

Antimikrobiální účinky lysozymu

Šárka Zavadilová

Bakalářská práce
2006

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Šárka ZAVADILOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Antimikrobiální účinky lysozymu**

Zásady pro vypracování:

1. Popište enzym lysozym. Zaměřte se na jeho chemickou strukturu, přirozený výskyt a antimikrobní vlastnosti.
2. Charakterizujte enzymy, včetně potravinářského hlediska.
3. Uvedte další látky s antimikrobními vlastnostmi, popište inhibiční účinky vybraných látek na potravinářsky významné mikroorganismy. Zaměřte se na strukturu buňky mikroorganismů a mechanismy inhibice růstu antimikrobiálními látkami.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

dle doporučení vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Leona Čechová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

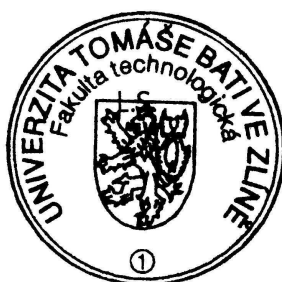
10. října 2005

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2006

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Popište enzym lysozym. Zaměřte se na jeho chemickou strukturu, přirozený výskyt a antimikrobní vlastnosti. Dále charakterizujte enzymy obecně, včetně potravinářského hlediska.

Uveďte další látky s antimikrobními vlastnostmi a popište jejich inhibiční účinky.

Zaměřte se na strukturu buňky mikroorganismů a mechanismy inhibice růstu antimikrobiálními látkami.

Klíčová slova: enzym, lysozym, bakterie, antimikrobní látky

ABSTRACT

The enzyme lysozym will be described with focus on its chemical structure, natural occurrence and antimicrobial characteristics. In next parts will be characterized microorganisms which caused food spoilage with emphasis on potential pathogenic bacteria.

Keywords: enzym, lysozyme, bacterie, antimicrobial substance

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Leoně Čechové Ph.D., za odborné vedení, ochotně poskytnuté rady a čas, který mi věnovala při vypracování mé bakalářské práce.

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 ENZYMY	10
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ENZYMŮ	10
1.2 ENZYMOLOGIE A JEJÍ HISTORIE	11
1.3 NÁZVOSLOVÍ ENZYMŮ	11
1.4 KLASIFIKACE A ROZDĚLENÍ ENZYMŮ	12
1.4.1 Oxidoreduktasy	12
1.4.2 Transferasy	12
1.4.3 Hydrolasy	13
1.4.4 Lyasy	13
1.4.5 Isomerasy.....	13
1.4.6 Ligasy	13
1.5 STRUKTURA A FORMY VÝSKYTU ENZYMŮ	14
1.5.1 Struktura molekul enzymů	14
1.5.2 Struktura kofaktorů	14
1.5.2.1 Kofaktory oxidoreduktás	15
1.5.2.2 Kofaktory přenášející skupiny atomů	16
1.5.2.3 Kofaktory lyas	17
1.5.2.4 Kofaktory isomeras	17
1.5.3 Aktivní centra enzymů	18
1.5.4 Enzymová kinetika	18
1.5.4.1 Vliv koncentrace substrátu a enzymu	19
1.5.4.2 Vliv faktorů vnějšího prostředí	21
1.5.5 Látky ovlivňující činnost enzymů	22
1.5.5.1 Typy inhibitorů a mechanismus jejich účinku	23
2 LYSOZYM	24
2.1 HISTORIE VÝZKUMU LYSOZYMU	24
2.2 DEFINICE A TŘÍDĚNÍ LYSOZYMU	25
2.3 STRUKTURA LYSOZYMU	26
2.4 MECHANISMUS PŮSOBENÍ LYSOZYMU	27
2.5 CHALOROPSIS – TYP LYSOZYMU (CH – LYSOZYM).....	31
2.6 VYUŽITÍ LYSOZYMU V PRAXI.....	32
3 BAKTERIE	34
3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ.....	34
3.2 TAXONOMIE BAKTERIÍ	35
3.3 BUNĚČNÁ STĚNA BAKTERIÍ.....	35
3.3.1 Peptidoglykan	36
3.3.2 Buněčná stěna grampozitivních bakterií	38

3.3.3	Buněčná stěna gramnegativních bakterií.....	39
4	ENZYMY V POTRAVINÁCH	40
4.1	DISTRIBUCE ENZYMŮ.....	40
4.2	ENZYMOVÉ HNĚDNUTÍ POTRAVIN	40
5	ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	41
5.1	INHIBICE SYNTÉZY BUNĚČNÉ STĚNY	42
5.1.1	Inhibiční účinky lysozymu	42
5.1.2	Inhibiční účinky β -laktamových antibiotik	42
5.1.2.1	Peniciliny a cefalosporiny	43
5.1.2.2	Proteiny s vazbou k penicilinu (PBP – penicilin binding proteins)	43
5.1.3	Další antibiotika narušující buněčnou stěnu bakterií	43
5.1.3.1	Vankomycin a teikoplanin	43
5.1.3.2	Bacitracin	44
5.2	KONZERVACE ORGANICKÝMI KYSELINAMI	44
5.2.1	Kyselina octová	44
5.2.2	Kyselina mléčná	45
5.2.3	Aplikace metody v praxi	45
5.2.4	Mléčné kvašení a jeho podmínky	46
5.2.4.1	Chemismus mléčného kvašení	46
5.2.4.2	Bakterie mléčného kvašení	46
	ZÁVĚR	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ	53

ÚVOD

O činnosti enzymů existují první zprávy již z 18. století. Enzymy jsou biokatalyzátory, které katalyzují většinu významných chemických reakcí probíhajících v živých organismech. Jedná se o jednoduché či složené bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi. Enzymy jsou nepostradatelné při metabolických procesech. Nachází se ve všech živých systémech a předpokládá se, že nejjednodušší buňky obsahují přes 3000 enzymů. Na činnosti enzymů je založena nejen veškerá existence života, ale uplatňují se i jako činitelé měnící tvář Země. Důsledkem této činnosti jsou např. obrovské vápencové útvary, zásoby uhlí, ropy, zemního plynu a okolo 400 bilionů tun kyslíku uvolněného rostlinami do zemské atmosféry. Po druhé světové válce nastal obrovský rozmach chemie biopolymerů, který umožnil i rozvoj poznatků o enzimech a vznik samostatného oboru – enzymologie.

Enzymy se pro svou vysokou katalytickou aktivitu a mimořádnou specifickou využívají v potravinářském průmyslu, kde umožňují za určitých podmínek selektivně modifikovat určitou složku potraviny, aniž podstatnějším způsobem změní složky ostatní.

Z enzymů má v potravinářství široké uplatnění lysozym, objevený Alexandrem Flemingem. Lysozym vykazuje velký antibakteriální účinek vůči bakteriím, narušuje vazby peptidoglykanu v buněčné stěně a způsobuje lyzi buněk. Nachází se v slzách, slinách, tělesných tkáních, rostlinných tkáních a ve velké koncentraci ve slepičím bílku, kde chrání vejce před proniknutím různých bakterií.

Dalšími látkami s antibakteriálním účinkem, způsobující inhibici buněk, jsou např. antibiotika. V potravinářském průmyslu se ke konzervaci různých potravin využívají některé organické kyseliny – kyselina octová, citronová, mléčná, sorbová atd. Používají se jako okyselující prostředky v nápojovém průmyslu, při konzervacích některých surovin atd. Konzervační prostředky mají hlavní úkol zabránit rozvoji nežádoucí mikroflóry. Tyto látky se tímto stávají součástí potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ENZYMY

1.1 Obecná charakteristika enzymů

Pro zajištění přísunu energie a stavebního materiálu z okolí a jejich využití pro provoz organismů a výstavbu jejich součástí se vytvořily složité sítě chemických dějů. Na řízení a koordinaci tohoto organizovaného a vysoce integrovaného souboru chemických reakcí a s ním spojených energetických změn se podílí pestrá řada biokatalyzátorů. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupinu tvoří bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi. Pokud urychlují chemické přeměny, nazývají se enzymy. Bílkovinám katalyzujícím procesy, při nichž nedochází k chemickým změnám, ale jen například ke změnám konformace, se říká kofaktory (např. iniciační, elongační a terminační faktory při proteosyntéze, hemo-koagulační faktory apod.) [1].

Enzymy se nachází ve všech živých systémech. Nejjednodušší buňky obsahují přes 3000 enzymů, které řídí rychlosti prakticky všech reakcí v nich probíhajících. Počet enzymů se odhaduje na miliardy. Enzymy, podobně jako jiné kategorie bílkovin, vykazují druhovou specifitu. Katalytickou funkci může vykonávat buď jednoduchá nebo složená bílkovina. Nebílkovinná část enzymů složených bílkovin se nazývá kofaktor. Enzymy urychlují reakce, aniž přitom ovlivňují složení rovnovážné směsi, neboť zvyšují rychlost reakce oběma směry. Směr průběhu reakce není ovlivněn katalyzátorem, ale je dán energetickými a koncentračními poměry v reagujícím systému [1, 19].

Přirozené enzymy předčí v mnoha směrech katalyzátory umělé: [1, 3]

1. Jsou účinnější. Jediná molekula enzymu je schopna za 1 s přeměnit až $5 \cdot 10^4$ molekul substrátu.
2. Vykazují značnou specifitu katalyzované reakce (reakční nebo účinková specifita) a také specifickou strukturu přeměňovaných substrátů (substrátová specifita).
3. Pracují většinou za mírných podmínek (teplota 20 až 40°C, tlak 0,1 MPa a pH kolem 7).
4. Jejich účinek lze snadno regulovat.
5. Jsou netoxické.

1.2 Enzymologie a její historie

O činnosti biologických katalyzátorů existují první zprávy již v 18. století. O existenci enzymů věděl již J. Berzelius, který v roce 1834 napsal, že v živočiších a rostlinách probíhají tisíce katalyzovaných reakcí. Tyto biokatalyzátory byly dříve nazývány fermenty. Označení enzym, které je z řeckého slova en zýme neboli v kvasnicích, pochází od W. Kühneho z roku 1878 [1, 3].

První popsany enzym byla amylasa ze sladu roku 1814, dalšími pak slinná amylasa a žaludeční proteasa pepsin. Koncem minulého století se začínaly formovat i první představy o mechanismu katalytického účinku enzymů. Kinetika jednosubstrátových reakcí byla zpracována E. Michaelisem a M. Mentenovou v roce 1913 [1].

Od roku 1926, kdy byla prokázána bílkovinná povaha enzymů, jsou tyto biokatalyzátory studovány v rámci chemie bílkovin. Dodnes bylo popsáno přes 3000 různých enzymů. Počet enzymů se známou strukturou a známým mechanismem jejich katalytických účinků neustále roste, a proto vznikl samostatný obor – enzymologie [1].

Enzymologie je samostatný studijní obor, jejichž nejdůležitější směry tvoří: [1, 3, 4]

- studium struktury enzymových molekul a výklad jejich funkce ve stereochemických pojmech,
- studium kinetiky enzymových reakcí,
- odvození detailních reakčních mechanismů enzymových reakcí,
- studium forem výskytu a lokalizace enzymů v živých systémech,
- studium vztahu enzymů k patologii organismů,
- používání enzymů k praktickým účelům,
- příprava a studium bioanalytických látek s katalytickou funkcí a konstrukce umělých enzymů.

1.3 Názvosloví enzymů

V prvních letech studia byly enzymy pojmenovávány triviálními názvy, většinou s koncovkou –in. Některé z nich se používají dodnes (př. pepsin, trypsin). Později byla zvolena koncovka –asa a název byl tvořen podle substrátu, jehož přeměnu enzym katalyzo-

val nebo podle charakteru katalyzované reakce. Enzymová komise Mezinárodní unie biochemie, z důvodů stále rostoucího počtu enzymů, zavedla v roce 1961 vedle doporučených triviálních názvů systémové (racionální) rozdělení a z něho vyplývající systémové názvy enzymů, v nichž je zahrnut substrát i typ katalyzované reakce. Názvy vycházejí ze systémového rozdělení enzymů do 6 hlavních tříd. Tyto třídy se dále rozdělují na soustavu podtříd, skupin a podskupin podle povahy katalyzované reakce, což umožní vytvoření čtyřmístného číselného kódu pro označení enzymů. Poslední číslo udává jeho pořadové číslo v podskupině [1, 4].

1.4 Klasifikace a rozdělení enzymů

Základem jednotné klasifikace a nomenklatury enzymů je jejich rozdělení do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce na oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy, ligasy [1, 3].

1.4.1 Oxidoreduktasy

Oxidoreduktasy katalyzují intermolekulové oxidačně redukční přeměny. Je to nejpočetnější třída enzymů typu složených bílkovin. Oxidoredukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku (pak se jim říká transhydrogenasy nebo dehydrogenasy) nebo elektronů (transelektronasy), případně vestavěním atomu kyslíku do substrátu (oxygenasy). Oxidoreduktasy se dělí na podtřídy podle funkčních skupin, které jsou donory vodíku nebo elektronů. Mají významné postavení v metabolismu, neboť se podílejí na četných odbourávajících procesech, na dýchání organismů a produkci energie [1, 3, 4].

1.4.2 Transferasy

Transferasy realizují přenos skupin atomů – radikálů, nebo celé velké části molekul mezi dvěma substráty, a to z donoru na akceptor [1, 4].

Přenášející skupinou může být methyl, aminoskupina, radikály různých kyselin, radikály monosacharidů, mononukleoidů a mnohé další. Transferasy jsou početná skupina enzymů typu složených bílkovin. Účastní se řady biosyntetických dějů. Na podtřídy se rozdělují podle charakteru přenášených skupin [1, 3].

