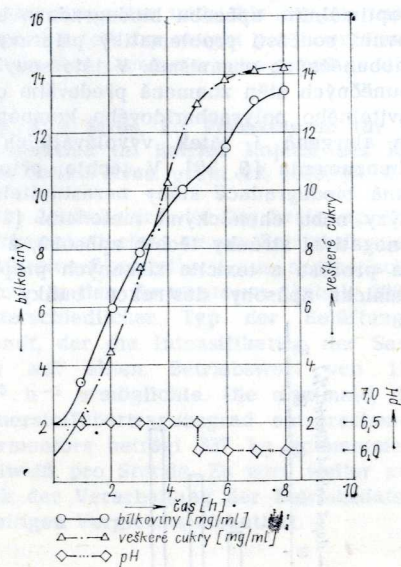
Tabulka 5. Obsah sušiny a bílkovin v produktu enzymové destrukce odpadních pivovarských kvasnic provedené v reaktoru s použitím rozpustné a nerozpustné formy lytického systému

Lytický systém	Obsah	Kvasnice	Produkt
Rozpustný	sušina g	26,0	17,03
	%	100	65,5
	bílk. g	14,41	10,32
	%	100	71,6
Imobilizovaný 1. použití	sušina g	26,0	17,61
	%	100	67,7
	bílk. g	14,41	10,11
	%	100	70,1
Imobilizovaný 10. použití	sušina g	26,0	16,88
	%	100	64,9
	bílk. g	14,41	10,40
	%	100	72,2

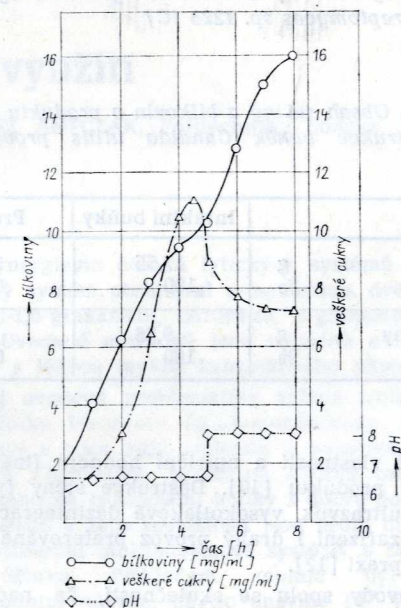


Obr. 3. Uvolnění bílkovinné a sacharidové složky v populaci *Candida utilis* vystavené účinku lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228 při regulovaném pH

s produkty mechanické desintegrace. Příčinou je enzymová degradace stěnových polysacharidů [tab. 4].

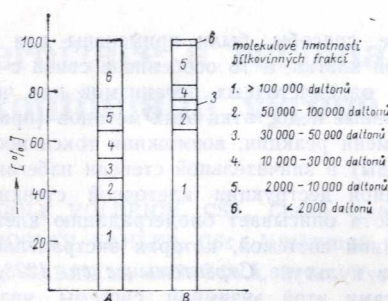


Obr. 4. Vliv kontrolované změny pH na uvolnění bílkovinné a sacharidové složky v populaci *Candida utilis* vystavené účinku lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228

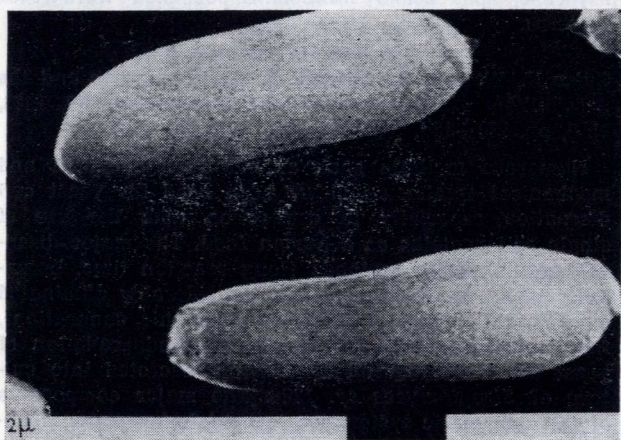


Obr. 5. Vliv kontrolované změny pH na uvolnění bílkovinné a sacharidové složky v populaci *Candida utilis* vystavené účinku lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228

