

Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms

Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos

Alma Carolina Gálvez-Iriqui, Maribel Plascencia-Jatomea*, Laboratory of Microbiology and Mycotoxins, Department of Food Research and Postgraduate, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales S/N, Colonia Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México; **Silvia Bautista-Baños**, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, CEPROBI 8, C.P. 62731, San Isidro Yautepec, Morelos, México. *Autor para correspondencia: maribel.plascencia@unison.mx

Recibido: 22 de Mayo, 2020.

Aceptado: 29 de Julio, 2020.

Gálvez-Iriqui AC, Plascencia-Jatomea M and Bautista-Baños S. 2020. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. Mexican Journal of Phytopathology 38(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-6

Primera publicación DOI: 11 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 11, 2020.

Abstract. Since lysozymes and enzymes-like lysozymes have antibacterial and antifungal activity, they are becoming attractive as new alternatives for controlling pathogenic microorganisms. Although the antimicrobial enzymes have been proposed in the food industry and crop protection, their use involves some disadvantages. These include the inactivation by inhibitors, chemicals, or processing conditions, the high production and purification costs, and problems of solubility and

Resumen. Dentro de las enzimas antimicrobianas reportadas, las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas procedentes de diversas fuentes naturales han mostrado actividad antibacteriana y antifúngica, haciéndolas atractivas como nuevas alternativas para controlar los microorganismos patógenos. Aunque las enzimas antimicrobianas se han propuesto ampliamente en la industria alimentaria y en la protección de cultivos, su uso implica algunas desventajas, como la inactivación por inhibidores o productos químicos o condiciones de procesamiento, los altos costos de producción y purificación, y problemas de solubilidad e inestabilidad. La tecnología de inmovilización enzimática es una herramienta prometedora capaz de reducir estos inconvenientes, particularmente cuando está destinada a trabajar en medios sólidos. Esta revisión muestra el estado del arte sobre la actividad de la lisozima contra bacterias y hongos, centrándose en los mecanismos de acción involucrados. Además, también se discuten los aspectos y características más

instability. Enzyme immobilization is a promising tool capable of reducing some inconveniences, mainly when it is intended to work in solid media. This review shows state of the art on the lysozyme activity against bacteria and fungi, focusing on its mechanisms of action. The most important aspects and characteristics of the antimicrobial lysozymes and their possible technological application, including the application of chitosan-based polymeric matrices for the immobilization of the antimicrobial enzymes, are also discussed.

Key words: Antimicrobial enzymes, nanomaterials, polymeric matrices, chitosan

Enzymes belong to a great diversity of molecules from natural origin, and within their attributes, some of them possess antimicrobial activity (Oh and Park, 2018). Enzymes present particular characteristics that make them excellent biologic catalysts and can accelerate the rate at which specific biological reactions are carried out to form or degrade a new product (Sheng *et al.*, 2016). In microorganisms, as in other types of living organisms, enzymes play an essential role to perform their biological functions such as cell division and cell development, defense, and adaptation to unfavorable conditions in a given environment (Gow *et al.*, 2017). On the other hand, the ability of the microorganisms to colonize specific habitats has led to the emergence of various economic and health problems worldwide (Gálvez-Irqui *et al.*, 2019). However, plants and organisms are not defenseless against the microbial offensive, since enzymes participate extensively in defense processes.

Currently, the antimicrobial enzymes that have been studied, are among others, the proteolytic, the oxidative, and those capable of hydrolyzing polysaccharides, including the

importantes de las lisozimas y su posible aplicación tecnológica, incluida la aplicación de matrices poliméricas a base de quitosano para la inmovilización de las enzimas antimicrobianas.

Palabras clave: Enzimas antimicrobianas, nanomateriales, matrices poliméricas, quitosano

Las enzimas pertenecen a una gran diversidad de moléculas de origen natural y, como parte de sus atributos, algunas poseen actividad antimicrobiana (Oh y Park, 2018). Las enzimas presentan características particulares que las convierten en excelentes catalizadores biológicos y aceleran la velocidad a la que se llevan a cabo las reacciones biológicas específicas para formar o degradar un nuevo producto (Sheng *et al.*, 2016). En los microorganismos, como en otros tipos de organismos vivos, las enzimas tienen un papel primordial en sus funciones biológicas, como la división y el desarrollo celular, la defensa y la adaptación a condiciones desfavorables en un ambiente dado (Gow *et al.*, 2017). Por otro lado, la capacidad que tienen los organismos de colonizar hábitats específicos ha dado como resultado el surgimiento de varios problemas económicos y sanitarios en todo el mundo (Gálvez-Irqui *et al.*, 2019). Sin embargo, las plantas y los organismos no están indefensos ante el ataque microbiano, ya que las enzimas tienen una amplia participación en los procesos de defensa.

Hasta ahora, las enzimas antimicrobianas que han sido estudiadas son, entre otras, las proteolíticas, las oxidativas y las que tienen la capacidad de hidrolizar polisacáridos, incluidas las amilasas, las liasas, Dispersin B y las lisozimas (Thallinger *et al.*, 2013). En particular, se ha reportado ampliamente la actividad de las lisozimas contra varios microorganismos debido a su capacidad de hidrolizar los polímeros presentes en la pared celular de

amylases, lyases, Dispersin B, and lysozymes (Thallinger *et al.*, 2013). In particular, the activity of lysozymes against several microorganisms has been extensively reported due to their ability to hydrolyze the polymers present in the bacteria cell wall, specifically those that belong to the Gram (+) group (Phillips, 1967). In recent studies, the ability of this enzyme to hydrolyze the cell wall of fungi and yeast has also been reported (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Its enhancement as an antibacterial and antifungal agent by combining them with other active compounds has been reported (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018a). Biopolymeric molecules such as chitosan have been used to prepare functional materials or composites formulated with lysozyme. Chitosan is a polycationic biopolymer capable of retarding or inhibiting bacterial and fungal development by interacting with cellular components present in the membrane and cell wall (Bautista-Baños *et al.*, 2016).

The lysozyme and chitosan combination has been used for developing materials in the form of solutions, films, fibers, hydrogels, and micro and nanoparticles, which have been proposed for controlling microorganisms within the fields of human health, agriculture, and food processing and preservation industry (Wu *et al.*, 2018a). Therefore, it is possible to assume that lysozyme alone or combines with chitosan is capable of acting on different biopolymer and peptides present in fungi and yeast cells inducing cell death or abnormalities during growth. Hence, the following review aims to present the most important aspects and characteristics of lysozymes and their technological applications as antimicrobial enzymes.

Lysozyme overview. Lysozyme or muramidase is part of the group of glycosidic hydrolases and catalyzes the hydrolysis of the β (1-4) bond between

las bacterias, específicamente aquellas que pertenecen al grupo Gram (+) (Phillips, 1967). En estudios recientes se ha reportado también la capacidad que tiene esta enzima de hidrolizar la pared celular de hongos y levaduras (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Asimismo se ha reportado su efectividad como agente antibacterial y antifúngico cuando se combina con otros compuestos activos (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018a). Las moléculas biopoliméricas como el quitosano se han utilizado en la preparación de materiales funcionales o de compuestos formulados a base de lisozimas. El quitosano es un biopolímero policationico capaz de retardar o inhibir el desarrollo de bacterias y hongos al interactuar con los componentes celulares presentes en la membrana y la pared celular (Bautista-Baños *et al.*, 2016).

La combinación de lisozimas y quitosano se ha utilizado en la fabricación de materiales en forma de soluciones, películas, fibras, hidrogeles y micro y nanopartículas, cuyo uso se ha propuesto para el control de microorganismos en los ámbitos de la salud humana, la agricultura y la industria de transformación y preservación de alimentos (Wu *et al.*, 2018a). Por tanto, es posible suponer que las lisozimas, solas o combinadas con el quitosano, pueden actuar en los diferentes biopolímeros y péptidos presentes en las células de los hongos y la levadura induciendo la muerte de la célula o anomalías durante el crecimiento. Por tanto, el objetivo de la siguiente revisión es presentar los aspectos y las características más importantes de las lisozimas y sus aplicaciones tecnológicas como enzimas antimicrobianas.