1.4.3 Hydrolasy

Hydrolasy katalyzují hydrolýzu esterů, glykosidů, amidů, aminů, peptidů, bílkovin a některých dalších sloučenin. Mechanismus jejich účinků je přenos radikálu z hydrolyzovaného substrátu na vodu [4].

Hydrolasy jsou enzymy typu jednoduchých bílkovin a podílejí se na hydrolytickém rozkladu živin. Velmi často se připravují jako technické preparáty, např. různé hydrolasy mikrobiálního původu, jako plísňové amylasy štěpící škrob, bakteriální proteasy, hydrolasy živočišných orgánů a některé rostlinné hydrolasy [1, 4].

1.4.4 Lyasy

Lyasy katalyzují energeticky nenáročné nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C–C, C–O, C–N, atd. Podstatou účinku lyas je uvolňování (nebo naopak včleňování) malých molekul, jako je CO₂, H₂O, NH₃, aldehydu, kyseliny apod. Tyto molekuly bývají aktivovány vazbou na koenzym, např. CO₂ se aktivuje vazbou na biotin, který je součástí karboxylas. Lyasy jsou složené bílkoviny, tvoří málo početnou skupinu enzymů. V triviálních názvech jsou často označovány jako syntasy. Lyasy se podílejí na nejrůznějších metabolických pochodech jako je přeměna cukrů, tuků nebo aminokyselin. Dělí se na skupiny podle typu štěpných vazeb [1, 3, 4].

1.4.5 Isomerasy

Isomerasy katalyzují různé intramolekulární přesuny atomů nebo skupin atomů, tedy vzájemné přeměny isomerních sloučenin. Podle charakteru těchto sloučenin se dělí na racemasy a epimerasy, *cis-trans*-isomerasy, intramolekulární oxidoreduktasy, intramolekulární transferasy a další. Tvoří nejméně početnou třídu a jejich funkce spočívá v udržování rovnováhy mezi dvěma isomery [1, 4].

Jedná se o skupinu enzymů převážně jednoduchých bílkovin a jsou důležité v metabolismu cukrů. Pro realizaci svých funkcí většinou nepotřebují kofaktor [1, 4].

1.4.6 Ligasy

Ligasy katalyzují syntézu různých látek ze dvou molekul za současného rozkladu jiné látky uvolňující energii. Potřebná energie je obvykle dodávána rozkladem adenosintrifosfátu,

který se hydrolyticky štěpí buď na adenosindifosfát a fosfát nebo adenosinmonofosfát a difosfát. Ligasy jsou složené bílkoviny a v triviálních názvech se označují jako syntetasy [1, 4].

1.5 Struktura a formy výskytu enzymů

1.5.1 Struktura molekul enzymů

Enzymy patří mezi globulární bílkoviny, většinou jde o složené bílkoviny. Prvním enzymem, u něhož byla určena kovalentní struktura, byla v roce 1960 ribonukleasa z hovězího pankreatu. Molekula této hydrolasy, štěpící fosfodiesterové vazby v molekulách RNA, je tvořena jediným holým polypeptidovým řetězcem se 124 aminokyselinovými zbytky a čtyřmi disulfidovými můstky [1].

Součástí molekul povahy složených bílkovin jsou nízkomolekulové neaminokyselinové struktury nazývané kofaktory. Jejich funkce spočívá v přenosu atomů, jejich skupin nebo elektronů při biochemických reakcích, které enzymy katalyzují. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinnou složku enzymu, považuje se za stabilní součást molekuly a nazývá se prostetická skupina. Pokud je kofaktor s bílkovinnou složkou vázán jen slabě a může se od ní lehce oddělit (disociovat), nazývá se koenzym a daná bílkovinná složka apoenzym. Celý komplex s apoenzymem a koenzymem je holoenzym [1, 3].

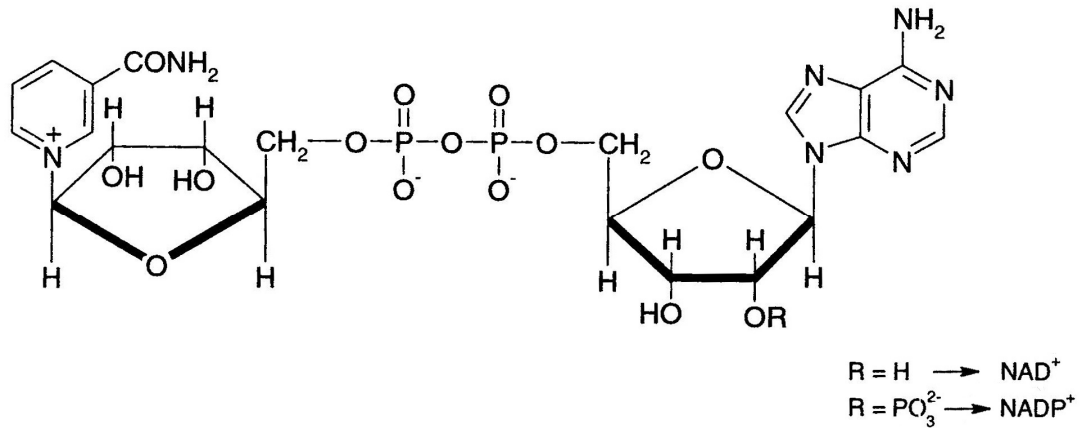
1.5.2 Struktura kofaktorů

Struktura kofaktorů byla objasněna mnohem dříve než struktura bílkovinných částí enzymů. Jde o látky různé chemické povahy, jejichž molekuly však většinou obsahují heterocyklus, který tvoří buď reaktivní část kofaktoru nebo má funkci rozpoznávacího prvku pro makromolekulu. Mnoho kofaktorů obsahuje jako podstatnou složku zbytek kyselin fosforečných, často vázaných v nukleotidu [1, 3].

Pro třídění kofaktorů je praktičtější hledisko funkcí než jejich chemické struktury [1].

1.5.2.1 Kofaktory oxidoreduktás

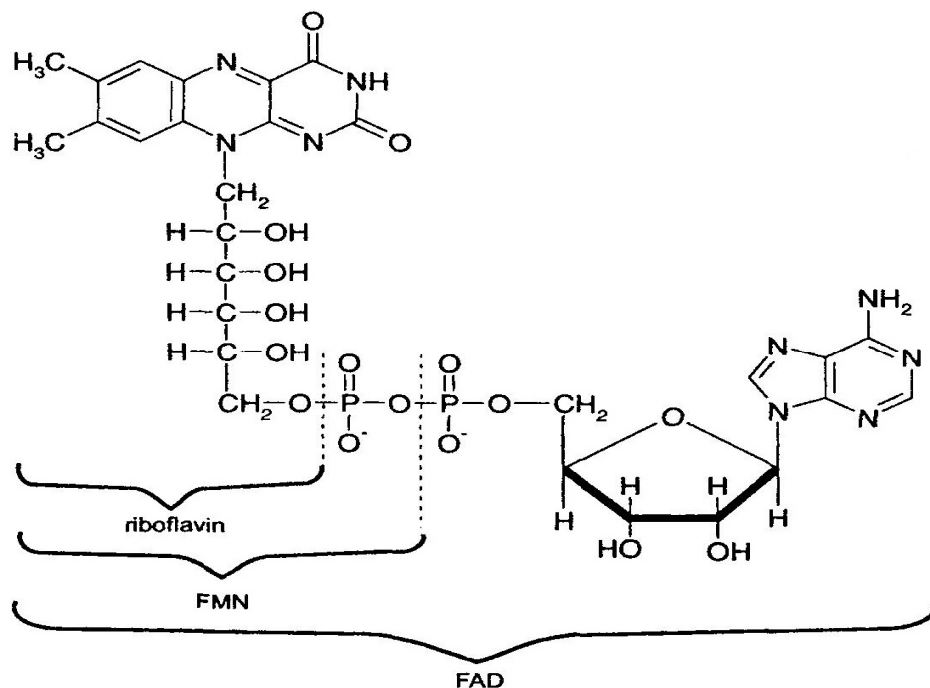
Do těchto kofaktorů patří pyridinové (nikotinamidové) (di)nukleotidy, jsou to nejdéle známé kofaktory nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP^+) [1, 3].



Obr. 1 Pyridinové kofaktory

Dále se zde řadí: [1, 3]

- flavinové nukleotidy, které mají strukturu flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadenindinukleotidu (FAD), jejich součástí je vitamin B₂ (riboflavin),

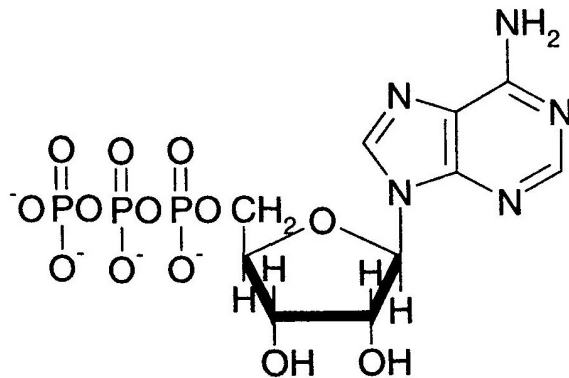


Obr. 2 Flavinové nukleotidy

- biopterin,
- α -lipoát, který byl objeven jako růstový faktor pro určité mikroorganismy,
- benzochinony s isoprenoidním postranním řetězcem fungující jako akceptory atomů vodíku,
- hem, jehož molekuly přenášejí samotné elektrony,
- ionty železa vázané přímo na bílkovinu,
- glutathion, který přenáší atomy vodíku vratnou přeměnou thiolové skupiny zbytku cysteinu na disulfid.

1.5.2.2 Kofaktory přenášející skupiny atomů

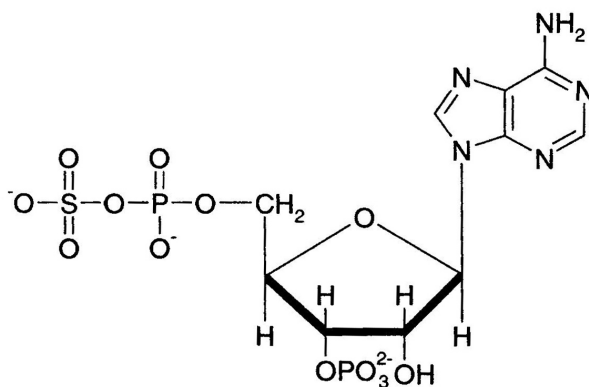
Do této skupiny se řadí adenosintrifosfát, který přenáší za odštěpení adenosindifosfátu fosforylovou skupinu $-\text{PO}_3^{2-}$ na hydroxylové skupiny alkoholů, na acyly nebo skupiny guanidylové [1, 3].



Obr. 3 Adenosintrifosfát

Dále se zde řadí: [1, 3]

- aktivní sulfát,



Obr. 4 Aktivní sulfát

- kofaktory přenášející jednouhlíkaté štěpy, mezi které řadíme adenosylmethionin neboli aktivní methyl, tetrahydrofoláty, methyltetrahydrofolát a biotin,
- kofaktory přenášející dvouhlíkaté štěpy,
- kofaktory přenášející aminoskupiny,
- kofaktory přenášející rozsáhlé struktury.

1.5.2.3 Kofaktory lyas

Na reakcích lyas se podílí mnohé skupiny aktivované vazbou na kofaktor. Důležitou skupinou lyas jsou dekarboxylasy. Na dekarboxylaci aminokyselin se podílí pyridoxalfosfát, na dekarboxylaci oxokyselin thiamindifosfát [1, 3].

1.5.2.4 Kofaktory isomeras

Isomerasy většinou nepotřebují kofaktory. Při isomeraci sacharidů jsou však často nezbytné uridindifosfát nebo pevně kovalentně vázaný NAD^+ . Při přesmycích, při nichž si atom vodíku vyměňuje místo se skupinou na sousedním uhlíkovém atomu, se uplatňuje jako kofaktor derivát vitamínu B_{12} 5'-deoxyadenosylkobalamin. Některé isomerasy používají jako kofaktor tripeptid glutathion [1, 3].

1.5.3 Aktivní centra enzymů

Enzymová reakce probíhá v malé oblasti enzymové molekuly, které se nazývá aktivní centrum nebo aktivní místo. Aktivní centrum obsahuje určité, přesně rozmístěné funkční skupiny, které jsou součástí postraních řetězců aminokyselinových zbytků a svinutím do typické prostorové struktury se dostávají do bezprostřední blízkosti, byť by byly v polypeptidovém řetězci od sebe dosti vzdálené [1, 3].

Na prostorovém zformování aktivních center se pravidelně zúčastňuje několik typů skupin. Jsou to: [1]

- a) katalyticky aktivní skupiny, které tvoří katalytické centrum,
- b) skupiny, které specificky vážou substrát a tvoří vazebné centrum,
- c) řada skupin, jejichž úkolem je vytvořit vhodné chemické prostředí v centru a jeho vhodnou prostorovou strukturu.

V případě hydrolas existují z hlediska prostorového zformování aktivního centra tři základní typy: [1, 3]

1. Aktivní centrum tvaru štěrbiny (pukliny) – hydrolasy polysacharidové, polypeptidové, polynukleotidové. Na vazbě substrátu s aktivním centrem se podílejí vodíkové můstky a hydrofobní interakce.
2. Aktivní centrum ve tvaru mělké povrchové prohlubně – jednotlivé vazby jsou v aktivním centru přerušovány přímo ve svazku řetězců, aniž by je enzym rozbaloval.
3. Aktivní centrum ve tvaru jamky – patří zde enzymy odštěpující koncové struktury biopolymerů.