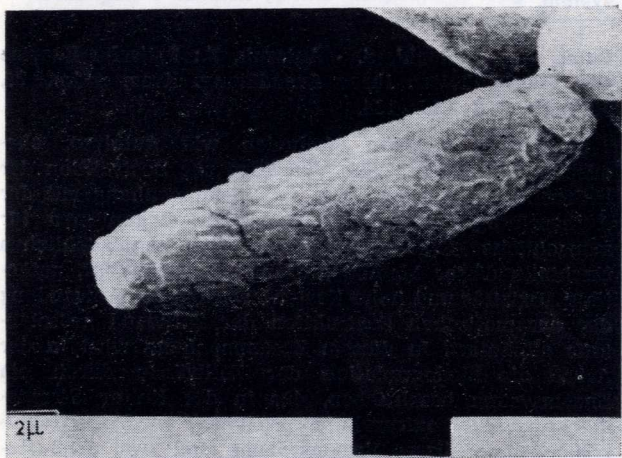
V podobné souvislosti lze upozornit na vliv proteolytické složky lytického systému, která sekundárně ovlivňuje zastoupení bílkovin jednotlivých molekulových hmotností ve finálním produktu. Vzhledem k tomu, že vliv této extracelulární proteolytické aktivity neexistuje při mechanické desintegraci, byly z hlediska zastoupení bílkovin jednotlivých molekulových hmotností porovnány produkty enzymové a mechanické destrukce



Obr. 6. Zastoupení bílkovin jednotlivých molekulových hmotností v produktu enzymové (A) a mechanické (B) destrukce kvasinkové buňky

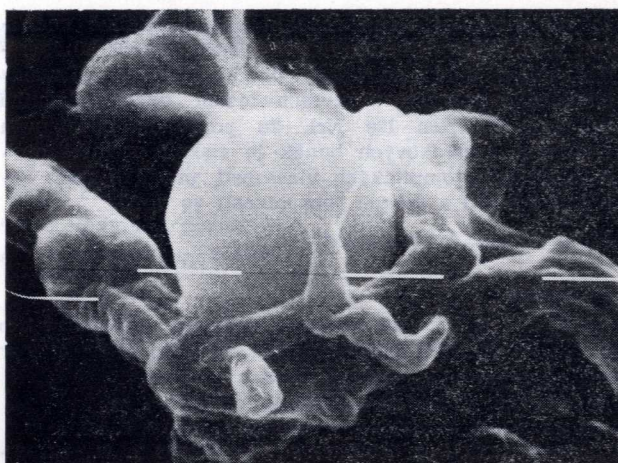


Obr. 7. Povrch buněk *Candida utilis*, které nebyly vystaveny účinku lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228

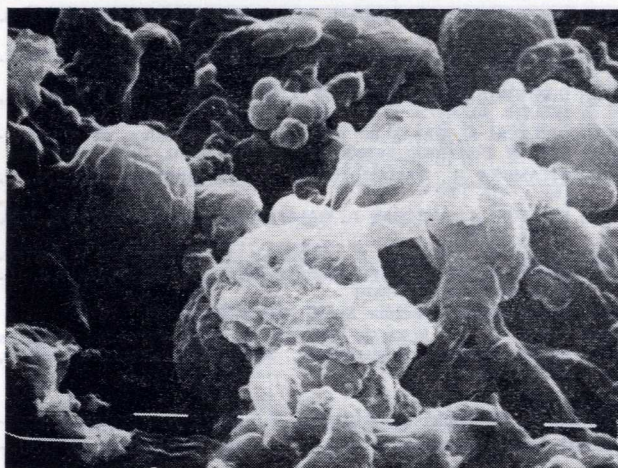


Obr. 8. Povrch buněk *Candida utilis* po 20 min působení lytického systému ex *Streptomyces* sp. 1228

buňky (obr. 6). Je zřejmé, že v produktu mechanické destrukce je přibližně dvojnásobná hladina bílkovin o molekulové hmotnosti nad 100 000 daltonů. Hladina bílkovin o molekulové hmotnosti 50 000–100 000 daltonů je v produktech obou typů desintegrace kvasinkových buněk přibližně stejná. V důsledku zmíněné proteolytické aktivity je však produkt enzymové destrukce kvasinkové buňky výrazně obohacen o bílkoviny [polypeptidy] nižších molekulových hmotností [2000–5000 daltonů].