Información general sobre la lisozima. La lisozima o muramidasa forma parte del grupo de las hidrolasas glucosídicas y cataliza la hidrólisis del enlace β (1-4) entre la N-acetilglucosamina y el ácido

N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid of bacterial cell walls (Jana *et al.*, 2017). Its primary structure consists of one single polypeptide chain, which varies on the number of amino acid residues, 130 for the human lysozyme (hLyz), and 129 for the chicken lysozyme (cLyz) (Cao *et al.*, 2015). However, they are very similar in structure. The cLyz is an enzyme with 14.6 kDa and a high isoelectric point of 11.16 (Yu *et al.*, 2018). Meanwhile, the hLyz has 14.7 kDa and an isoelectric point of 9.28, however, aspartate-52 and glutamate-35 are the critical amino acids to the enzymatic activity (Cao *et al.*, 2015). Besides, the tertiary enzyme structure of both lysozymes has similarities, however, they differ in one beta region. Figure 1 shows the four alpha-helices, four random coils, and a double antiparallel beta-pleated sheet for human lysozyme, and a triple-stranded and antiparallel beta-pleated sheet for the chicken lysozyme (Strader, 2018). Generally, it folds into a compact and globular tertiary structure with a long slit on its surface (Sheng *et al.*, 2016; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018). The enzyme structure has six tryptophan (Trp-28, Trp-62, Trp-63, Trp-108,

N-acetilmurámico de las paredes celulares de las bacterias (Jana *et al.*, 2017). Su estructura primaria está formada por una cadena polipeptídica simple cuyo número de residuos de aminoácidos varía: 130 en la lisozima humana (hLyz) y 129 en la lisozima de pollo (cLyz) (Cao *et al.*, 2015). Sin embargo, ambas tienen una estructura muy similar. La cLyz es una enzima con 14.6 kDa y un alto punto isoeléctrico de 11.16 (Yu *et al.*, 2018), en tanto que la hLyz tiene 14.7 kDa y un punto isoeléctrico de 9.28; sin embargo, el aspartato-52 y el glutamato-35 son los aminoácidos esenciales en la actividad enzimática (Cao *et al.*, 2015). Además, la estructura terciaria de la enzima de ambas lisozimas es similar, pero difiere en una región beta. En la Figura 1 se muestran los cuatro hélices alfa, las cuatro bobinas aleatorias y una doble hoja beta plegada y antiparalela de la lisozima humana y una hoja beta plegada trenzada y antiparalela de la lisozima de pollo (Strader, 2018). En general, la lisozima se pliega en una estructura terciaria compacta y globular con una larga hendidura en su superficie (Sheng *et al.*, 2016; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018). La estructura de la enzima tiene seis triptófanos (Trp-28,

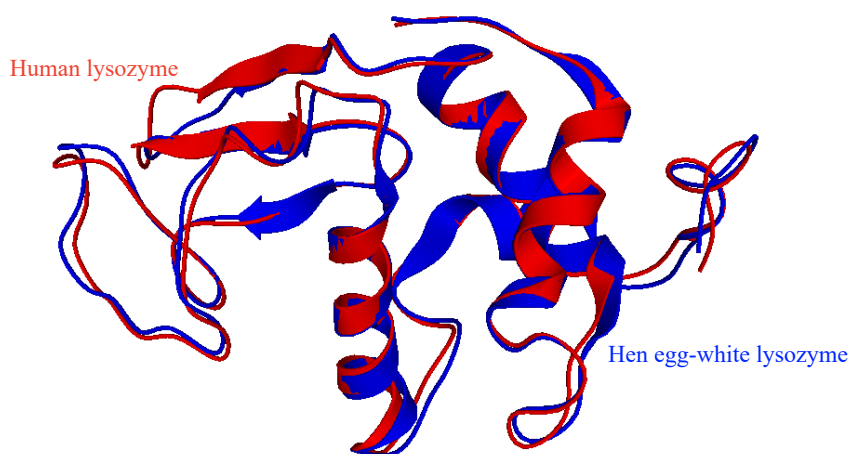


Figure 1. Tertiary structure of human (red) and egg-white (chicken, blue) lysozyme (Strader, 2018).
Figura 1. Estructura terciaria de la lisozima humana (rojo) y de la lisozima de clara de huevo (pollo, azul) (Strader, 2018).

Trp-111, and Trp-123) and three tyrosines (Tyr-20, Tyr-23, and Tyr-53), where three Trp residues are situated at the substrate-binding site, two are on the hydrophobic part, and one is at the edge of the lysozyme. Within these amino acids, Trp-62 and Trp-108 are found in the substrate-binding site, performing an essential function of substrate binding and enzyme structure stabilization (Figure 2) (Sheng *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

Lysozyme substrate. Peptidoglycan is an essential component of the prokaryotic cell wall outside the cytoplasmic membrane (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). This polymeric structure is crucial for the bacterial cells; it carries out the maintenance of its morphology, serves as a scaffold to anchor other components on the cell envelope such as proteins, deals with the mechanical stress, and allows the diffusion of nutrients towards the plasma membrane containing the transporters (i.e., proteins, porins, permeases, among others) required for their translocation into the cytosol to achieve the survival of bacteria (Jana *et al.*, 2017). Peptidoglycan or murein is a biopolymer consisting

Trp-62, Trp-63, Trp-108, Trp-111 y Trp-123) y tres tirosinas (Tyr-20, Tyr-23 y Tyr-53), de los cuales tres residuos de Trp se localizan en el sitio de unión del sustrato, dos en la parte hidrofóbica y uno en el borde de la lisozima. Dentro de estos aminoácidos, Trp-62 y Trp-108 se encuentran en el sitio de unión del sustrato y desempeñan una función esencial en la unión del sustrato y la estabilización de la estructura de la enzima (Figura 2) (Sheng *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

Sustrato de la lisozima. El peptidoglucano es un componente básico de la pared celular de las procarionotas fuera de la membrana citoplásmica (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). Esta estructura polimérica es fundamental para las células de las bacterias, ya que lleva a cabo el mantenimiento de su morfología, sirve como andamio para fijar otros componentes en la envoltura celular, como las proteínas, se ocupa del estrés mecánico y permite que los nutrientes lleguen a la membrana plásmica que contiene los transportadores (e.d., proteínas, porinas, permeasas, entre otros) necesarios para su translocación en el citosol, procesos todos estos

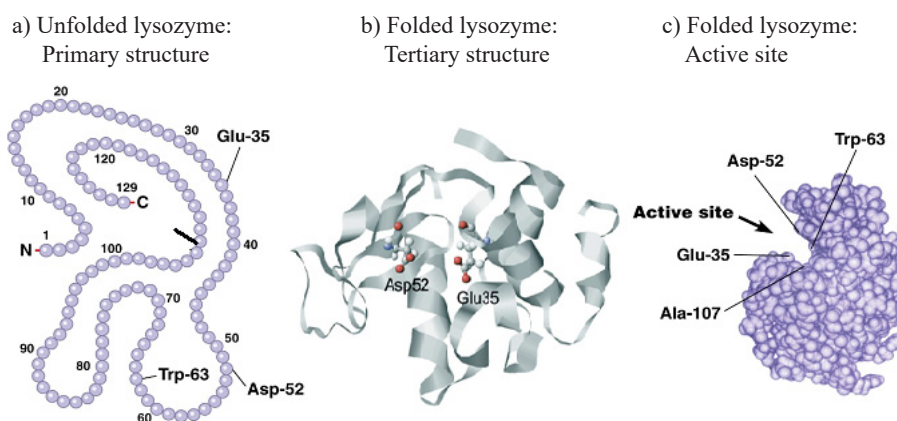


Figure 2. Chicken lysozyme primary (a) and tertiary structure (b). Active site with the amino acids responsible for the lysozyme activity (c). (Held and Van Smaalen, 2014; Hardin *et al.*, 2016).

Figura 2. Estructuras primaria (a) y terciaria (b) de la lisozima de pollo. Sitio activo con los aminoácidos responsables de la actividad de la lisozima (c). (Held y Van Smaalen, 2014; Hardin *et al.*, 2016).

of linear glucan chains, cross-linked by short peptides with different compositions depending on the type of bacteria. They are assembled by N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) residues linked by β (1-4) bonds (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). Pathogenic bacteria have developed resistance to the bacteriolytic activity of host secreted lysozyme during infection; the primary mechanism is the modification of its peptidoglycan glycan backbone (Sukhithasri *et al.*, 2013) (Figure 3).

necesarios para la supervivencia de las bacterias (Jana *et al.*, 2017).