1.5.4 Enzymová kinetika

Studiem časového průběhu enzymových reakcí za různých podmínek se zabývá enzymová kinetika [1].

Enzymově katalyzované reakce probíhají různou rychlostí a ta je závislá na: [4]

- a) koncentraci substrátu,
- b) množství enzymu,

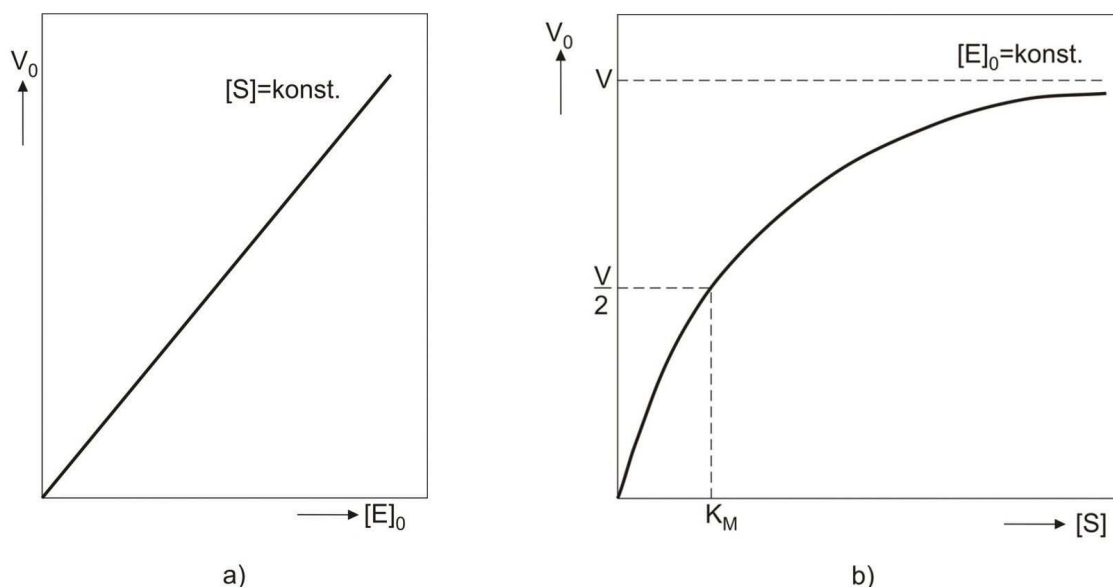
- c) fyzikálně chemických vlastnostech prostředí,
- d) přítomnosti efektorů (modifikátorů).

Při nejjednodušších enzymatických reakcích je přeměňován jediný substrát za vzniku jediného produktu. Tyto reakce se označují jako jednosubstrátové a je jich poměrně málo. Nejčastější jsou reakce dvousubstrátové, při nichž enzym katalyzuje přeměnu dvou substrátů, obvykle na dva produkty. Existují i reakce třisubstrátové, výjimečně i více-substrátové [1, 3].

1.5.4.1 Vliv koncentrace substrátu a enzymu

První kinetické měření enzymové reakce provedli L. Michaelis a M. L. Mentenová roku 1913. Měřili rychlost hydrolytického štěpení sacharosy na fruktosu a glukosu účinkem β -fruktofuranosidasy (invertasy) za různých podmínek. Odhalili dvě skutečnosti vypovídající o povaze enzymových reakcí [1, 3].

1. Byla-li počáteční koncentrace sacharosy udržována konstantní a měnilo se množství enzymu, byla závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci katalyzátoru lineární (obr. 5 a) [3, 4].
2. Při pokusech, kdy byla naopak udržována koncentrace enzymu konstantní a měnilo se množství substrátu, byla závislost počáteční rychlost na koncentraci sacharosy hyperbolická (obr. 5 b) [3, 4].



Obr. 5 a) Závislost počáteční rychlosti v_0 enzymové reakce na koncentraci enzymu, $[E]_0$, při konstantní koncentraci substrátu $[S]$

b) Závislost v_0 na koncentraci substrátu $[S]$, při konstantní koncentraci enzymu, $[E]_0$. Symbol V značí meznou rychlost a K_M Michaelisovu konstantu

Aby vysvětlili pozorované kinetické chování, navrhli Michaelis a Mentenová pro mechanismus jednosubstrátové enzymové reakce jednoduché obecné schéma [3].



Schéma vychází z představy, že meziproduktem reakce je komplex enzym – substrát $[ES]$, který se pak rozpadá na enzym $[E]$ a produkt $[P]$ [1, 4].

Křivka závislosti počáteční rychlosti na koncentraci substrátu při konstantní koncentraci enzymu (obr. 5 b) z hlediska schématu (1-1) se skládá ze dvou částí: při nízkých koncentracích substrátu jsou molekuly enzymu většinou volné a jen malá část je v komplexu, takže platí $[E] > [ES]$. Při vysoké koncentraci substrátu je veškerý enzym vázaný v komplexu ES a platí $[E] < [ES]$. Nasycení enzymu substrátem je dosaženo mezní rychlosti $v = V$. Křivka závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu vyjadřuje sycení enzymu substrátem a nazývá se jí saturační křivka [1, 3, 4].

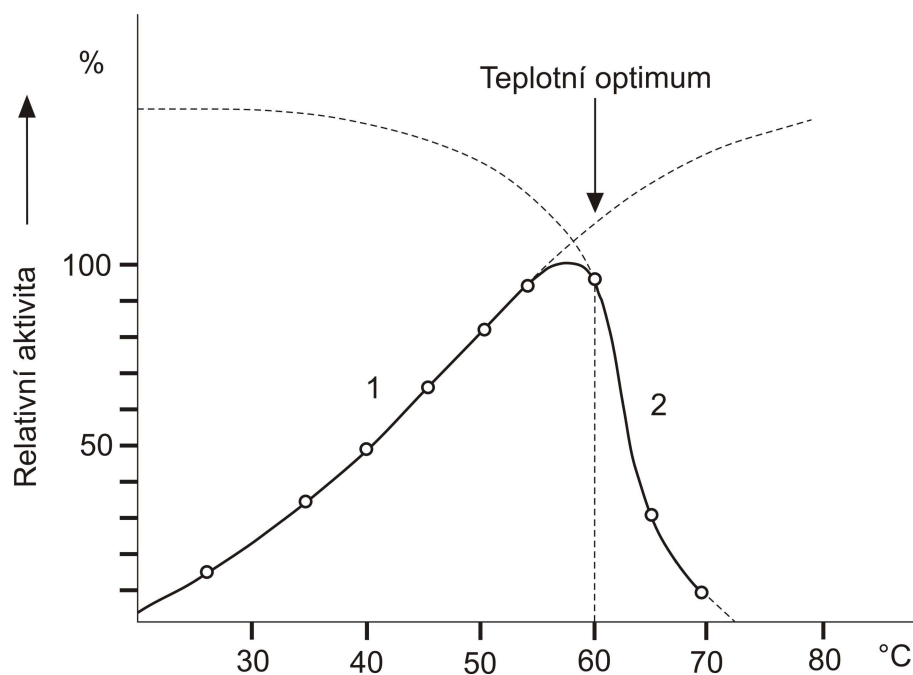
Závislost počáteční rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu vyjadřuje výraz

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]} \quad (1-2)$$

který se nazývá rovnice Michaelise a Mentenové, kde V je mezná rychlost a K_M Michaelisova konstanta [1].

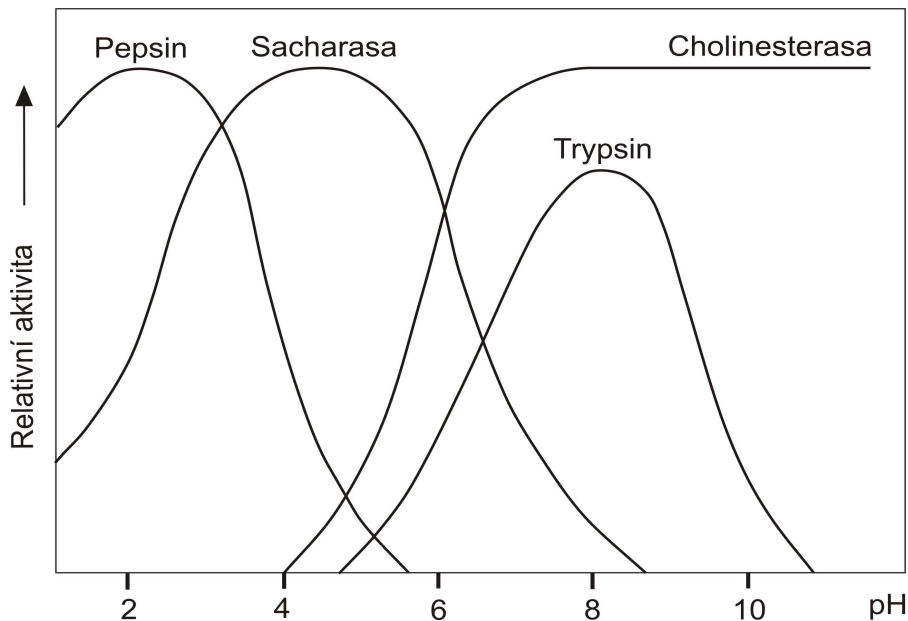
1.5.4.2 Vliv faktorů vnějšího prostředí

Rychlost enzymových reakcí vzrůstá s rostoucí teplotou. S růstem teploty však současně dochází k inaktivaci enzymů v důsledku denaturace jeho bílkovinné části a případně i odštěpení kofaktorů. Výsledkem těchto dvou protichůdných dějů je vznik závislosti s maximem, které se nazývá optimální teplota enzymu (obr. 6) [3].



Obr. 6 Závislost aktivity enzymu, vyjádřené počáteční rychlostí reakce v , na teplotě

Vlastnosti enzymů jsou závislé na pH prostředí. Většina enzymů proto působí jen v určité oblasti pH, mimo ni jejich účinnost klesá. Závislost rychlosti enzymové reakce na pH má tvar zvonové křivky. Jejím maximu odpovídá tzv. pH-optimum neboli optimální pH, v němž je aktivita enzymu nejvyšší. Optimální pH některých enzymů ukazuje obr. 7 [1].



Obr. 7 Závislost aktivity několika enzymů na pH prostředí

Aktivita enzymů může dále záviset na redoxpotenciálu prostředí, na jeho iontové síle a relativní permitivitě [1].

1.5.5 Látky ovlivňující činnost enzymů

Katalytickou činnost enzymů výrazně ovlivňuje celá řada látek, které se nazývají efekty neboli modifikátory. Zvyšují-li aktivitu enzymů, jde o pozitivní efekty neboli aktivátory (př. ionty kovů, organické látky). Látky, které snižují účinek enzymů, jsou negativní efekty neboli inhibitory (př. ionty, organické i anorganické látky, nízkomolekulové i vysokomolekulové látky). Efekty se dělí na přirozené, které jsou normální složky buněk (metabolity, koenzymy) a jsou důležité při regulaci buněčného metabolismu a na nepřirozené efekty, které jsou modelové látky a léčiva [1, 3].

1.5.5.1 Typy inhibitorů a mechanismus jejich účinku

Inhibitory lze dělit podle různých hledisek. Podle původu na přirozené a umělé, podle specifity účinku na specifické (působí jen na jeden nebo několik příbuzných enzymů) a nespecifické (vyvolávají inaktivaci mnoha různých enzymů) a podle mechanismu účinku (vztahu k vazbě substrátu a k jeho přeměně na produkt) [3, 4].

Inhibitory vyvolávající nejběžnější typy inhibice jsou:

- a) kompetitivní inhibitory – látky, které mají strukturu natolik podobnou substrátu, že je enzym nerozezná a vytvoří místo komplexu se substrátem inaktivní komplex s inhibitorem, který se nepřeměňuje na produkt,
- b) nekompetitivní inhibitory – neovlivňují vazbu substrátu na enzym, ale snižují rychlost přeměny na produkt,
- c) akompetitivní inhibitory – látky, které se mohou navázat na enzym, až když vazba substrátu vhodně pozmění jeho konformaci. Nereagují s volným enzymem, ale až s komplexem enzym-substrát. Vazbou na tento komplex zabraňují jeho přeměně na produkt a enzym.

2 LYSOZYM

2.1 Historie výzkumu lysozymu

Učebnice bakteriologie, která pochází z 19. století, již popisuje kultivaci bakterií ve slepičích vejcích. Laščenko, profesor hygieny na univerzitě v Tomsku, zkoumal v roce 1909 přístupnost vajec pro kultivaci mikroorganismů a objevil ničící účinky vaječného bílku. Zpozoroval, že obsah rozbitého slepičího vejce na nekryté skleněné desce při pokojové teplotě se vysušil bez hnití a vzniku páchnoucích plynů. Konstatoval, že bakterie obsažené ve vzdušném prachu nemají pro množení v bílku vhodné podmínky. V dalším experimentu demonstroval inhibiční činnost bílku na *Bacillus subtilis*. Dokonce vysoká koncentrace těchto bakterií byla usmrcena malým množstvím vaječného bílku. Ničící bakteriální síla bílku byla prokázána i pro *Bacillus anthracis* a další bakterie. Laščenko experimentálně vyloučil možnost usmrcení bakterií následkem hydrolýzy buněk nebo nedostatečnými nutričními podmínkami a uvedl, že vaječný bílek obsahuje enzymy proteolytického charakteru. V dalších letech také ostatní vědci zpozorovali antibakteriální činnosti vaječného bílku, ale nepodařilo se jim identifikovat mechanismus působení na bakterie [2].