Obr. 9. Povrch buněk *Saccharomyces uvarum*, které jsou v kontaktu s vázaným lytickým systémem *Streptomyces* sp. 1228



Obr. 10. Povrch buněk *Saccharomyces uvarum* po 20 min působení vázaného lytického systému *Streptomyces* sp. 1228

Studium extracelulární produkce lytického systému v kulturách *Streptomyces* sp. 1228 vedlo ke zjištění, že část uvolňovaného enzymového systému zůstává v trvalém kontaktu s buněčným povrchem producenta. Vzhledem k tomu, že tento povrchově vázaný lytický systém je z hlediska popsané aktivity rovněž funkční, byla sledována možnost přípravy preparátu imobilizovaného lytického systému, která by optimalizovala jeho použití [18]. Principem použití imobilizační metody je síťování povrchově lokalizovaných bílkovin glutaraldehydem. Maximální aktivita získaného preparátu je podmíněna teplotou 50 °C a pH 7,2. Účinnost tohoto imobilizovaného lytického systému byla sledována ve 2 l reaktoru s použitím odpadních pivovarských kvasnic jako substrátu. Koncentrace uvolněných bílkovin a sušiny byla v případě aplikace vázaného a rozpustného lytického systému přibližně stejná (tab. 5).

K těmto informacím lze dodat, že aktivita preparátu vázaného lytického systému je po 10násobném použití přibližně stejná jako aktivita rozpustného preparátu. Snadná separace vázaných lytických systémů z prostředí neumožňuje jen jeho opakované použití, ale znamená i možnost optimálně regulovat čas jeho působení.

Rastrovací elektronová mikroskopie ukazuje, že z mor-

fologicko-cytologického aspektu pravděpodobně neexistují základní rozdíly ve vlastním mechanismu biodegradace stěny. V této souvislosti obr. 7 až 10 ilustrují změny buněčného povrchu v prvních fázích biodegradčního procesu. Závěrem lze říci, že popsanou enzymovou destrukci kvasinkových buněk je získán produkt optimálních organoleptických vlastností, pevného nebo kapalného stavu s dobrou rozpustností ve vodě.

Přeložila Ing. Antonie Pazdro

Literatura

- [1] SZKLAR B. H.: Mikroorganizmy producenty biologiczewishch aktywnych wieszczech. Nauka i Technika, Minsk, 1973, s. 129
- [2] Patent RFN Nr 2003981, 1970
- [3] WISEMAN A.: Process Biochemistry, 1969, č. 5, s. 63
- [4] WARD I. B., PERKINS H. R., BIOCHEM. J.: 1968, č. 106, s. 69
- [5] MAXMILLAN I. D., CUFFARI G. L., JEFFRIES T. W., WILBER-MURPHY J.: IV th Intern. Symp. on Yeast, 1974, s. 25
- [6] Prospekt firmy Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokio, Japonska
- [7] Katalog firmy BDH Chemicals Ltd., Enzymes. s. 61
- [8] Prospekt firmy NOVO, Technical information TNO 18, 1981
- [9] OMSTEDT P. T., A. VAN DER DECKEN, G. HENDESKOG, H. MORGAN J.: Sci. Food Agric, 1973, č. 24 s. 1103
- [10] SHETTY K. J., KNISELLA I. E.: J. Food Science, 1979, č. 44, s. 663
- [11] VANANUVAT P., KNISELLA I. E.: J. Agric. Food Chem. 1975, č. 40, s. 732
- [12] CUNNINGHAM S. D., CARTER C. M., MATTIL K. F.: J. Food Sci., 1975, č. 40, s. 732
- [13] BIELECKI S., GALAS E.: Proc. Intern. Symposium on Bioconversion of Cellulosic substances. s. 203, Delhi, Indie, 1977
- [14] KITAMURA K., YAMAMOTO Y.: Archiv. Biochem. Biophys., č. 153, s. 413, 1972
- [15] BIELECKI S., ANTCHAK T., GALAS E.: Zeszyty Naukowe PL, 1980, č. 361, s. 212
- [16] GALAS E., BIELECKI S., ANTCHAK T., BLASZCZYK B., WIECZOREK A.: Proc. VI IFS. Canada, Fermentation Products, t. III. Academic Press (v tisku)
- [17] WRONOWSKI S.: Przem. Spoż., 1978, č. 32, s. 289
- [18] GALAS E., BIELECKI S., ANTCHAK T.: First European Congress on Biotechnology, Interlaken, Szwajcaria, Discussion papers, 1978, s. 118

Galas E., Bielecki S., Antczak T.: Lytické enzymy a možnosti jejich využití. Kvas. prům., 29, 1983, č. 6, s. 130—134.