El peptidoglucano o mureína es un biopolímero formado por cadenas lineales de glucanos, entrecruzadas por péptidos cortos con diferentes composiciones, dependiendo del tipo de bacteria. Están ensambladas por residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y el N-acetil ácido murámico (MurNAc) unidos por enlaces β (1-4) (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). Las bacterias patogénicas han generado resistencia a la actividad bacteriolítica

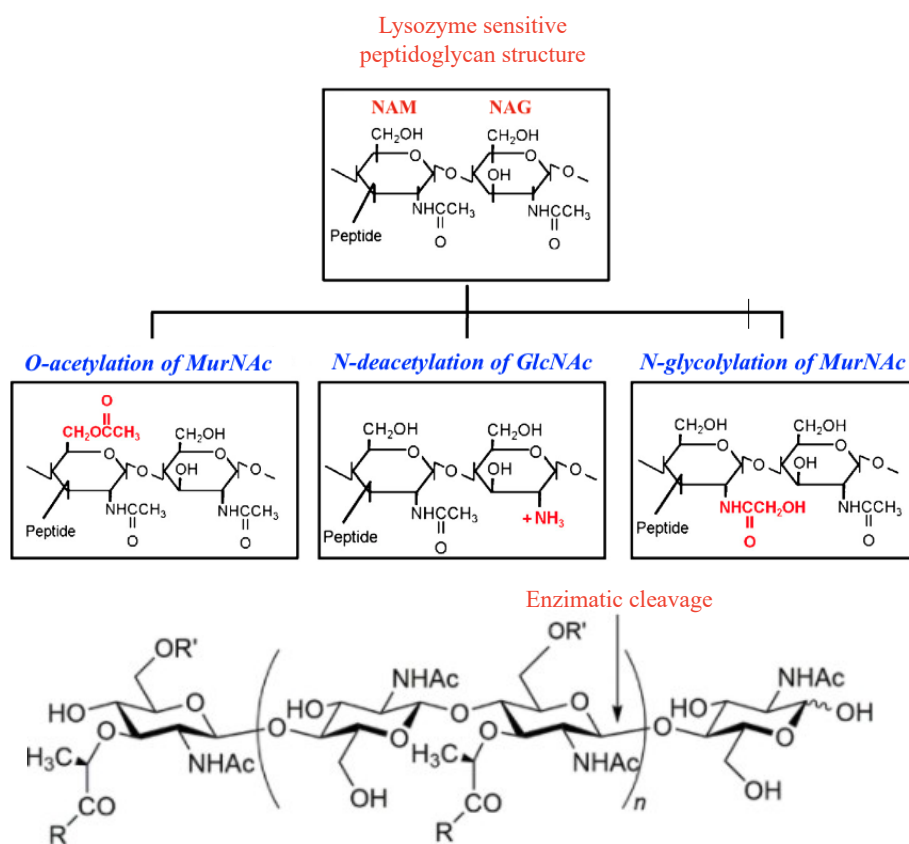


Figure 3. Structure of lysozyme sensitive and lysozyme resistant peptidoglycan (a) and enzymatic cleavage of lysozyme, (b) Pathogenic bacteria modify this structure by *O*-acetylation of NAM at C-6 position, *N*-deacetylation of NAG at C-2 position and *N*-glycosylation of muramic acid at C-2 position (Sukhithasri *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2019).

Figura 3. Estructura de un peptidoglucano sensible y uno resistente a la lisozima (a) y escisión enzimática de lisozima; (b) Bacteria patogénica que modifica esta estructura por *O*-acetilación de AAM en la posición C-6, *N*-deacetilación de NAG en la posición C-2 y *N*-glicosilación de ácido murámico en la posición C-2 (Sukhithasri *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2019).

Recently, the synthesis of monosaccharides and disaccharides from acetylmuramic acid (NAM) and the possibility that these compounds can bind to the lysozyme's active site, resulting in their hydrolysis, has been reported (Jana *et al.*, 2017). The arrangement in the space of the functional groups of these compounds can impede or promote the binding to the active site of the enzyme, in this case, methoxy ($-\text{OCH}_3$), acetyl ($-\text{COCH}_3$), and methyl ($-\text{CH}_3$) groups. This study suggests that the substrates related to peptidoglycan, which can adopt the necessary conformation for interacting with the active site, will be hydrolyzed on the *o*-glycosidic bonds by the lysozyme.

This brings the query of how lysozyme and other polysaccharides different from the peptidoglycan can interact, especially those present in the cell wall of lysozyme-sensitive fungi or yeast, such as chitin and chitosan, which are structurally related, or even other polysaccharides such as β -glucans. However, these microorganisms do not have peptidoglycan. Interestingly, how it interacts at the molecular level with these polysaccharides has not been reported yet (Sowa-Jasiłek *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018;). Chitin (a long-chain polymer of N-acetylglucosamine) or chitosan (composed of randomly distributed β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine residues) may play an important role in the interaction of lysozyme with the fungal cell wall (Han *et al.*, 2012).

Mechanism of catalysis. The catalysis mechanism of lysozyme was the first to be studied in the glycosidases group. It catalyzes the cleavage of β -1,4-glycosidic bonds between N-acetyl muramic acid and N-acetyl glucosamine in peptidoglycan (Yu *et al.*, 2018). Lysozyme has two carboxylic acid residues, aspartate-52, and glutamate-35, strategically positioned on the glycosidic bond and catalyze the cleavage in two steps (Figure 3, 4 and 5).

del hospedante que secreta la lisozima durante la infección; el mecanismo primario es la modificación de la cadena de su peptidoglucano glucano (Sukhithasri *et al.*, 2013) (Figura 3).

Recientemente, se ha reportado la síntesis de los monosacáridos y disacáridos del ácido acetilmurámico (AAM), así como la posibilidad de que estos compuestos puedan unirse al sitio activo de la lisozima, para producir su hidrólisis (Jana *et al.*, 2017). La disposición en el espacio de los grupos funcionales de estos compuestos pueden impedir o promover la unión al sitio activo de la enzima, en este caso, los grupos metoxilo ($-\text{OCH}_3$), acetilo ($-\text{COCH}_3$) y metilo ($-\text{CH}_3$). Este estudio sugiere que los sustratos relacionados con el peptidoglucano, que puedan adoptar la conformación necesaria para interactuar con el sitio activo, serán hidrolizados en los enlaces *o*-glicosídicos por la lisozima.

De aquí surge la pregunta sobre cómo pueden interactuar la lisozima y otros polisacáridos distintos al peptidoglucano, sobre todo aquellos que están presentes en la pared celular de los hongos o la levadura, como la quitina y el quitosano, que están estructuralmente relacionados, o incluso otros polisacáridos como los β -glucanos. Sin embargo, es de destacar que estos microorganismos no tienen peptidoglucano. Es importante señalar que aún no se ha reportado la manera en que estos polisacáridos interactúan a nivel molecular (Sowa-Jasiłek *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018;). Es posible que la quitina (un polímero de cadena larga de N-acetilglucosamina) o el quitosano (compuesto de residuos de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidos a β -(1 $\rightarrow$ 4)) tengan una función importante en la interacción entre la lisozima y la pared celular fúngica (Han *et al.*, 2012).

Mecanismo de catálisis. El mecanismo catalítico de la lisozima fue el primero que se estudió del grupo de las glicosidasas. Éste cataliza la escisión

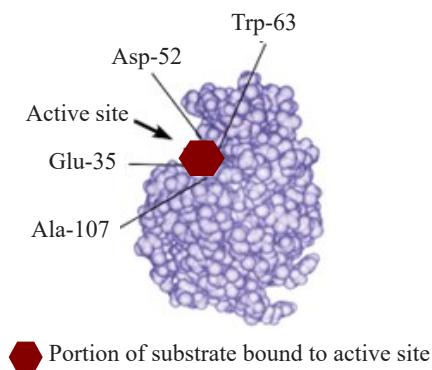


Figure 4. Enzyme-substrate complex for chicken lysozyme, where can be appreciated the catalytic residues Glu-35 and Asp-52 in the active site. Figure edited from Hardin *et al.*, 2016.

Figura 4. Complejo enzima-sustrato de la lisozima de pollo donde se pueden apreciar los residuos catalíticos Glu-35 y Asp-52 en el sitio activo. Figura editada de Hardin *et al.*, 2016.

In general, the catalytic process initiates with a fragment of six residues of the polysaccharide (subsites A-F); this fragment binds to the active site of the enzyme, where all monomers of the fragment are readily embedded, except one (D). The D monomer undergoes a half-chair conformation, which changes to enter to a specific point of the active site of the enzyme. This site contains two ionic amino acids, glutamic (Glu-35) and aspartate acids (Asp-52). These two residues carry out quite different functions, where Glu-35 acts as an acid-base residue and the Asp-52 as an enzymatic nucleophile (Jana *et al.*, 2017).