Od roku 1900, několik vědců popsalo antibakteriální účinky slin a tělesných sekretů. Bloomfield vyšetřoval usmrcení bakterií v horních cestách dýchacích. Cílem jeho práce bylo získat více informací o dotykových nákazách a detailech šíření bakterií v dýchacích cestách. Pro usmrcení bakterií byl hlavní účinek přisuzován baktericidnímu efektu slinných a ústních sekretů [2].

Alexander Fleming, narozen v roce 1881 ve Skotsku, učinil podobný objev roku 1921. Tomuto objevu předcházela náhoda. Fleming zrovna trpěl rýmou a kapka z jeho nosu ukápla na agarovou plotnu, kde kultivoval bakterie. Kolem kapky se začaly kultury bakterií rozpouštět a Fleming zjistil, že nosní sekrety obsahují substanci způsobující lyzi buněk. Tuto substanci pak nazval „lysozym“ [2].

Své pozorování potvrdil ještě několika jednoduchými, ale velmi vynalézavými experimenty. Např. v jednom pokusu, kapku nosních slizů zředěnou se solným roztokem naočkoval na agarovou půdu, která byla hustě posetá *Micrococcus lysodeikticus*. Za 24 hodin po inkubaci došlo k pomnožení koků s výjimkou částí, které byly pokryty nosními slizy.

V dalším experimentu ke kapce zředěného nosního sekretu přidal 1 cm³ suspenze, která obsahovala *Micrococcus lysodeikticus* a během několika minut koky zcela zmizely [2].

Fleming ve svém prvním záznamu o lysozymu popisuje, že daný enzym je přítomen v lidských tělesných sekretech jako jsou slzy, nosní slizy, sliny a také v tělesných tkáních, zvláště chrupavce. Lysozym byl též nalezen ve zvířecích a rostlinných tkáních a ve velmi vysoké koncentraci ve vaječném bílku [2].

Lysozym obsažený v tkáních a sekretech ukázal rozdílný inhibiční účinek k různým mikroorganismům. Fleming poukázal na to, že lysozym je aktivní na řadu nepatogenních bakterií k člověku a též k některým patogenním bakteriím [2].

Kromě jeho významné práce ve výzkumu lysozymu byl nejvýznamnějším objevem sira Alexandra Fleminga a jeho spolupracovníků objev penicilinu a jeho léčivého účinku v různých infekčních onemocněních, za který byly v roce 1945 oceněni Nobelovou cenou [2, 28, 29, 30].



Obr. 8 Alexander Fleming

2.2 Definice a třídění lysozymu

Bakterie obsahují pevnou buněčnou stěnu, která jim poskytuje mechanickou ochranu. Chrání je před prasknutím kvůli jejich vysokému vnitřnímu osmotickému tlaku. Buněčná stěna bakterií je struktura rozmanité stavby a různého stupně složitosti u různých bakterií.

Základní složkou buněčné stěny je lineární polysacharid s peptidickými postranními řetězci zvaný peptidoglykan [2, 5, 6].

Lysozym je glykosidasa, která má baktericidní účinky a je schopna štěpit polysacharidové vazby mezi N-acetylglukosaminovými jednotkami a zbytku N-acetylmuramové kyseliny v buněčné stěně gram pozitivních bakterií. Gramnegativní bakterie nejsou náchylné k enzymatickému působení lysozymu, protože peptidoglykanová vrstva je chráněná vnější membránou [2, 5, 6].

Lysozym je široce zastoupen u všech organismů, od bakterií a bakteriofágů, přes houby, rostliny, až k obratlovcům [2].

Na základě určení aminokyselinového složení a katalytické aktivity lze struktura lysozymu rozdělit do čtyř různých tříd endo-N-acetylmuramidasy. Modely těchto tříd jsou: [2]

- lysozym slepičího bílku (HEWL),
- lysozym husího bílku (GEWL),
- lysozym bakteriofágu T4 (T4L),
- Ch - lysozym.

V 90. letech 20. století byla ustanovena klasifikace glykosyl-hydrolas řazených do skupin podle aminokyselinové podobnosti, poslední data obsahovala 91 skupin. Toto třídění bylo navrženo k tomu, aby mohly být sjednoceny rozdíly na strukturní úrovni enzymatického mechanismu a evoluční vztahy těchto enzymů [2].

2.3 Struktura lysozymu

Od Flemingova objevu sloužil lysozym jako model pro mnoho studií, a to zejména lysozym ze slepičího bílku (HEWL). V roce 1963 byla zveřejněna primární struktura HEWL a jen o dva roky později byla určena i trojrozměrná struktura. Lysozym ze slepičích vajec je tvořen jediným polypeptidovým řetězcem se 129 aminokyselinovými zbytky a byl prvním enzymem, který obsahoval všech obvyklých 20 aminokyselin [2, 3].

Molekula lysozymu je zhruba kulovitěho tvaru s nepolární vnitřní částí, která má podélnou štěrbinu tvořící rozsáhlé aktivní centrum. Aktivní centrum se táhne napříč celou molekulou

a vejde se do něj šest zbytků aminocukrů. Sekundární molekula lysozymu je tvořena polypeptidovým řetězcem, který je složen z pěti oddělených krátkých α -helikálních částí a jednoho úseku s antiparalelní β -strukturou. Tato doména byla první strukturou β -skládaného listu, která byla popsána i u globulárních proteinů. Ostatní části řetězce nejsou pravidelně uspořádané [2, 3].

Lysozym ze slepičímho bílku byl první enzym, pro který byl navrhnout detailní mechanismus činnosti založené na modelových stavebních studiích. Téměř 100 let výzkumu udělal z lysozymu jednu z nejlépe prostudovaných skupin enzymů, ale i přesto zůstává předmětem rozsáhlých pokračujících studií [2, 31].



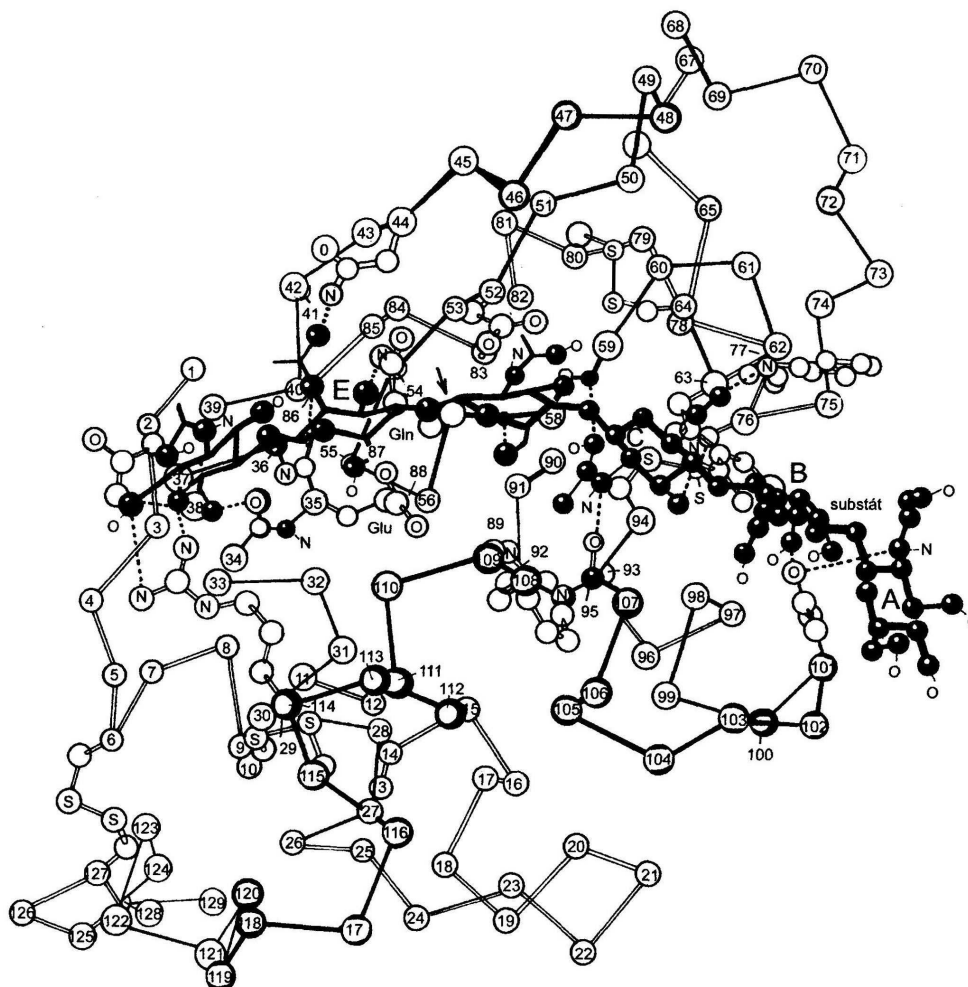
Obr.9 Prostorový model lysozymu

2.4 Mechanismus působení lysozymu

Hydrolýza β -1,4-glykosidické vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou (NAM) a N-acetylglukosaminem (NAG) může probíhat dvěma významnějšími mechanismy, které mají za následek buď celkové zadržení nebo obrácení konfigurace anomeru [2, 3].

HEWL slouží jako modelový enzym pro studie katalytického mechanismu glykosylhydrolas. Na základě strukturních dat byl pro HEWL navržen mechanismus, který zobrazu-

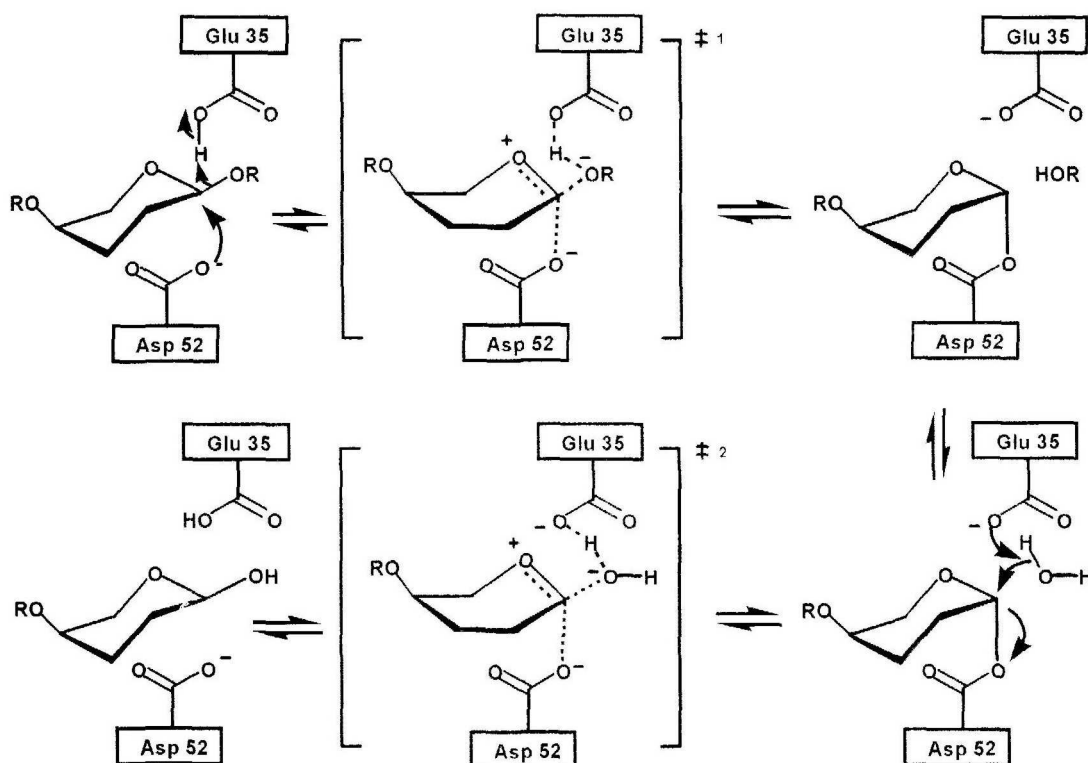
je obrázek 10. Enzym má šest vazných míst, přičemž každá ze šesti jednotek aminocukrů (ABCDEF) je v aktivním centru vázána vodíkovými vazbami. U zbytku D dochází ze sterických důvodů ke zhroucení židličkové konformace hexosového kruhu na položidličkovou. Označení F je pro navázání glykosidické jednotky ze substrátu. Štěpné vazby (hydrolyza β -1,4-glykosidické vazby C1-O) jsou umístěné mezi místy D a E a navázání substrátu v místě D je možné jen tehdy, jestli glykosid je zformovaný do položidličkové konformace. Kvůli této konformaci se změní anomer uhlíku (C1) na stejnou polohu jako C2, C4, C5 a pyranosového kyslíku. Předpokládaný sled dějů při katalytickém štěpení glykosidické vazby C1-O je následující. Glutamát 35, který je v nepolárním okolí, je proto při pH 5 protonován a funguje jako obecný kyselý katalysátor. Je donorem protonu, který se přesune na kyslíkový atom glykosidické vazby a vyvolá tak její přerušování. Tím dojde ke vzniku kladného náboje na atomu C1, z něhož štěpná vazba vycházela. Vznik tohoto karboniového iontu $C1^+$ je usnadněn distorsí hexosového kruhu zbytku D. Aspartát 52 je v polárnějším okolí než glutamát 35 a je v pH 5 záporně nabit a může proto stabilizovat karboniový iont elektrostatickou interakcí [2, 3].