Četné metody jako je autolýza, chemické a mechanické způsoby byly použity k destrukci kvasinkové buňky, a to zvláště v souvislosti s přípravou proteinů jednobuněčných organismů jako humánní potravy. Hlavní nevýhody těchto metod (dlouhá reakční doba, potenciální toxicita a vysoké náklady) jsou značně eliminovány v případě enzymové destrukce buněčné stěny. V této souvislosti tato práce popisuje biodegradaci kvasinkových stěn enzymovým systémem, který je extracelulárně produkován v kultuře *Streptomyces sp. 1228*. Hlavními komponenty tohoto enzymového systému jsou dvě β -1,3-glukanázy, β -1,6-glukanáza, chitináza a peptidáza. Uvolnění intracelulárních bílkovin a cukrů bylo sledováno ve vztahu k vlivu pH a času inkubace buněk s lytickým systémem. Experimentální práce byla dále zaměřena na studium aplikace imobilizovaného lytického systému.

Галас, Е., Бielecki, С., Анчак, Т.: Литические энзимы и возможности их использования. Клас. прум., 29, 1983, № 6, стр. 130—134.

Многие методы, как напр. автолиз, химические и ме-

ханические способы, были применены для деструкции дрожжевой клетки, и то особенно в связи с получением протеннов одноклеточных организмов как человеческой пищи. Главные недостатки этих методов (продолжительность времени реакции, возможная токсичность и высокие расходы) в значительной степени избегаются в случае энзимной деструкции клеточной стенки. В связи с тем работа описывает биodeградацию клеточных стенок энзимной системой, которая экстрацеллюлярно получается в культуре *Streptomyces sp. 1228*. Главными компонентами этой энзимной системы являются две β -1,3-глюканазы, β -1,6-глюканаза, хитиназа и пептидаза. Освобождение интрацеллюлярных белковых и сахаристых веществ исследовалось в отношении к влиянию pH и времени инкубации клеток с литической системой. Экспериментальная работа далее была направлена на изучение применения имобилизированной литической системы.

Galas E., Bielecki S., Antczak T.: Lytic enzymes and the possibilities of their application. Kvas. prům., 29, 1983, N. 6, pp. 130—134.

Numerous methods such as autolysis, chemical and mechanical treatments, have been used for yeast cell disruption, especially in connection with the use of single cell proteins as a human food. The major disadvantages of these methods (long reaction time, potential toxicity and high cost) are considerably eliminated by enzymatic lysis of cell walls. In this connection, this paper describes studies on the biodegradation of yeast cell walls caused by enzymes secreted into culture of *Streptomyces sp. 1228*. The major components of this enzymatic system are two β -1,3-glucanases, β -1,6-glucanase, chitinase and peptide hydrolase. The release of intracellular proteins and carbohydrates was followed in relation to the influence of pH and time of incubation of cells with lytic system. Further research was directed to the application of immobilized lytic system.

Galas, E. - Bielecki, S. - Antczak, T.: Lytische Enzyme und Möglichkeiten ihrer Ausnützung. Kvas. prům., 29, 1983, Nr. 6, S. 130—134.

Es wurden mehrere Methoden wie Autolyse, chemische und mechanische Vorgänge zur Destruktion der Hefezelle angewendet, insb. im Zusammenhang mit der Aufbereitung der Proteine einzelliger Organismen für menschliche Ernährungszwecke. Die hauptsächlichsten Nachteile dieser Methoden (lange Reaktionszeit, potentielle Toxizität und hohe Kosten) werden bei Anwendung der enzymatischen Destruktion der Zellwand größtenteils eliminiert. In diesem Zusammenhang wird in der Arbeit die Biodegradation der Zellwände durch ein Enzymsystem beschrieben, das in der Kultur *Streptomyces sp. 1228* extrazellulär produziert wird. Die Hauptkomponenten dieses Enzymsystems sind zwei β -1,3-Glucanasen, β -1,6-Glucanase, Chitinase und Peptidase. Die Freisetzung der Eiweißstoffe und Zucker wurde in Abhängigkeit von dem Einfluß des pH und der Dauer der Inkubation der Zellen mit dem lytischen System verfolgt. Die experimentale Arbeit war weiter auf das Studium der Applikation des immobilisierten lytischen Systems gerichtet.