Phillips (1967) established in his work the distance between the glycosidic oxygen-linking residues D and E. The nearest oxygen of Glu 35 is almost 3 Å, the nearest oxygen of Asp 52 is about 3 Å from the C(1) atom of sugar residue D, and about the same distance from the ring oxygen atom of that residue.

In the first step (glycosylation), D is strained into a conformation similar to a transition state.

de los enlaces β -1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil glucosamina en el peptidoglucano (Yu *et al.*, 2018). La lisozima tiene dos residuos de ácido carboxílico, aspartato-52 y glutamato-35, que se encuentran estratégicamente situados en el enlace glicosídico y catalizan la escisión en dos pasos (Figuras 3, 4 y 5).

En general, el proceso catalítico comienza con un fragmento de seis residuos del polisacárido (subsitos A-F); este fragmento se une al sitio activo de la enzima, donde todos los monómeros del fragmento son fácilmente incrustados, excepto uno (D). El monómero D produce una conformación de media silla, la cual cambia para entrar en un punto específico del sitio activo de la enzima. Este sitio contiene dos aminoácidos iónicos, ácidos glutámico (Glu-35) y aspartato (Asp-52). Estos dos residuos desempeñan funciones muy diferentes; el Glu-35 actúa como residuo ácido-base y el Asp-52 como un nucleófilo enzimático (Jana *et al.*, 2017).

En su trabajo, Phillips (1967) estableció la distancia entre los residuos glicosídicos D y E que unen el oxígeno. El oxígeno más cercano de Glu 35 es de casi 3 Å; el más cercano de Asp 52 es de aproximadamente 3 Å desde el átomo C(1) del residuo D de azúcar, y de aproximadamente la misma distancia desde el átomo de oxígeno del anillo de ese residuo.

En el primer paso (glicosilación), D se tensa en una conformación similar a la del estado de transición. El residuo ácido-base Glu-35 actúa como donador de un protón al oxígeno, que participa en la unión glicosídica de los residuos D y E; por tanto, la reducción del oxígeno induce la escisión del enlace C-O. Glu-35 tiene ahora un oxígeno de carga negativa y D es un ión inestable con carga positiva. Al mismo tiempo, el carboxilato desprotonado de Asp-52 realiza un ataque nucleofílico al carbono anomérico y, mediante resonancia, estabiliza el carbono con carga positiva. En el segundo paso

The acid-base residue Glu-35 acts by donating a proton to the oxygen, which participates in the glycosidic bond of residues D and E; therefore, the reduction of the oxygen, induces the cleaver of the C-O bond. Glu-35 now has a negatively charged oxygen, and D is an unstable, positively charged ion. At the same time, the deprotonated carboxylate of Asp-52 performs a nucleophilic attack on the anomeric carbon, and through resonance, stabilizes the positively charged carbon. In the second step (deglycosylation), the deprotonated Glu-35 acts as a general base where it accepts a proton (deprotonate). This proton comes from a directly positioned water molecule, performing a nucleophilic substitution in the glycosyl enzyme. The resulting hydroxide can bond with residue D, neutralizing the charge and causing its release from the cleft. Then the nucleophile is regenerated in the active site (Figure 5) (Stick *et al.*, 2009; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Catalytic differences among types of lysozymes.

Lysozyme and enzyme-like lysozyme (low muramidase activity) have been isolated and purified from natural sources and organisms.

(deglicosilación), el Glu-35 desprotonado actúa como base general donde acepta un protón (desprotonado). Este protón proviene de una molécula de agua directamente posicionada y lleva a cabo una sustitución nucleofílica en la enzima glicosil. El hidróxido resultante se puede unir con el residuo D neutralizando la carga y permitiendo su liberación de la hendidura. A continuación, el nucleófilo se regenera en el sitio activo (Figura 5) (Stick *et al.*, 2009; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Diferencias catalíticas entre los tipos de lisozimas.

La lisozima y las enzimas tipo lisozima (poca actividad de la muramidasa) han sido aisladas y purificadas a partir de fuentes y organismos naturales. Estas enzimas pueden inducir cambios en la estructura de la célula y causar la muerte de los microorganismos (Chen *et al.*, 2016). En los animales, existen cuatro principales tipos de lisozimas, que se clasifican dependiendo de la fuente: tipo-c (de pollo o convencional), tipo-g (ganso), tipo-i (invertebrado) y tipo-ch (chalaropsis) (Zhou *et al.*, 2017). Los tipos -c y -g se encuentran en todos los vertebrados, en tanto que los invertebrados

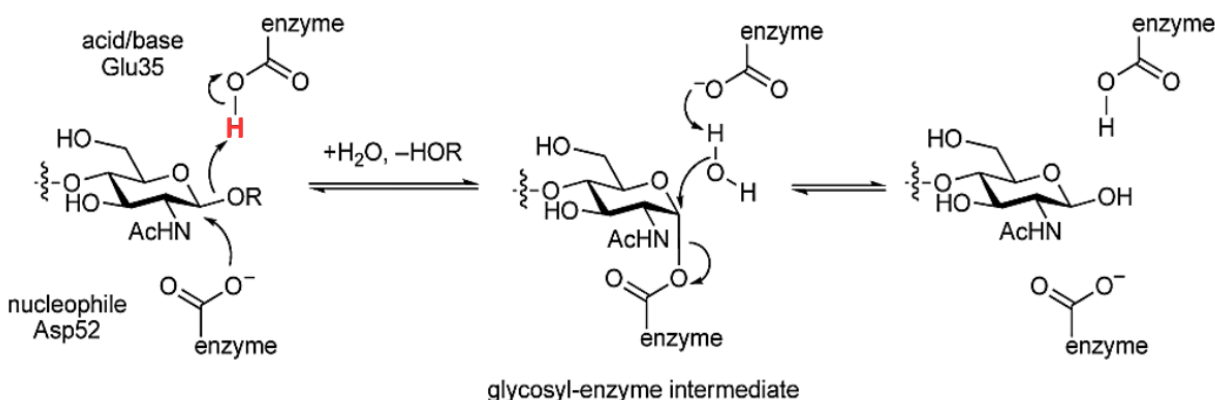


Figure 5. Catalytic mechanism of lysozyme mediated by Glu-35 and Asp-52 amino acids (Stick *et al.*, 2009).
Figure 5. Mecanismo catalítico de la lisozima mediado por los aminoácidos Glu-35 y Asp-52 (Stick *et al.*, 2009).

These enzymes can induce changes in cell structure, leading microorganisms to death (Chen *et al.*, 2016). In animals, there are four main types of lysozymes, referring to the source: type-c (chicken or conventional), type-g (goose), type-i (invertebrate), and type-ch (chalaropsis) (Zhou *et al.*, 2017). Types -c and -g are found in all vertebrates, while invertebrates typically produce type-i. Different types of lysozyme have been reported in some invertebrates, for example, type-c lysozymes in Arthropoda, type-g in Mollusca, and type-ch in Nematodes (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

Table 1 summarizes diverse types of lysozymes and enzyme-like lysozymes from animals, plants, and those obtained from genetic recombination. In both vertebrates and invertebrates, lysozymes and enzyme-like lysozymes are multifunctional enzymes, which serve as non-specific innate immunity molecules responsible for antibacterial defense (pathogens and non-pathogens) and/or digestion (Zhou *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). Notwithstanding, few studies report a previous stimulation with a bacterial or fungal infection in the host organisms to induce the expression of lysozymes and enzyme-like lysozymes (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019); Once were isolated some of them had low or null lysozyme or muramidase activity, however, exhibit high peptidase activity or were overexpressed on the digestive tract. This behavior suggests that in certain living organisms lysozymes or lysozyme-like enzymes have a primary function related to digestive functions and nutrition (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

The catalytic differences among the diverse types of lysozyme suggest that the lack of muramidase activity of the lysozymes type-i concerning type-c may be due to differences in the amino acid sequence. Zhou *et al.* (2017) obtained and purified a

típicamente producen el tipo-i. Los diferentes tipos de lisozima se han reportado en algunos invertebrados, por ejemplo, lisozimas tipo c en artrópodos, de tipo g en moluscos y de tipo-ch en nematodos (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