Obr. 10 Rovinná projekce zjednodušeného modelu komplexu lysozymu ze slepičích vajec se substrátem. Kroužky s čísly značí jednotlivé aminokyselinové zbytky a čáry je spojující jsou peptidové vazby. Štěrba, tvořící aktivní centrum, se táhne horizontálně molekulou. Substrát, který ji vyplňuje je vyznačen tučně. Je to syntetický hexasacharid, jehož glukopyranosové kruhy stavebních jednotek jsou značeny písmeny A až F. Štěpná glykosidická vazba (mezi zbytkem D a E) je vyznačena šipkou.

Obrázek 11 zobrazuje reakční sekvenci ustanovenou pro glykosyl-hydrolasy. Katalytické mechanismy těchto enzymů zahrnují dva karboxylové řetězce. Glykosidický kyslík substrátu je donorem protonu kyseliny karboxylové, to jest Glu 35 v HEWL, který má za následek rozštěpení vazby. Takto vzniklý oxokarboniový iont ihned vytváří kovalentní esterové pou-

to s druhým karboxylovým řetězcem, a to s Asp 52 v HEWL. Ester je pak hydrolyzován molekulou vody z β -strany anomeru uhlíku. Tato reakce vede k vzniku síťové konfigurace anomeru [2].

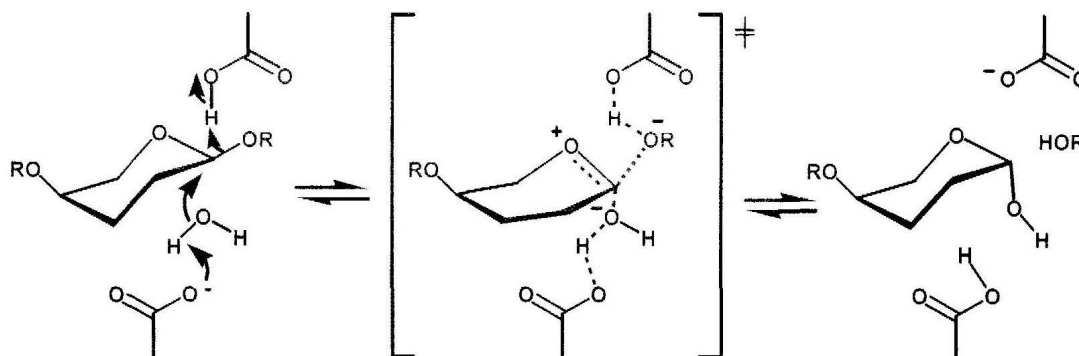


Obr. 11 Reakce sekvence glykosyl-hydrolasy mezi Glu 35 a Asp 52

Lysozym z různých organismů se liší nejen v jejich celkové struktuře, ale také v reakčních mechanismech. Zatímco HEWL je enzym, zachovávající konfiguraci, lysozym z husího bílku (GEWL) a lysozym bakteriofágu (T4L) hydrolyzují substrát obrácením uspořádáním. Substrátové vázání a aktivace převracějících se enzymů je velmi podobná s enzymy typu HEWL [2].

Reakční mechanismus lysozymu je velmi různý, a co je nejdůležitější, nezahrnuje kovaletní prostřední. Glykosidická vazba se štěpí kvůli protonu kyseliny karboxylové (Glu 73 v GEWL, Glu 11 v T4L). Molekula vody, zadržovaná v prostorovém sousedství anomeru atomu uhlíku, je aktivovaná vodíkovou vazbou ke karboxylové skupině, která slouží jako

katalytický základ. Voda atakuje anomer uhlíku z α -strany, což má pak za následek obrácení uspořádání, viz obr. 12 [2].



Obr. 12 Reakce sekvence invertující glykosyl-hydrolasy

GEWL postrádá zjevnou analogii k Asp 52 v HEWL nebo Asp 20 v T4L. Proto bylo navrhnuté, že reaktivní skupiny ze substrátu, to jest karboxylové skupiny z peptidového komponenta, se stabilizují na přechodný stav [2].

Lysozym, hydrolyzuje vazbu peptidoglykanu a štěpí jej na disacharidové jednotky. Spolu vytváří přirozenou odolnost živočišných tkání proti bakteriálním infekcím, neboť buňky bakterií zbavené peptidoglykanu snadno praskají a lyzují díky osmotickému přetlaku a jsou snadno fagocytovány [5, 8].

2.5 Chalaropsis – typ lysozymu (Ch – lysozym)

Skupina Ch – lysozymu byla pojmenovaná po prvním zástupci, který byl popsán a to lysozymu z houby *Chalaropsis*. Tento houbovitý enzym byl první mikrobiální lysozym, u kterého byla určena aminokyselinová sekvence [2].

Jako ostatní typy lysozymu, lysozym z *Chalaropsis* hydrolyzuje β -1,4-glykosidické vazby mukopeptidu ve stěně buněk [2].

Katalytický mechanismus Ch – type lysozymu je doposud neznámý, založený na chemické modifikaci experimentu, katalytická aktivita *Chalaropsis* lysozymu je přinejmenším částečně přisuzovaná zbytkům Asp 6 a Glu 33 [2].

Funkce bakteriálního lysozymu není plně vysvětlena. Tento enzym je nejspíše spojený s regulací peptidoglykanové syntézy. Díky schopnosti štěpit specifické vazby v peptidoglykanových kulovitých váčcích, dovolí novým peptidoglykanovým jednotkám, které mají být začleněny do buněčné stěny, změny tvaru a plochy povrchu. Způsob, jakým bakterie ovládá tyto potenciálně sebevražedné enzymy je ještě věcí diskuse. Bylo navrženo, že regulace bakteriálního lysozymu je vzájemně propojena s ostatními metabolickými drahami buňky jako odezva kontroly tepelného šoku buňky [2].

2.6 Využití lysozymu v praxi

Enzymy díky svým specifickým účinkům nacházejí uplatnění v nejrůznějších oblastech, z nichž mnohé nemají nic společného s biochemií ani jinou vědou o živých organismech. Např. analytická chemie užívá stále více enzymů jako specifických činidel pro stanovení různých látek. Enzymy mají využití při určování struktury molekul, v preparativní organické chemii, kde umožňují přípravu čtených látek ve velké čistotě, v lékařství. Největší zájem o technické enzymové přípravky má chemický a potravinářský průmysl (masný, pekařský, mlékárenský průmysl) [4].

V dnešní době se stále více lidé vrací k přirozeným potravinářským výrobkům. Proto se také zvýšil zájem o potravinářský průmysl na použití antimikrobiálních ochranných prostředků, které jsou přirozené. Ovšem mnoho přirozených antimikrobiálních látek má omezené spektrum aktivity a jsou účinné jen ve velmi vysokých koncentracích. Řešení tohoto problému je v použití kombinace různých látek, např. nisinu, produktu některých G^+ bakterií a lysozymu. Dalšími látkami využitelnými v kombinaci s lysozymem mohou být monoacylglyceroly [23].

Lysozym katalyzuje hydrolýzu peptidoglykanu v buněčných stěnách bakterií. Jeho aktivita je omezená jen na grampozitivní bakterie. Účinek na gramnegativní bakterie je nízký, protože buněčné stěny jsou chráněné vnější blánou, která poskytuje buňce ochranu. Etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) je chelatační činidlo, které se používá v různých potravinářských výrobcích. Předchází oxidaci a dalším zhoršujícím se reakcím. Má také antimi-

krobiální aktivitu a je schopná zvýšit aktivitu bakteriostatik a antibiotik. Je účinná zvláště proti gramnegativním mikroorganismům. EDTA zvětšuje aktivitu lysozymu, jenž díky ní může hydrolyzovat i tyto G^- mikroorganismy, které byly vůči němu odolné. Lysozym se zvýšenou aktivitou působí i proti *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes* [23].

Enzymy se využívají pro dekontaminaci půdy, dodávky vody, osobního a nemocničního vybavení, které bylo vystavené působením bakteriím, toxinům nebo virům. Pro dekontaminaci různých povrchů byl použit zapouzdřený enzym v obrácených micelách, jmenovitě lysozym. Použití zapouzdřeného enzymu má výhody oproti použití volného enzymu. Obrácené micely slouží jako způsob jak zvětšit koncentraci lysozymu a snížit množství vody. Velké množství vody může způsobit korozi povrchů, kde se znečištění bude s velkou pravděpodobností vyskytovat. Lysozym zapouzdřený v obrácených micelách, je efektivně využitý pro dekontaminaci povrchů z různých struktur, které byly kontaminované G^+ a G^- bakteriemi. Vhodnými podmínkami, se zničí až 98% bakterií. Dezintegrace a rozpad buněk je sice u použití zapouzdřeného enzymu pomalejší, ale kompletnější [24].

Další využití lysozymu je jeho umístění na povrchu SiO_2 , což má význam pro výrobu bílkovinného biočipu, které jsou navrženy k tomu, aby zachytily bakterie z pufru nebo vody. Díky lysozymu umístěného na tomto povrchu jsou absorbovány patogenní bakterie, způsobující otravy potravinami. Mezi bakteriemi zachycenými lysozymem jsou G^- bakterie *Escherichia coli* a G^+ *Listeria monocytogenes* [25].

Lysozym spolu s polymyxinem B, polyhistidinem, polyhistaminem, polylysinem a histidinem se užívají jako účinné prostředky pro zachycení bakteriálních endotoxinů, což je část bakterie *Escherichia coli*, vykazující určitou toxicitu [26].

3 BAKTERIE

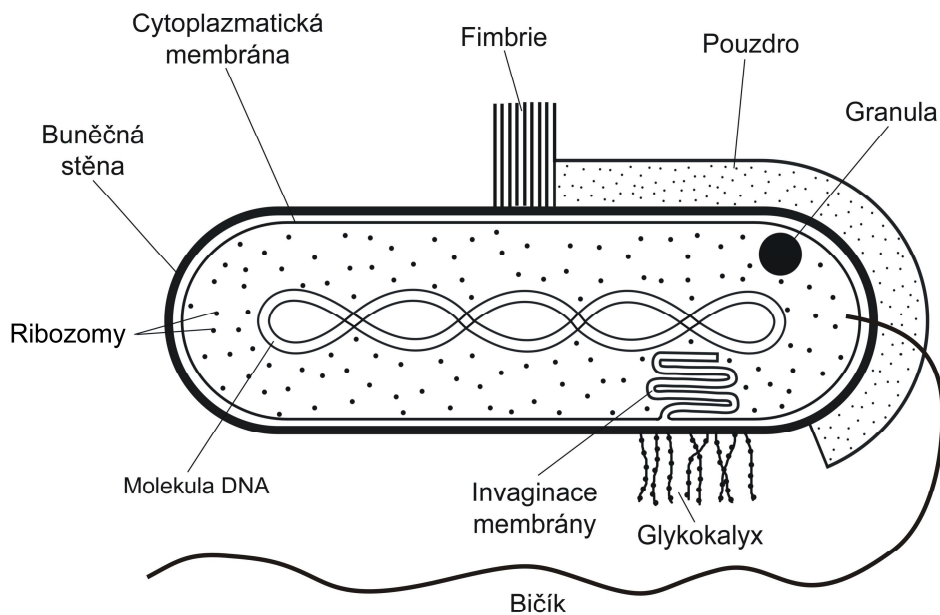
3.1 Obecná charakteristika bakterií

Nejmenší stavební jednotkou organismu je buňka, která je dále nedělitelná a schopná samostatného výkonu životních funkcí. Buňky tvořící organismy jsou dvojího konstrukčního typu – prokaryotická buňka (prokaryota) a eukaryotická buňka (eukaryota). Nejdůležitější rozdíl mezi oběma typy buněk je strukturní organizace jejich jádra. Do prokaryot řadíme bakterie, sinice a archea, do eukaryot všechny ostatní organismy [5].

Pro prokaryotické buňky platí tři charakteristiky, které je odlišují od eukaryotických buněk: [5, 9]

- a) organizace buněčného jádra – jádro prokaryot je tvořeno jedinou, dlouhou, složitě poskládanou a do kruhu uzavřenou dvojšroubovicovou molekulou DNA, na níž nejsou žádné histony ani bílkoviny,
- b) nepřítomnost buněčných organel – v prokaryotické buňce nejsou mitochondrie, chloroplasty, ani jiné organely obklopené membránou jak ukazuje obr. 13. Jedinou membránou je cytoplazmatická membrána na povrchu cytoplazmy,
- c) velikost ribozomů.

Bakterie jsou haploidní a množí se příčným rozdělením buňky následujícím po zdvojení jaderného materiálu [5, 9].



Obr. 13 Bakteriální buňka

3.2 Taxonomie bakterií

Základními taxony v bakteriologii jsou rod a druh. V případě bakterií se ještě jako vedlejší taxonomická kategorie používá taxon nižší než druh, nazývaný kmen. Vyšší taxony se používají málo. Rozlišeny byly jen taxony říše *Procaryotae*, která byla rozdělena na dvě oddělení, *Cyanobacteria* (sinice) a *Bacteria* [5, 7].

3.3 Buněčná stěna bakterií

Buněčná stěna je lokalizována nad cytoplazmatickou membránou bakteriální buňky. Jedná se o jediný pevný útvar v bakteriální buňce. Uděluje buňce tvar, mechanicky ji ochraňuje před vnějším prostředím, zvyšuje její chemickou odolnost, odolnost proti vyschnutí, záření a nepříznivým osmotickým podmínkám. Buněčná stěna neobsahuje enzymy a je přístupná pro molekuly [5, 8].