En el Cuadro 1 se resumen los diversos tipos de lisozimas y enzimas tipo lisozimas de animales, plantas y los que se obtienen por recombinación genética. Tanto en los vertebrados como en los invertebrados, las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas son enzimas multifuncionales que sirven como moléculas de inmunidad innata inespecífica responsables de la defensa antibacterial (patógenos y no patógenos) y/o de la digestión (Zhou *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). No obstante, pocos estudios han reportado estimulación previa con una infección bacteriana o fúngica en los organismos hospedantes para inducir la expresión de las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019); después de que fueron aislados, la actividad de la lisozima en algunos de ellos fue poca o nula, pero la actividad de la peptidasa aumentó o fue sobreexpresada en el tracto digestivo. Este comportamiento sugiere que ciertas lisozimas de organismos vivos o enzimas tipo lisozimas tienen una función primaria relacionada con las funciones digestivas y la nutrición (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

Las diferencias catalíticas entre los diversos tipos de lisozima sugieren que la ausencia de actividad de la muramidasa de las lisozimas tipo-i con respecto a las de tipo-c podrían deberse a diferencias en la secuencia del aminoácido. Zhou *et al.* (2017) obtuvieron y purificaron una lisozima recombinante de tipo-i de cangrejo de manglar (*Scylla paramamosain*), que tenía 54% de similitud con la lisozima tipo-i aislada de camarón (*Litopenaeus vannamei*); ésta fue altamente expresada tanto en el tracto digestivo como en los hemocitos. El análisis de la secuencia del aminoácido reveló

Table 1. Properties of some purified lysozymes isolated from animals, plants and genetic recombination.
Cuadro 1. Propiedades de algunas lisozimas purificadas obtenidas de animales, plantas y recombinación genética.

Source of lysozyme	Characteristic	pH	Molecular Weight	Biological activity	Reference
Pupae (<i>Cameraria ohridella</i>)	Crude extract with lysozyme activity	Experimental conditions: 6.4	15 & 28 kDa	Antibacterial activity against <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	Fiołka <i>et al.</i> , 2005
Mung bean (<i>Phaseolus mungo</i>)	SLA = 355 U mg ⁻¹ at 30 °C pI: 9.7 Optimum temperature of 55 °C	Optimum at 5.5	14.4 kDa	Antifungal activity against <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>B. cinerea</i>	Wang <i>et al.</i> , 2005
Clam (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	SLA = 3.76×10 ⁵ U mg ⁻¹	5.5	13.4 kDa	N/D	Kim <i>et al.</i> , 2012
Cauliflower (<i>Brassica oleracea</i>)	EA = 133.0 µg Optimum temperature of 40 °C	3.0-9.0 Optimum at 8	22.0 kDa	Antimicrobial activity against <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>F. solani</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Cheilomenes lunata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>A. alternata</i>	Manikandan <i>et al.</i> , 2015
Lyz-i2 recombinant from white shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Physicochemical parameters = N/D	Experimental condition: 6.2	16.9 kDa	Antibacterial activity against <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Chen <i>et al.</i> , 2016
Lyz type-c from silkworm (<i>Galleria mellonella</i>)	Physicochemical parameters = N/D	Experimental condition: 6.4-7.4	N/D	Activity against <i>Candida albicans</i>	Sowa-Jasilek <i>et al.</i> , 2016
Lyz type-i recombinant from mud crab (<i>Scylla paramamosain</i>)	Lys with a 54% identity to Lys of <i>L. vannamei</i> Physicochemical parameters = N/D	Optimum at 8	16 kDa	Low muramidase activity, moderate antimicrobial activity against Gram (+) and Gram (-) bacteria and <i>C. albicans</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2017
Lyz recombinant from whitefly (<i>Bemisia tabaci</i>)	Type-c: <i>Btlysc</i> , Type-I: <i>Btlysi1</i> - <i>Btlysi2</i>	Optimum at 6	15 kDa	Antibacterial activity against <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2018
Lyz type-i from earthworm (<i>Eisenia andrei</i>)	Isopeptidase activity. Chain of 226 amino acid residues	N/D	22.2 kDa	Important for the digestive system	Yu <i>et al.</i> , 2019

^aEA = enzymatic activity; ^bSLA = specific lysozyme activity, ^cpI = isoelectric point, ^dN/D = not determined. / ^eEA = actividad enzimática; ^fSLA = actividad específica de la lisozima, ^gpI = punto isoeléctrico, ^hN/D = no determinado.

type-i recombinant lysozyme from mud crab (*Scylla paramamosain*), which presented 54% similarity with type-i isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*); this was highly expressed in both, the digestive tract and the hemocytes. The amino acid sequence analysis revealed that this enzyme lacked the two amino acids responsible for muramidase activity, aspartic and glutamic acids. Despite this, type-i lysozyme homologs in invertebrates, *Splys-i* enzyme, showed antimicrobial activity against both Gram (+) and Gram (-) bacteria, as well as on fungal cells, when crabs were previously exposed to them. The authors suggest that the mechanism of action against these microorganisms is not related to muramidase activity, but to the isopeptidase activity and the protein agglutination phenomena on the microbial surface, making it possible to bind to cellular components such as peptidoglycan and lipopolysaccharide.

The lysozyme type-i obtained from the earthworm *Eisenia andrei* showed a polypeptide sequence of 226 amino acid residues, with 14 cysteine residues (Cys). The authors theorize that these Cys residues are possibly involved in the high numbers of sulfur bridges that distinguish the type-i from other lysozymes (Yu *et al.*, 2019). An important aspect of this enzyme sequence (*Ea-iLys*) is that it contains three residues of aspartic and glutamic acids and serine, promoting the activity of muramidase, alanine, and histidine-mediated isopeptidase. The 14 Cys residues form seven disulfide bridges, which block the few cleavage sites for trypsin (< 10), possibly making this enzyme resistant to digestive proteinases secreted by the intestinal glands. These differences suggest that this enzyme activity mainly focuses on digestive functions, instead of being part of the effectors of the immune system (Yu *et al.*, 2019). Finally, Wang *et al.* (2018) obtained from the whitefly (*Bemisia tabaci*) three genes for three

que esta enzima carecía de los dos aminoácidos responsables de la actividad de la muramidasa, los ácidos aspártico y glutámico. Pese a esto, los homólogos tipo-i de la lisozima en invertebrados, la enzima *Splys-i*, mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), así como en células fúngicas, cuando los cangrejos fueron previamente expuestos a éstas. Los autores sugieren que el mecanismo de acción contra estos microorganismos no está relacionada con la actividad de la muramidasa sino con la actividad de la isopeptidasa y los fenómenos de aglutinación de las proteínas en la superficie microbiana, haciendo posible la unión con los componentes de la célula como los peptidoglucanos y los lipopolisacáridos.

La lisozima tipo-i obtenida de lombriz de tierra *Eisenia andrei* mostró una secuencia del polipéptido de 226 residuos de aminoácidos, con 14 residuos de cisteína (Cys). La teoría de los autores es que posiblemente los residuos de Cys tienen que ver con el alto número de puentes de azufre que distinguen el tipo-i de otras lisozimas (Yu *et al.*, 2019). Un aspecto importante de esta secuencia enzimática (*Ea-iLys*) es que contiene tres residuos de ácidos aspártico y glutámico, y serina, que promueven la actividad de la muramidasa, la alanina y la isopeptidasa mediada por la histidina. Los 14 residuos de Cys forman siete puentes de disulfuro, que bloquean los pocos sitios de escisión de la tripsina (< 10), posiblemente haciendo que esta enzima sea resistente a las proteinasas digestivas que secretan las glándulas intestinales. Estas diferencias sugieren que la actividad de esta enzima se concentra principalmente en las funciones digestivas y que no es parte de los efectores del sistema inmunológico (Yu *et al.*, 2019). Por último, Wang *et al.* (2018) obtuvieron tres lisozimas recombinantes de tres genes de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), una de tipo-c (*Bthysc*) y dos de tipo-i (*Bthysil* y *Bthysi2*). Estas enzimas mostraron variaciones en el número de

recombinant lysozymes, one type-c (*Btlysc*), and two type-i (*Btlysi1* and *Btlysi2*). These enzymes showed variations in the number of amino acids in their sequence, 146 for type-c and 156 and 160 for both type-i, respectively. Type-c contained eight conserved cysteine residues, while *Btlysi1* and *Btlysi2* had twelve conserved cysteine residues capable of forming six disulfide bridges.

These findings agree with Yu *et al.* (2019) and Zhou *et al.* (2017). They suggested that type-i lysozymes contain large numbers of disulfide bridges, due to their relation with the digestive function of *E. andrei* and *S. paramamosain*. Further, type-c lysozyme was expressed before and after the whitefly was infected with *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungus, without changing their behavior pattern; this suggested that the type-c lysozyme plays a role as an effector of the immunological system. The two types-i enzymes changed their expression pattern when the feeding of the flies varied and did not suffer any infection with pathogenic microorganisms, which indicates that these enzymes are closely related to digestive processes.

Effect of pH and temperature on the enzymatic activity. The amino acids responsible for the polysaccharide cleavage are susceptible to variations in the acidity of the medium. The pH and temperature affect the enzyme's catalytic activity and, therefore, the reaction rate, which performs the mechanism of action. Depending on the source of isolation and purification, the lysozyme may exhibit slight variations in its optimum pH and temperature (Table 1). Most studies show that the optimal pH ranges from slightly acidic (5.5-6.7) for type-c (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018) to alkaline (7.4-8) for type-i (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019;). The optimal temperature

aminoácidos en sus secuencias, 146 en las de tipo-c y 156 y 160 en las dos de tipo-i, respectivamente. Las de tipo-c contenían ocho residuos de cisteína conservados, en tanto que *Btlysi1* y *Btlysi2* tenían 12 residuos de cisteína conservados con la capacidad de formar seis puentes de disulfuro.

Estos resultados coinciden con los que obtuvieron Yu *et al.* (2019) y Zhou *et al.* (2017). Estos autores sugieren que las lisozimas de tipo-i contienen numerosos puentes de disulfuro debido a su relación con la función digestiva de *E. andrei* y *S. paramamosain*. Además, la expresión de la lisozima de tipo-c ocurrió antes y después de que la mosquita blanca fuera infectada con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, sin cambiar su patrón de comportamiento; esto sugiere que la lisozima tipo-c desempeña la función de un efector del sistema inmunológico. Las dos enzimas de tipo-i cambiaron su patrón de expresión cuando la alimentación de las mosquitas varió y no contrajeron ningún tipo de infección con microorganismos patogénicos, lo cual indica que estas enzimas están muy relacionadas con los procesos digestivos.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática. Los aminoácidos responsables de la escisión del polisacárido son susceptibles a variaciones en la acidez del medio. El pH y la temperatura afectan la actividad catalítica de la enzima y, en consecuencia, la velocidad de la reacción, que lleva a cabo el mecanismo de acción. Dependiendo de la fuente de aislamiento y purificación, la lisozima puede tener pequeñas variaciones en su pH y temperatura óptimos (Cuadro 1). La mayoría de los estudios indican que las escalas óptimas de pH van desde ligeramente ácido (5.5-6.7) para el tipo-c (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018) hasta alcalino (7.4-8) para el tipo-i (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019;). La temperatura óptima de

of lysozymes varies depending on the source, but most studies indicate that it is around 40 °C for insects and animals.

Antibacterial and antifungal activity of lysozyme. The biological activity of lysozyme leads to a disturbance of the bacterial growth, especially Gram (+). Furthermore, the discovery of the lysozyme structure promoted more research studies about its possible application. In general, the lysozyme activity is determined using *Micrococcus* sp. strains, which serve as a substrate for visualizing the activity by turbidimetry. Currently, the *Micrococcus* sp. assay is considered a gold standard for measuring lysozyme activity (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012).

Fiołka *et al.* (2005) isolated and purified a lysozyme from the pupae of *Cameraria ohridella*, allowing the lysis of *Bacillus megaterium* cells, caused a decrease in the optical density of the bacterial growth compared with the lysozyme control. According to the authors, lysozymes may play two roles, a digestive way breaking down the ingested bacteria in the gut and a defense response against pathogens that enter the hemocoel. Wang *et al.* (2005) obtained similar results with a purified lysozyme from mung beans (*Phaseolus mungo*), which showed antibacterial and antifungal activities. The mung bean lysozyme seems to have more effectiveness in inhibiting *Fusarium solani* and *Botrytis cinerea*. Furthermore, it was able to interrupt the radial growth of *F. solani* and induced abnormalities in its cellular structure, such as detachment of cell membrane and cell wall of hypha, and leaking out of its cytoplasm, which suggested the vital role of lysozyme in the constitutive host defense mechanisms against microbial pathogens (Wang *et al.*, 2005). A lysozyme, isolated and purified from a cauliflower plant tissue, affected the growth of phytopathogenic fungi and bacteria such

las lisozimas varía según la fuente, pero la mayoría de los estudios indican que es de aproximadamente 40 °C para insectos y animales.

Actividad antibacterial y antifúngica de la lisozima. La actividad biológica de la lisozima causa una interferencia en el crecimiento bacterial, sobre todo en las Gram (+). Además, el descubrimiento de la estructura de la lisozima promovió más estudios de investigación sobre su posible aplicación. En general, la actividad de la lisozima se determina utilizando cepas de *Micrococcus* sp., que sirven como sustrato para visualizar la actividad por medio de turbidimetría. Actualmente, el ensayo de *Micrococcus* sp. es considerado el estándar de referencia para medir la actividad de la lisozima (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012).

Fiołka *et al.* (2005) aislaron y purificaron una lisozima de la pupa de *Cameraria ohridella* capaz de lisar las células de *Bacillus megaterium*, ocasionando una disminución en la densidad óptica del crecimiento bacterial comparada con la del control de la lisozima. Según los autores, es posible que las lisozimas tengan dos funciones, una forma digestiva que descompone las bacterias ingeridas en el intestino y una respuesta de defensa contra patógenos que se introducen en el hemocoele. Wang *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares con una lisozima purificada de frijoles mungo (*Phaseolus mungo*), que mostraron actividad antibacterial y antifúngica. Al parecer, la lisozima de frijol mungo es más eficaz para inhibir *Fusarium solani* y *Botrytis cinerea*. Además, pudo interrumpir en el crecimiento radial de *F. solani* e indujo anomalías en su estructura celular, como desprendimiento de la membrana celular y la pared celular de la hifa, así como fugas de su citoplasma, lo cual sugiere la función vital de la lisozima en los mecanismos constitutivos de defensa del hospedante contra patógenos microbianos (Wang *et al.*, 2005).

as *F. solani* and *Erwinia carotovora* that usually infects this crop (Manikandan *et al.*, 2015).

Regarding the activity against phytopathogenic fungi, *Acremonium obclavatum* showed higher enzymatic sensitivity, followed by *Leptosphaeria maculans* and *Alternaria alternata* (Manikandan *et al.*, 2015). All these studies suggest that lysozymes from plant and insect tissues inhibited bacteria and fungi; however, in some cases, the antibacterial activity of hen egg lysozyme remains more efficient than other types of lysozymes previously reported. Although the mechanism of action in which the lysozyme exerts the antibacterial activity has been already enlightened, to date, there is little information about the exact mechanism of action that the lysozymes follow to cause damage to the fungal cell surface (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017).

Lysozyme isolated from *Pithecellobium dulce* seeds exerted antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, with a rather high thermal stability at up to 80 °C for 15 min, at pH=8.0 (Sawasdipuksa *et al.*, 2011). The activity of hen egg-white lysozyme on the growth of dimorphic fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis* (Lopera *et al.*, 2008) and the anti-biofilm effect on *Candida albicans* (Sebaa *et al.*, 2017) have also been reported. When *P. brasiliensis* yeast cells were exposed to lysozyme, the multiple-budding ability was impaired. Also, ultra-structural changes like a fusion of lipid vacuoles, lamellar structures, subcellular degradation, and interruption of fibrillar layers were observed in conidia after exposure to the enzyme. Thus, lysozyme seems to exert a dual role as part of the antifungal defense mechanisms (Lopera *et al.*, 2008). Human lysozyme displayed >80% of antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Candida parasilopsis*, and *C. albicans*, commonly identified in patients with chronic rhinosinusitis (Woods *et al.*, 2011).

Una lisozima aislada y purificada del tejido de una planta de coliflor afectó el crecimiento de hongos fitopatógenos y bacterias como *F. solani* y *Erwinia carotovora*, que normalmente infectan este cultivo (Manikandan *et al.*, 2015).