Stěnu bakteriální buňky lze rozrušit např. působením lysozymu, který ji hydrolyzuje, či penicilinu, který blokuje její syntézu. Tímto se získají obnažené buňky s cytoplazmatickou

membránou na povrchu – protoplasty (úplně zbaveny buněčné stěny) u grampozitivních a sferoplasty (obsahují zbytky buněčné stěny na povrchu) u gramnegativních bakterií. Tyto útvary jsou kulovitého tvaru a musí být v prostředí o vysokém osmotickém tlaku, aby nepraskly. Buňky mohou v prostředí o vhodném osmotickém tlaku přežívat, růst a množit se [5, 6, 12].

Buněčná stěna bakterií je struktura rozmanité stavby a různého stupně složitosti u různých bakterií. Základní složkou buněčné stěny je lineární polysacharid s peptidickými postranními řetízky zvaný peptidoglykan. Bakteriální buněčnou stěnu lze rozlišit na dva typy: buněčnou stěnu grampozitivních bakterií, která obsahuje jen peptidoglykan a teichoové kyseliny a buněčnou stěnu gramnegativních bakterií, která je složitější a obsahuje vysoké množství lipidů. V závislosti na přítomnosti lipidů se bakterie barví podle Grama. Gramnegativní bakterie (G^-) se odbarví podle Gramova postupu proto, že byly rozrušeny lipidy a postupně porušena integrita stěny. Kdežto u grampozitivních bakterií (G^+) nedochází k odbarvení, protože neobsahují lipidy a jejich tlustá vrstva peptidoglykanu se stane působením organického rozpouštědla ještě méně propustná pro molekuly barviva, než před tím [5, 6].

3.3.1 Peptidoglykan

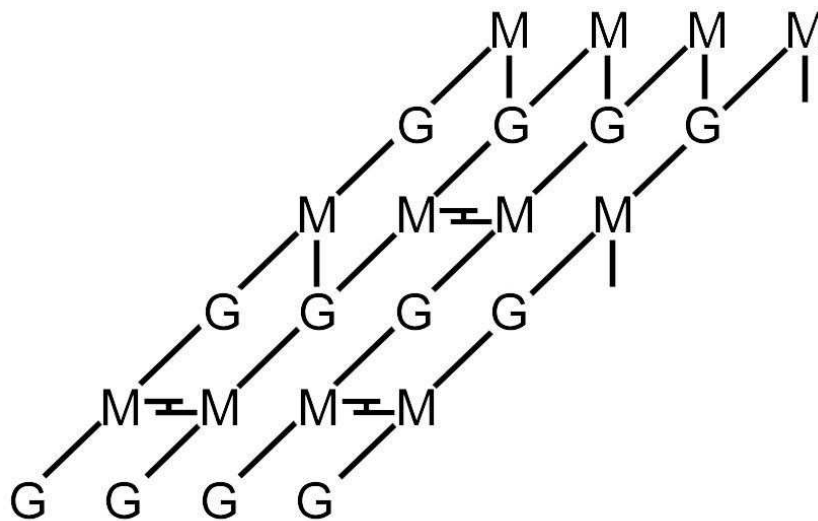
Peptidoglykan, zvaný též mukopeptid nebo murein, je specifická látka pro prokaryotické organismy. Je to lineární polymer dvou střídajících se aminocukrů: N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny spojených β -1,4 vazbou. Na karboxyl kyseliny muramové je navázán peptidickou vazbou řetězky čtyř aminokyselin. Tento tetrapeptid je tvořen aminokyselinami L-alaninem, D-glutamovou kyselinou, R- a D-alaninem. R- v tomto řetězci je jedna z aminokyselin: L-lysin, L-glycin, L-treonin, L-ornitin, L,L-diaminopimelová kyselina (DAP). DAP se specificky vyskytuje pouze v peptidoglykanu, proto např. penicilinová antibiotika, působící na syntézu peptidoglykanu, jsou méně toxická oproti jiným antibiotikům. Spojením lineárních řetězců se vytváří pevné síťoviny v několika vrstvách, které jsou pevnější u G^+ bakterií díky častějšímu propojení. [5, 8, 27].

Peptidoglykan je základní součástí buněčné stěny bakterií a je zodpovědný za její mechanickou pevnost [5, 8].

Biosyntéza peptidoglykanu je rozložena na tři hlavní etapy. Nejprve jsou v cytoplazmě přítomnými rozpustnými enzymy syntetizovány prekurzory, ty jsou dále rozpustným přenašečem přeneseny skrze membránu v tucích a posléze připojeny k peptidoglykanu tam, kde probíhá růst buněčné stěny [5].

Syntézu peptidoglykanu inhibuje několik antibiotik, z nichž nejznámější je penicilin. Tato antibiotika jsou terapeuticky velmi cenná, neboť jsou pro makroorganismy zcela netoxická. Je to dáno tím, že se peptidoglykan vyskytuje pouze v bakteriální buňce a nikoliv v buňce eukaryotické. Penicilin inhibuje tvorbu příčných vazeb mezi peptidovými řetízky peptidoglykanu. Peptidoglykan vznikající v přítomnosti penicilinu je mechanicky nedostatečně odolný [5, 6].

Antibiotika neovlivňují klidovou, nerostoucí bakteriální buňku, protože v ní neprobíhá syntéza peptidoglykanu. Jestliže však v přítomnosti některého antibiotik bakterie roste, dojde k její lyzi, neboť syntéza nového peptidoglykanu je blokována. Je-li v živém médiu, kde je přítomen penicilin, dostatečně zvýšen osmotický tlak, např. sacharosou, buňky nelyzují, ale zůstávají živé a funkční [5, 6].



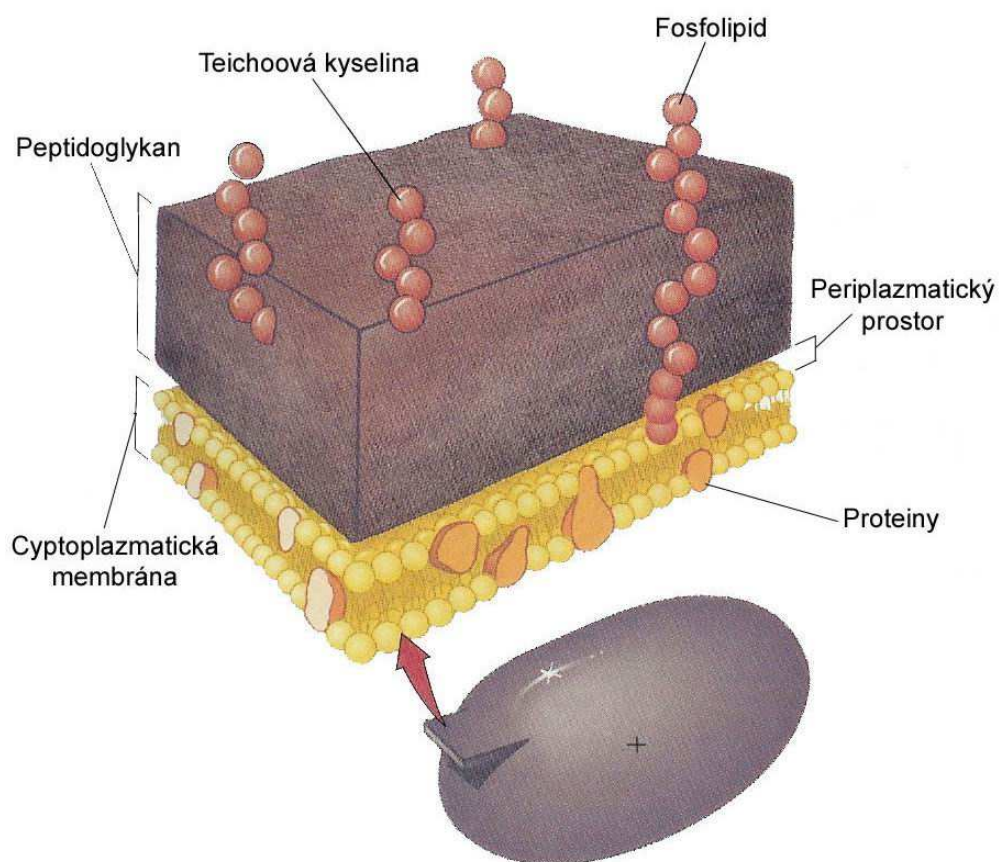
Obr. 14 Schéma struktury peptidoglykanů bakteriální stěny,

G – N-acetylglukosamin, M – N-acetylmuramová kyselina

3.3.2 Buněčná stěna grampozitivních bakterií

U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena peptidoglykanem a teichoovými kyselinami. Peptidoglykan tvoří 15 až 20 nm tlustý homogenní obal složený z mnoha lineárních vrstev, navzájem propojených řetězců. Skrze tuto vrstvu až na povrch pronikají lineární řetězce teichoových kyselin a kotví ji k cytoplazmatické membráně. Strukturu buněčné stěny grampozitivních bakterií ukazuje obr. 15 [5, 8].

Teichoové kyseliny jsou ve vodě rozpustné lineární polymery glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykosidicky vázanými cukry. Jsou kovalentně vázány k muramové kyselině peptidoglykanu. Teichoové kyseliny jsou hlavním povrchovým antigenem grampozitivních bakterií, ale jejich antigenní aktivita je větší po částečném odtrávení peptidoglykanu. Nepodílí se na pevnosti buněčné stěny. Jejich hlavní úloha je vazba kationtů v buněčné stěně a udržování vysoké koncentrace v sousedství cytoplazmatické membrány. Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy a bílkoviny [5, 6, 8].



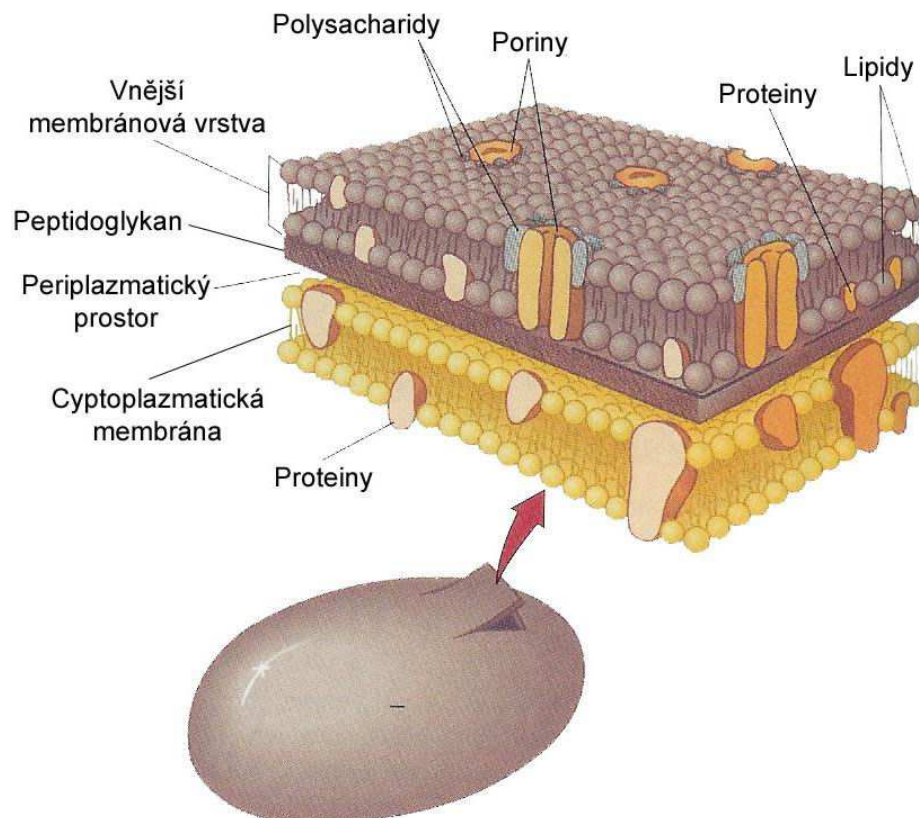
Obr.15 Schéma buněčné stěny grampozitivní bakterie

3.3.3 Buněčná stěna gramnegativních bakterií

Stěna gramnegativní bakteriální buňky je odlišná od grampozitivní. Je tenčí, méně hmotná a složitější, neboť je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu. Nad touto vrstvou je membrána složená z dvojvrstvy fosfolipidů a bílkovin vázaných po obou stranách této dvojvrstvy a nazývá se vnější membrána. Vnější membrána je kotvena k peptidoglykanu molekulami lipoproteinu a obsahuje lipopolysacharidy udělující bakterii antigenní specifitu jak ukazuje obr. 16 [5, 6].

K peptidoglykanu jsou kovalentně vázány molekuly specifického lipoproteinu vyčnívající ven směrem k vnější membráně [5].

Vnější membrána poskytuje buňce protichemickou ochranu. Propouští živiny a chrání buňku před lytickými účinky žlučových kyselin, enzymů, lysozymu, penicilinu. Činí gramnegativní buňku chemicky odolnější než buňku grampozitivní. Poskytuje i ochranu proti imunitní odpovědi hostitele. Vnější membrána je také nositelem interakce buňky. Jsou v ní specifické receptory pro fágy a koliciny [5, 8].



Obr. 16 Schéma buněčné stěny gramnegativní bakterie

4 ENZYMY V POTRAVINÁCH

V živých rostlinných pletivech a živočišných tkáních, stejně jako v mikroorganismech, se vyskytují enzymy, které způsobují nežádoucí biochemické procesy [13].