Con respecto a la actividad contra hongos fitopatógenos, *Acremonium obclavatum* mostró una mayor sensibilidad a la enzima, seguida de *Leptosphaeria maculans* y *Alternaria alternata* (Manikandan *et al.*, 2015). Todos estos estudios sugieren que las lisozimas de tejido vegetal y de insectos inhiben el desarrollo de bacterias y hongos. Sin embargo, en algunos casos, la actividad antibacteriana de la lisozima de huevo de gallina sigue siendo más eficaz que la de otros tipos de lisozima previamente reportadas. Aunque ya se ha esclarecido el mecanismo de acción asociado a la actividad antibacteriana de la lisozima, a la fecha existe poca información acerca del mecanismo exacto de acción que las lisozimas siguen para dañar la superficie de la célula fúngica (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017).

Una lisozima aislada de semillas de *Pithecellobium dulce* ejerció actividad antifúngica contra *Macrophomina phaseolina*, con una alta estabilidad térmica de hasta 80 °C por 15 min y pH=8.0 (Sawasdipuksa *et al.*, 2011). También se ha reportado la actividad de la lisozima de clara de huevo de pollo en el crecimiento de hongos dimórficos como *Paracoccidioides brasiliensis* (Lopera *et al.*, 2008) y el efecto antibiopelícula en *Candida albicans* (Sebaa *et al.*, 2017). Cuando se expusieron células de levadura de *P. brasiliensis* a la lisozima, la capacidad de gemación múltiple disminuyó. Asimismo, se observaron cambios ultraestructurales como la fusión de vacuolas lípidas, estructuras laminares, degradación subcelular e interrupción de las capas fibrilares en los conidios después de su exposición a la enzima. Por tanto, la lisozima parece ejercer una doble función como parte de los mecanismos de defensa antifúngicos (Lopera *et al.*, 2008). La

It has been suggested that lysozyme can hydrolyze the (β -1,4)-glycosidic bonds between the N-acetylglucosamine monomers which integrate the chitin, affecting the cell wall function (Sowa-Jasilek *et al.*, 2016; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Sowa-Jasilek *et al.* (2016) indicated that the lysozyme affected the growth of *Candida albicans* since they enter in an apoptotic state, caused by a loss of the membrane potential in the mitochondria; however, the mechanism was not discussed. Various effects undergoing in the cell nucleus level, such as chromatin condensation and DNA fragmentation, were also observed. Hernández-Téllez *et al.* (2017, 2018) reported that chitosan-lysozyme nanoparticles and their separate components could disrupt the first stage of *Aspergillus parasiticus* growth. The authors found low percentages of cell viability at particle concentrations of 200 to 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The germination and diameter of spores, reducing sugar production, and membrane integrity, were also affected.

Until now, data about the mechanism of action of how lysozyme affects fungal development is still insufficient. Structural affectations could be associated with the β -1,3-glucanase production, which agree with the low reducing sugar production detected in *Aspergillus parasiticus* after exposure to chitosan-lysozyme nanoparticles (Hernández-Téllez *et al.*, 2017). It should be noted that these studies have been carried out using pure enzymes, without combination with other antimicrobial agents; therefore, it is necessary first to establish how the enzyme works on fungi and yeast, in order to achieve their technological applications in the pharmaceutical, food and agricultural industries.

Lysozyme immobilization in chitosan-based antimicrobial nanomaterials. The enzymes' industrial application is highly desirable due to their selectivity and specificity under moderate conditions (Figure 6).

lisozima humana mostró >80% de actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Candida parasilopsis* y *C. albicans*, que comúnmente se identifican en pacientes con rinosinusitis crónica (Woods *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la lisozima puede hidrolizar los enlaces (β -1,4)-glicosídicos entre los monómeros N-acetilglucosamina que integran la quitina, afectando la función de la pared celular (Sowa-Jasilek *et al.*, 2016; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Sowa-Jasilek *et al.* (2016) indicaron que la lisozima afectó el crecimiento de *Candida albicans*, ya que entra en un estado apoptótico, causado por una pérdida de la potencial membrana en la mitocondria; sin embargo, no describieron el mecanismo. También se observaron varios efectos nivel del núcleo de la célula, como la condensación de la cromatina y la fragmentación ADN. Hernández-Téllez *et al.* (2017, 2018) reportaron que las nanopartículas de quitosano-lisozima y sus componentes por separado pudieron interrumpir la primera etapa del crecimiento de *Aspergillus parasiticus*. Los autores encontraron bajos porcentajes de viabilidad celular en concentraciones de partículas de 200 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La germinación y el diámetro de las esporas, la producción de azúcares reductores y la integridad de la membrana también fueron afectadas.

Hasta ahora, los datos acerca de cómo el mecanismo de acción de la lisozima afecta el desarrollo fúngico siguen siendo insuficientes. Las afectaciones estructurales pueden estar relacionadas con la producción de β -1,3-glucanasa, lo cual coincide con la baja producción de azúcares reductores detectada en *Aspergillus parasiticus* después de su exposición a nanopartículas de quitosano-lisozima (Hernández-Téllez *et al.*, 2017). Cabe señalar que en la realización de estos estudios se han utilizado enzimas puras, sin combinarlas con otros agentes antimicrobianos y que, por tanto, es necesario, en primer lugar, establecer cómo trabaja la enzima en los hongos y la levadura, con el fin de llevar

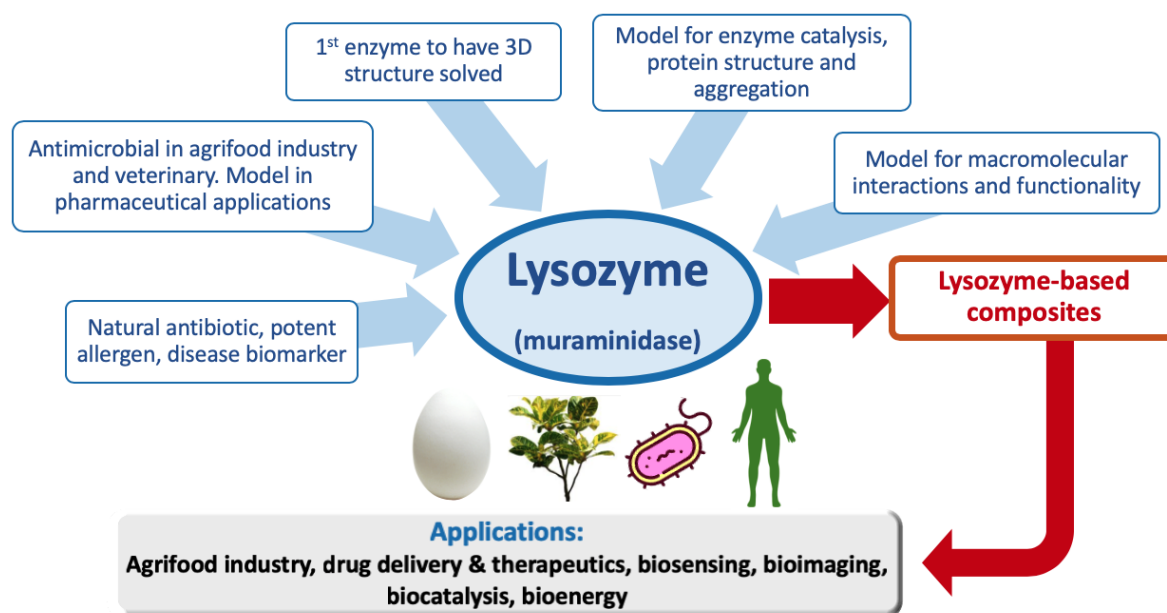


Figure 6. Importance and applications of lysozyme and lysozyme-based materials.
Figure 6. Importancia y aplicación de lisozimas y materiales a base de lisozimas.

Furthermore, the enzymes can improve a large number of industrial processes in a sustainable and environmentally-friendly way, since their performance could reduce the use of chemical compounds and their inherent toxicity generated during the reactions (Bilal and Iqbal, 2019; Wang and Jiang, 2019). However, there are still some disadvantages to their application at the industrial level, such as high costs (depending on the process), low operational stability, deactivation by solvents, and the lack of recovery or recyclability, among others.

Regarding their biological origin, enzymes are soluble and could be inhibited by substrates and reaction products, metabolites, and other compounds in the media (Bilal and Iqbal, 2019). One proposed strategy is the immobilization of the enzymes in polymeric matrices designed to increase their antibacterial activity and prolong their activity and effectiveness. To date, this procedure has been carried out with different solid supports and has

a cabo su aplicación tecnológica en las industrias farmacéutica, alimentaria y agrícola.

Inmovilización de la lisozima en nanomateriales antimicrobianos a base de quitosano. La aplicación industrial de las enzimas se recomienda debido a su selectividad y especificidad en condiciones moderadas (Figura 6).