V konzervárenství se podle původu vyskytují tři druhy enzymů – enzymy původu rostlinného, živočišného a mikrobiálního. Nejfrekventovanější jsou enzymy rostlinné. Činnost enzymů umožňuje vývoj, zrání a rozklad plodů. Nejaktivnější jsou enzymy během zrání, kdy probíhá v plodech nejvíce biochemických a fyzikálně-chemických procesů [13].

Enzymy živočišného původu jsou především v mase a nevykazují takovou aktivitu jako rostlinné. Nejvýznamnější jsou enzymy štěpící tuky a způsobující chuťové a čichové závady v mase [13].

Působení mikrobiálních enzymů se negativně projevuje při mikrobiálních bombážích konzerv. Při biologické konzervaci (alkoholické, mléčné kvašení) je naopak činnost enzymů žádoucí [13].

4.1 Distribuce enzymů

Enzymy jsou přítomny v tkáních i subcelulárních organelách. Tato skutečnost je pro potravinářský průmysl velmi důležitá, neboť řada změn při zrání ovoce a zeleniny nebo zrání masa je řízená biochemickými reakcemi, resp. enzymy obsažených v těchto materiálech. Těchto reakcí je možné vhodnými podmínkami využívat a ovlivňovat tak vznik potraviny s lepšími nutričními i organoleptickými vlastnostmi (např. dozrávání ovoce v řízené atmosféře, zrání masa v kontrolovaných teplotních podmínkách apod.) [10].

4.2 Enzymové hnědnutí potravin

V potravinách rostlinného a živočišného původu dochází k reakcím enzymového hnědnutí při poškození buněk. Reakce se projevují vznikem hnědého zbarvení, jehož nositeli jsou pigmenty melaninového typu. Bývají zpravidla nežádoucími reakcemi v případech, kdy vedou k hnědnutí při zpracování potravin a skladování (hnědnutí jablek, brambor). V některých případech jsou tyto reakce v jistém rozsahu žádoucí, neboť vedou k tvorbě charakteristické barvy a aroma produktu (při fermentaci čaje, kakaových bobů, zrání červených vín) [11].

5 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobní látky jsou látky antibakteriální, antivirové, antimykotika, antiprotozoální a dokonce i antihelminatika. Pojem chemoterapie je většinou vyhrazen pro použití protinádorových látek [14].

Termín antibiotikum v úzkém slova smyslu se vztahuje k přirozeným produktům jednoho organismu, který inhibuje růst jiných. Podle této definice by chemické sloučeniny, jakou jsou sulfonamidy, chinolony, nitrofurany a imidazoly, měly být označovány jako chemoterapeutické látky. Protože se však některá antibiotika připravují synteticky a jiná chemickou změnou přirozeně se vyskytujících antibiotik (semisystetická antibiotika), je rozdíl poněkud nezřetelný a má pochybný význam. Antimikrobní látky, jež jsou tak toxické, že se mohou používat jen zevně nebo pro dekontaminaci prostředí, označujeme jako antiseptika nebo dezinficiencia [14].

V potravinářském průmyslu mezi nejběžnější klasické konzervační látky patří slabé organické kyseliny, např. kyselina octová, mléčná, benzoová a sorbová. Používají se jako okyselující prostředky v nápojovém průmyslu, při výrobě bonbónů a uplatňují se při konzervaci některých potravin (zeleniny, hub aj.). Molekuly těchto kyselin inhibují růst buněk bakterií i plísní a kyselině sorbové je připisován i účinek proti germinaci a růstu bakteriálních spor. V roztoku existuje pro organické kyseliny rovnováha závislá na hodnotách pH mezi nedisociovaným a disociovaným stavem. Tyto konzervační látky mají optimální inhibiční efekt při nízkých hodnotách pH, které podporuje nedisociovaný stav molekuly. V tomto případě je molekula volně permeabilní přes plazmatickou membránu a je takto schopna vstupu do buňky. Následně v důsledku styku s vyšší hodnotou pH uvnitř buňky molekula disociuje. Vznikají aniony a protony, které nemohou projít plazmatickou membránou a hromadí se v buňce. Inhibice bakteriálního růstu způsobená účinkem organických kyselin je zapříčiněna potlačením základních metabolických reakcí, akumulací toxických anionů a zátěží na intracelulární homeostázu pH [16, 32].

Mikrobiální rezistence na slabé organické kyseliny může zahrnovat řadu mechanismů. U bakterií jsou k dispozici vědomosti týkající se jejich vnitřní neindukovatelné rezistence na tyto sloučeniny. Grampozitivní bakterie nemají vnější membránu, a proto organické kyseliny mohou snadno vstupovat do nitra buněk grampozitivních bakterií a jejich vnitřní rezistence je relativně nízká. Gramnegativní bakterie mají díky složitější stavbě buněčné

stěny komplikovanější rezistenční mechanismy. V některých případech jsou mikroorganismy schopné degradovat konzervační látky specifickými enzymy [32].

5.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Bakterie mají na rozdíl od živočišných buněk silnou buněčnou stěnu, která je primárním cílovým místem selektivní toxicity, schopnosti inhibovat mikroba nebo ho usmrtit, aniž by byl poškozen hostitel. Bakteriální stěna však může zabraňovat přístupu látek, jež by v buňce jinak účinkovaly. Komplex vnějšího obalu gramnegativních bakterií je nepropustný pro velké hydrofilní molekuly, a tak jim zabraňuje dosažení citlivé cílové struktury [14].

Inhibitory syntézy bakteriální stěny zasahují při tvorbě peptidoglykanové vrstvy. Bakterie, které nemají peptidoglykan jsou přirozeně k těmto látkám citlivé [14].

Buněčná stěna bakteriální buňky je pro život bakterií velmi důležitá. Většina z jejích struktur se nevyskytuje v organismu člověka, a proto tvoří ideální cíl pro mikrobiální inaktivaci. Inhibice syntézy buněčné stěny je hlavním mechanismem účinku celé řady komerčních antibiotik. Byly identifikovány některé proteiny se schopností vázat penicilin [32].

5.1.1 Inhibiční účinky lysozymu

Ke konzervaci potravin se používají enzymy, které degradují buněčnou stěnu z vnějšku. Tuto schopnost splňuje lysozym. Lysozym hydrolyzuje β -1,4-glykosidické vazby v peptidoglykanu. Inhibiční aktivita tohoto enzymu je nejsilnější proti grampozitivním bakteriím, kterým chybí vnější membrána. Kombinace působení lysozymu, jenž hydrolyzuje buněčnou stěnu, nisinu, jenž narušuje membránu, a citrátu s chelatizačním účinkem je velmi účinná proti grampozitivním bakteriím. Gramnegativní bakterie mohou být vystaveny působení lysozymu teprve po poškození nebo odstranění vnější membrány, např. působením EDTA. Tato látka se vyznačuje chelatizačním účinkem, váže vápenaté ionty a tím naruší stabilitu lipopolysacharidů [32].

5.1.2 Inhibiční účinky β -laktamových antibiotik

Do β -laktamů patří látky, které mají v molekule β -laktamový kruh. Patří sem např. peniciliny, cefalosporiny, bacitracin a další. Všechny tyto látky se vážou na bílkoviny, které jsou na rozhraní buněčné stěny a membrány. Tyto bílkoviny vázající penicilin (PBP - penicilin

binding proteins) se účastní stavby buněčné stěny a tvorby zkřížených vazeb peptidoglykanových řetězců, jež zpevňují stěnu [14].

5.1.2.1 Peniciliny a cefalosporiny

Peniciliny a cefalosporiny zasahují do tvorby buněčné stěny prostřednictvím inhibice včlenění kyseliny glutamové, která umožňuje vznik síťovité struktury buněčné stěny a ovlivňuje její pevnost. Jsou také schopny aktivovat autolytické enzymy, které katalyticky obměňují peptidoglykan. Buňka pak následkem toho lyzuje. Účinek těchto antibiotik je pouze na bakterie ve stadiu růstu, a to čím rychlejší je jejich růst, tím lepší je jejich účinek a naopak. U nemnožících se buněk je působení antibiotik téměř nulové [17].

Benzylpenicilin (penicilin G) má na stafylokoky, streptokoky, spirochety a některé další bakterie účinek nesrovnatelný s jinými antibiotiky. Rezistence způsobená β -laktamázu (penicilináza) oslabuje jeho účinnost proti stafylokokům [17].

Cefalosporiny jsou příbuzné penicilinům. Mají větší odolnost k penicilináze, širší spektrum účinnosti, menší alergizační účinek a jsou neúčinné k enterokokům [17].

5.1.2.2 Proteiny s vazbou k penicilinu (PBP – penicilin binding proteins)

Zásah těchto β -laktamových antibiotik se projevuje v konečné fázi syntézy buněčné stěny, kdy se do hry dostávají enzymy, které umožňují zpevnění mureinu příčnými vazbami. Jelikož mají schopnost vázat penicilin a ostatní β -laktamy, označují se jako PBP – penicilin binding proteins. Schopnost vazby je dána podobností struktury β -laktamového kruhu a dipeptidu mureinu. β -laktam se váže na PBP a dochází k acylaci a inaktivaci, buňka se nedělí a hyne [17].

5.1.3 Další antibiotika narušující buněčnou stěnu bakterií

5.1.3.1 Vankomycin a teikoplanin

Mezi další antibiotika s účinkem na buněčnou stěnu bakterií řadíme vankomycin a teikoplanin. Patří mezi glykopeptidová antibiotika, která mají omezené spektrum na gram pozitivní bakterie. U citlivých mikrobusů rezistence většinou nevzniká, s výjimkou enterokoků. Obě antibiotika se s úspěchem používají při infekcích způsobených multirezistentními stafylokoky [14, 17].

5.1.3.2 *Bacitracin*

Toto antibiotikum je účinné proti grampozitivním bakteriím, ale při systémovém užití je příliš toxické. Je obsaženo v přípravcích pro zevní použití [14].

5.2 Konzervace organickými kyselinami

Konzervujícími organickými kyselinami se rozumějí kyseliny obsažené ve značnějším množství v ovoci nebo získávané ve velkém některými biologickými procesy – tedy kyselina citronová, vinná, jablečná octová a mléčná. Těmito kyselinami lze chránit potraviny před rozkladem pouze za určitých okolností a zpravidla na omezeně dlouhou dobu. Je nutné rozlišovat o jakou potravinu se jedná a jaké mikroorganismy v ní nebo na ní mohou vegetovat [18].

Většina bakterií nesnáší pH nižší než 4,0 až 4,3, kdežto rozvoj kvasinek, plísní a některých acidofilních bakterií zastavuje teprve silnější až velmi silné okyselení. Přitom jsou organické kyseliny často ohroženy některými mikroorganismy, které je využívají a tak prostředí postupně odkyselují. K potlačení některých mikroorganismů tedy stačí prostředí okyselit, a to k pH asi 4,0, nebo i vyššímu [18].

Podle schopnosti potlačovat činnost běžné acidofilní mikroflóry, lze nejobvyklejší organické kyseliny seřadit takto: kyselina octová, kyselina mléčná, kyselina citronová, kyselina vinná a jablečná (pořadí platí, pokud jde o pH i koncentraci kyseliny) [18].

5.2.1 Kyselina octová

Nejúčinnější organickou kyselinou je kyselina octová, která potlačuje mikroorganismy jednak tím, že reaguje s plasmatickou membránou, jednak tím, že konkuruje v enzymových reakcích zpracovávaným aminokyselinám. S klesajícím pH její účinnost roste. Vyšší než 4 až 6% koncentrace kyseliny octové působí na četné vegetativní formy bakterií letálně. Spory však snášejí i 6% koncentraci kyseliny octové velmi dlouho [18].

Antimikrobiální účinky kyseliny octové byly testovány na čerstvém mase a masných výrobcích. Dekontaminaci jatečného hovězího masa zkoumali užitím 1 % kyseliny octové. Tato kyselina byla aplikována ve formě spreje v intervalu 61 týdnů ve dvou provozních závodech. Tato koncentrace neměla vliv na redukci patogenů vyskytujících se na mase. Zanedbatelný bakteriostatický efekt měla také 1,5% kyselina octová, spolu s citronovou a

mléčnou na vepřovém mase. Studie zabývající se vlivem kyseliny octové na přítomné patogeny při ošetřování povrchu masa, uvádějí pouze určitou redukci růstu, ale inhibiční koncentrace zjištěna nebyla [20, 21, 22].

5.2.2 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je přírodní organická kyselina, kyselé chuti, lehce rozpustná ve vodě. Vzniká mléčným kvašením cukrů, například v mléce, sýrech, kyselém zelí [15].

Kyselina mléčná je nejdůležitějším zástupcem monokarboxylových hydroxykyselin. Má jeden asymetrický uhlíkový atom, a může se tedy vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách L(+) a D(-). L-mléčná kyselina je pravotočivá a bývá přítomna v mase a vnitřnostech, kde vzniká při tělesné námaze z glykogenu. Tvoří se také při mléčném kvašení cukrů, například mikroorganismem *Lactobacillus bulgaricus* [10].

Tato kyselina se používá v pekařství, pivovarnictví, koželužství, k přípravě limonád a při barvení a zušlechťování textilií. Pro své antiseptické vlastnosti se také používá v mastech, ústních vodách a jako prostředek k ošetřování vlasů [15].

Slabě cukerné roztoky a polotekuté hmoty mohou za vhodných podmínek mléčně zkvasit. Bakterie mléčného kvašení vytváří z cukru kyselinu mléčnou, jež chrání hmotu před ostatními mikroorganismy, které nesnášejí kyselé prostředí. Kyselina mléčná by sama o sobě v konzervaci, jakou mohou produkovat bakterie mléčného kvašení, ještě nestačila konzervovat. Nutným předpokladem její praktické účinnosti je vznik určitého množství kyseliny octové, etanolu a antibiotik [18].

Při konzervaci mléčným kvašením nejde pouze o tvorbu jediného hlavního konzervujícího činidla, ale o produkci a uchování několika látek, které se uplatňují v anaerobním prostředí [18].

5.2.3 Aplikace metody v praxi

Mléčného kvašení se využívá ke konzervaci krouhané zeleniny, hlavně zelí, které se dusá s přísadou jedlé soli a koření do vhodných jímek, kde kvasí pod vlastní šťávou. Dále ke konzervaci celých plodů – okurek, které kvasí pod zvlášť připraveným solným nálevem. Je rozšířeno i mléčné prokvašování krájených fazolových lusků i jiné zeleniny, kukuřičných klasů a hub. V teplejších oblastech je významná kvasná konzervace olivových plodů [18].

Běžně kyselé ovoce mléčně nekvasí, protože podléhá etanolovému kvašení. Ke konzervaci masa a jiných bílkovinných a málo cukernatých surovin se mléčné kvašení nepoužívá. V zemědělství je mléčné kvašení základem rozsáhlé výroby silážových krmiv [18].

Zelenina konzervovaná mléčným kvašením je jen podmíněně údržná. Pokud se potravina skladuje, musí být neustále kontrolovány a udržovány podmínky, které zabezpečí náležitou kyselost a teplotu. Krouhanou zeleninu je proto potřeba rychle spotřebovat nebo ji změnit doplňujícími zákroky na trvalou konzervu. Bez těchto opatření je jen polokonzervou [18].

5.2.4 Mléčné kvašení a jeho podmínky

5.2.4.1 *Chemismus mléčného kvašení*

Většina mléčných bakterií zpracovává všechny běžné cukry např. hexosy, pentosy, monosacharidy, disacharidy, glycerol apod. Škrob, celuloza a jiné nerozpustné sacharidy jsou vůči běžným formám mléčného kvašení odolné [18].

Rozlišujeme typické (čisté, homofermentativní) kvašení, kde je kyselina mléčná jediným hlavním produktem a kvašení smíšené (heterofermentativní), při němž vzniká i kyselina octová, oxid uhličitý, etanol a některé další, nepříjemně zapáchající látky [18].

Kvašení zeleniny zahajuje nejprve smíšený proces, který postupně přejde do hluboce okyselujícího homofermentativního kvašení [18].

Mezi vedlejší produkty mléčného kvašení zeleniny patří kyselina octová, která se tvoří v prvním období kvasného procesu. Její produkce je nutným předpokladem úspěšné konzervace. Dále se tvoří kyselina mravenčí, jantarová, propionová, valerová, kapronová. Pokud vznikne velké množství těchto kyselin, dojde k chuťovým poruchám nebo vadám aromatu. Další z vedlejších produktů kvašení je etanol. Podílí se na tvorbě esterů, jež doplňují aroma výrobku. Z plynů má význam oxid uhličitý, který pomáhá udržovat v kvasící hmotě a na jejím povrchu anaerobní podmínky [18].

5.2.4.2 *Bakterie mléčného kvašení*

Mléčné bakterie jsou skupinou bakterií, kterou spojují morfologické, metabolické a fyziologické vlastnosti. Jsou to nesporeující, mikroaerofilní koky nebo tyčinky s kyselinou mléčnou jako hlavním konečným produktem fermentace sacharidů. Za základ

skupiny se považují rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Nedávné taxonomické revize zařadily do skupiny mléčných bakterií ještě rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus*. Třídění mléčných bakterií do různých rodů je založeno hlavně na morfologických vlastnostech, způsobu kvašení glukosy, růstu při různých teplotách, prostorové konfiguraci mléčné kyseliny (D, L nebo obě formy), schopnosti růstu v přítomnosti vysoké koncentrace soli a na základě posouzení tolerance ke kyselému či bazickému prostředí [33].

ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo popsat enzym lysozym, jeho chemickou strukturu, přirozený výskyt a antimikrobní vlastnosti. Dále se zaměřit na látky s inhibičními účinky na potravinářsky významné mikroorganismy.

Lysozym byl objeven již kolem roku 1900 vědci, kteří zkoumali přístupnost vajec pro kultivaci mikroorganismů. Zpozorovali inhibiční činnost bílku na bakterie různého charakteru. Lysozym byl první enzym u něhož byla na atomické úrovni stanovena trojrozměrná struktura. Molekula je zhruba kulového tvaru s nepolární vnitřní částí, která má podélnou štěrbinu tvořící rozsáhlé aktivní centrum. Lysozym je typickým příkladem enzymů s aktivním místem tvaru štěrbinu.

Na základě určení aminokyselinového složení a katalytické aktivity se struktura enzymu lysozymu rozdělila do čtyř tříd: lysozym slepičího bílku, husího bílku, lysozym bakteriofágu a Ch-lysozym (z houby *Chalaropsis*).

Znalost struktury a aktivity lysozymu dala vědcům pohled k porozumění struktury a chování proteinů obecně. Téměř 100 let výzkumu udělal z lysozymu nejlépe prostudovanou skupinu enzymů. Dnes slouží jako předloha pro bílkovinné inženýrství. Lysozym nabízí i další výhody. Je v hojné míře zastoupen ve slepičích vejcích, která jsou levná, ve všech organismech, od bakterií, přes houby, rostliny, až k obratlovcům.

Další enzymy se využívají v potravinářském průmyslu při konzervaci potravin, neboť degradují buněčnou stěnu z vnějšku. Lysozym má schopnost hydrolyzovat glykosidické vazby v peptidoglykanu a štěpit jej na disacharidové jednotky.

Nejen lysozym se vykazuje antibakteriální činností. Další látky s inhibiční činností jsou antibiotika. V konzervářském průmyslu patří mezi nejběžnější klasické konzervační látky slabé organické kyseliny, např. kyselina octová, mléčná, benzoová. Molekuly těchto kyselin inhibují růst buněk bakterií i plísní.

Využití lysozymu v potravinářství je různorodé a rozmanité. Přidává se např. do masových výrobků, kvůli svému baktericidnímu účinku, kterým chrání potravinu před kontaminací bakteriemi. Nejvíce se využívá u výskytu grampozitivních bakterií, neboť degraduje jejich buněčnou stěnu, naruší membránu a buňky lyzují. U gramnegativních této hydrolyze zabraňuje vnější membrána, která buňce poskytuje protichemickou ochranu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie I*. Praha, Československá akademie věd, 1992. 184 str. ISBN 80-200-0438-6
- [2] HILGENFELD, R.; KLEMM, D. *The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution : Dissertation*. Chemisch – Geowissenschaftlichen Fakultät der Fridrich – Schiller – Universität Jena. 2005. 131 str.
- [3] VODRÁŽKA, Z.; RAUCH, P.; KÁŠ, J. *Enzymologie*. 3.vydání. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. 171 str. ISBN 80-7080-330-4
- [4] ŠÍCHO, V.; VODRÁŽKA, Z.; KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1998. 360 str.
- [5] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 603 str.
- [6] ROSYPAL, S. a kol. *Obecná bakteriologie*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1981. 749 str.
- [7] KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. Praha, Univerzita Karlova, 2000. 241 str.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983. 304 str.
- [9] ROSYPAL, S. a kol. *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia, spol. s.r.o., pedagogické nakladatelství, 2003. 797 str. ISBN 80-7183-268-8
- [10] DAVÍDEK, J.; JANÍČEK, G.; POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983. 632 str.
- [11] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Tábor, OSSIS, 1999. 368 str. ISBN 80-902391-5
- [12] GHUYSEN, J.-M.; HAKENBECK, R. *Bacterial cell wall*. Amsterdam, Elsevier, 1994. 581 str. ISBN 0-444-88094-1
- [13] ROP, O.; VALÁŠEK, P.; HOZA, I. *Teoretické principy konzervace potravin I: Hlavní konzervárenské suroviny*. Zlín, Univerzita Tomáše Bati, 2005. 130 str. ISBN 80-7318-339-0

- [14] GREENWOOD, D.; SLACK, C.B.R.; PEUTHERER, F. J. a kol. *Lékařská mikrobiologie – Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha, Grada Publishing, 1999. 690 str.
- [15] PIPEK, P. *Technologie masa II*. Praha, Karmelitánské nakladatelství, 1998. 360 str.
- [16] ČEPIČKA, J. *Obecná potravinářská technologie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. 246 str. ISBN 80-7080-239-1
- [17] LOCHMANN, O. *Základy antimikrobní terapie*. 2.vydání. Praha, Triton, 1999. 127 str. ISBN 80-7254-005
- [18] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1998. 512 str.
- [19] ELLIOTT, H. William; ELLIOTT, C. Daphne. *Biochemistry and molecular biology*. Oxford, University press, 2005. 582 str.
- [20] AVENS, J., CLAYTON, P., JONES, D., BOLIN, R., LLOYD, W., JANKOW, D. Acetic acid spray ineffective on beef carcasses with bacteria counts. *IFT Annual Meeting*, 1995, p.14. In: Smulders, F. J. M., Greer G.G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal Food Microbiology*, 1998, 44, str.149-169.
- [21] FU, A., SEBRANEK, J., MURANO, E. Microbial and quality characteristics of pork cuts from carcasses treated with sanitizing sprays. *Journal Food Science*, 1994, 59, str.306-309. In: Smulders, F. J. M., Greer, G.G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal Food Microbiol.*, 1998, 44, str.149-169.
- [22] MALÍKOVÁ, Z. *Vliv vybraných organických kyselin a a_w na rod Arcobacter: Diplomová práce*. Univerzita Pardubice. 2003.
- [23] BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90, str.421-433.

- [24]BERMUDER, O.; FORCINITI, D. Decontamination of surfaces by lysozyme encapsulated in reverse micelles. *Journal of Chromatography B*, 2004, 807, str. 95-103.
- [25]HUANG, T.; GENG, T. a kol. Lysozyme for capture of microorganisms on protein biochips. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33, str. 958-966.
- [26]HANORA, A.; PLIEVA, F.M. a kol. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. *Journal of Biotechnology*, 2005, 118, str. 421-433.
- [27]NAVAJO – otevřená encyklopedie. Peptidoglykan [on-line]. [cit 2006-03-20]. Dostupné z: <<http://peptidoglykan.navajo.cz/>>
- [28]Osobnosti [on-line]. [cit 2006-04-13]. Dostupné z: <<http://www.quido.cz/osobnosti/fleming.htm>>
- [29]The Nobel price internet archive [on-line]. [cit 2006-04-13]. Dostupné z: <<http://www.almaz.com/nobel/medicine/1945a.html>>
- [30]Mar Vista Animal Medical Center [on-line]. [cit 2006-04-13]. Dostupné z: <http://www.marvistavet.com/assets/images/Alexander_Fleming.gif>
- [31]Chemistry st the University of Ulm [on-line]. [cit 2006-04-13]. Dostupné z: <<http://www.chemie.uni-ulm.de/experiment/lysozym.gif>>
- [32]BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods. [on-line]. *Food microbiol*, 1999, 1-17 str. [cit 2006-04-19]. Dostupné z: <<http://www.maso.cz/aktual/a36.htm>>
- [33]Mc-czech. Bakterie mléčného kvašení [on-line]. 2002. [cit 2006-04-28]. Dostupné z: <<http://www.mc-czech.wz.cz/index.php?akce=clanek&ID=2>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfostát
FAD	flavinadeninukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HEWL	lysozym slepičího bílku
GEWL	lysozym husího bílku
T4L	lysozym bakteriofágu
NAM	N-acetylmuramová kyselina
NAG	N-acetylglukosamin
DAP	L,L-diaminopimelová kyselina
Asp	aspartát
Glu	glutamát
G ⁺	grampozitivní bakterie
G ⁻	gramnegativní bakterie

SEZNAM OBRÁZKŮ

- [1] Pyridinové kofaktory
- [2] Flavinové nukleotidy
- [3] Adenosintrifosfát
- [4] Aktivní sulfát
- [5] a) Závislost počáteční rychlosti v_0 enzymové reakce na koncentraci enzymu, $[E]_0$, při konstantní koncentraci substrátu $[S]$
b) Závislost v_0 na koncentraci substrátu $[S]$, při konstantní koncentraci enzymu, $[E]_0$. Symbol V značí meznou rychlost a K_M Michaelisovu konstantu
- [6] Závislost aktivity enzymu, vyjádřené počáteční rychlostí reakce v , na teplotě
- [7] Závislost aktivity několika enzymů na pH prostředí
- [8] Alexander Fleming
- [9] Prostorový model lysozymu
- [10] Rovinná projekce zjednodušeného modelu komplexu lysozymu ze slepičích vajec se substrátem
- [11] Reakce sekvence glykosyl-hydrolasy mezi Glu 35 a Asp 52
- [12] Reakce sekvence invertující glykosyl-hydrolasy
- [13] Bakteriální buňka
- [14] Schéma struktury peptidoglykanů bakteriální stěny, G – N-acetylglukosamin, M – N acetylmuramová kyselina
- [15] Schéma buněčné stěny grampozitivní bakterie
- [16] Schéma buněčné stěny gramnegativní bakterie