Además, las enzimas pueden mejorar un gran número de procesos industriales de manera sostenible e inocua para el medio ambiente, ya que su comportamiento podría reducir el uso de compuestos químicos, así como la toxicidad inherente que éstos generan durante las reacciones (Bilal e Iqbal, 2019; Wang y Jiang, 2019). Sin embargo, todavía existen algunas desventajas para su aplicación en la industria, como los altos costos (dependiendo del proceso), la poca estabilidad operacional, la desactivación por algunos solventes y la falta de recuperación o reciclabilidad, entre otras.

allowed overcoming the previously mentioned problems effectively but at a lower scale (Huang *et al.*, 2012; Wang and Jiang, 2019). Immobilization can improve the control of the reaction, prevents the contamination of the product by the enzyme, which is notably relevant in the food industry, allowing the use of different reactors. The enzyme immobilization technology can promote and improve enzyme stability.

Moreover, it supposes that enzymes immobilized can be reused. Even the immobilization technique can be used for enzyme isolation and purification purposes. Besides, this process is usually necessary when achieving optimal performance in non-aqueous media is crucial (Bilal and Iqbal, 2019). To date, the pre-existing solids to immobilize the enzymes is the most widespread strategy. Therefore, many polymers and their derivatives have been recommended, including alginate, cellulose, dextran, agarose, agar-agar, carrageenan, gelatin, guar gum, pectin, chitosan, and others (Bautista-Baños *et al.*, 2016; Bilal and Iqbal, 2019).

The most-reported synthesis methods to perform the enzyme immobilization can be classified as physical and chemical. In the physical methods, the enzymes bind to the support with hydrogen bonds or by entrapment in the polymer matrix, while, in the chemical methods, the enzymes are closely united in the support by covalent bonds (Bilal and Iqbal, 2019). When using these methods, the enzyme immobilization is carried out by adsorption on insoluble materials, entrapment in polymeric gel networks, encapsulation, crosslinking using bifunctional agents, covalent binding to an insoluble vehicle, and the formation of enzyme aggregates by crosslinking. The enzyme immobilization generally provides better accessibility and additional stabilization denaturation processes. Immobilized enzymes have shown higher thermal and operational stability to pH, extreme temperature conditions, and organic solvents (Bilal and Iqbal, 2019). However,

Respecto a su origen biológico, las enzimas son solubles y podrían ser inhibidas por los sustratos y los productos de reacción, los metabolitos y otros compuestos en los medios (Bilal e Iqbal, 2019). Una estrategia que se propone es la inmovilización de las enzimas en matrices poliméricas diseñadas para aumentar su actividad antibacterial y prolongar su actividad y eficacia. A la fecha, este procedimiento se ha realizado con diferentes soportes sólidos y esto ha permitido resolver con buenos resultados los problemas antes mencionados, pero a menor escala (Huang *et al.*, 2012; Wang y Jiang, 2019). La inmovilización puede mejorar el control de la reacción, evitar que la enzima contamine el producto, un factor que es particularmente relevante en la industria alimentaria, permitiendo el uso de diferentes reactores. La tecnología de inmovilización de las enzimas puede promover y mejorar la estabilidad de la enzima.

Asimismo, esto supone la reutilización de las enzimas inmovilizadas. La técnica de inmovilización puede utilizarse incluso en el aislamiento y purificación de enzimas. Adicionalmente, este proceso suele ser necesario cuando se quiere lograr un comportamiento óptimo en medios no acuosos (Bilal e Iqbal, 2019). A la fecha, la estrategia más utilizada para inmovilizar enzimas es el uso de materiales sólidos preexistentes. Por tanto, se han recomendado muchos polímeros y sus derivados, incluidos el alginato, la celulosa, el dextrano, la agarosa, el agar-agar, la carragenina, la gelatina, la goma guar, la pectina, el quitosano y otros (Bautista-Baños *et al.*, 2016; Bilal e Iqbal, 2019).

Los métodos de síntesis que más se mencionan para la inmovilización de enzimas se pueden clasificar como físicos y químicos. En los métodos físicos, las enzimas se unen al soporte con enlaces de hidrógeno o por atrapamiento en la matriz del polímero, en tanto que en los métodos químicos las enzimas están estrechamente unidas en el soporte por enlaces covalentes (Bilal e Iqbal, 2019). Cuando

there still some practical problems to solve during enzyme immobilization, such as low load capacity on solid supports, low recovery rate, and the loss of enzymatic activity by the inhibitors (Wang and Jiang, 2019).

It is crucial to know the right immobilization technique, followed by selecting the support matrix to achieve the optimal enzyme immobilization. It is necessary to check out that the enzyme support matrix is robust and biocompatible with recoverable characteristics (Bilal and Iqbal, 2019). For this purpose, the natural polymeric matrices have been mostly studied due to their desired characteristics such as non-toxicity, biocompatibility, biodegradability, flexibility, sustainability, and the available number of reactive sites (Bilal and Iqbal, 2019; Wang and Jiang, 2019).

Chitosan is a widely used polymer, with all these characteristics, which makes it attractive for the food industry, pharmaceuticals, electrochemicals, biosensors, textiles, and coatings (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b). Several macro and nano-scale materials have been prepared from lysozyme and chitosan, whose use has been proposed to inhibit or retard the microbial growth. Among these materials, solution mixtures, hydrogels, fibers and nanofibers, and nano and microparticles, have been studied (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b; Yu *et al.*, 2018). The most-reported matrix to achieve lysozyme immobilization is chitosan, carried out by electrostatic interaction between the positive charges of chitosan and the negative charge of tripolyphosphate (TPP) (Yu *et al.*, 2018). However, the incorporation of other counter ions such as sodium alginate, carrageenan, and glutaraldehyde has allowed the synthesis of these materials, without losing its biological activity (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018c).

Another highlighting aspect is that, due to the complexity of the enzymes' isolation and

se utilizan estos métodos, la inmovilización de la enzima se lleva a cabo por medio de absorción en materiales insolubles, atrapamiento en redes de gel de polímeros, encapsulamiento, entrecruzamiento utilizando agentes bifuncionales, unión covalente a un vehículo insoluble y formación de agregados de enzimas por medio de entrecruzamiento. Por lo general, la inmovilización de la enzima proporciona una mejor accesibilidad y estabilidad adicional en los procesos de desnaturalización. Las enzimas inmovilizadas han mostrado mayor estabilidad térmica y operacional al pH, las condiciones de temperatura extremas y los solventes orgánicos (Bilal e Iqbal, 2019). Sin embargo, existen todavía problemas prácticos que tienen que resolverse durante la inmovilización de la enzima, como la poca capacidad de carga en soportes sólidos, la baja tasa de recuperación y la pérdida de actividad enzimática causada por los inhibidores (Wang y Jiang, 2019).

Es fundamental conocer la técnica correcta de inmovilización para, posteriormente, seleccionar la matriz de soporte y lograr la óptima inmovilización de la enzima. Es necesario verificar que la matriz de soporte de la enzima sea robusta y biocompatible con las características recuperables (Bilal e Iqbal, 2019). Con este propósito, se han hecho extensos estudios sobre las matrices poliméricas naturales debido a sus características deseables, como no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, flexibilidad, sustentabilidad y el número de sitios reactivos disponibles (Bilal e Iqbal, 2019; Wang y Jiang, 2019).

El quitosano es un polímero ampliamente utilizado, que cumple con todas estas características que lo hacen atractivo para la industria alimentaria, productos farmacéuticos, electroquímicos, biosensores, textiles y recubrimientos (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b). Se han preparado varios materiales a base de lisozimas y quitosano, a macro- y nano escala, cuyo uso se ha propuesto para inhibir o retardar el crecimiento microbiano.

purification from natural sources, these materials are commonly synthesized with commercial lysozymes from chicken egg-white, reducing their application to the biological activity (Table 2). Some reports suggest that lysozymes isolated

Entre estos materiales, se han estudiado mezclas de soluciones, hidrogeles, fibras y nanofibras, y nano- y micropartículas (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b; Yu *et al.*, 2018). La matriz que más se ha reportado por lograr la inmovilización

Table 2. Technological applications and biological activity of lysozyme.
Cuadro 2. Aplicaciones tecnológicas y actividad biológica de la lisozima.

Source of lysozyme	Immobilization	Characteristics	Technological application and biological activity	References
Commercial from chicken egg white	CS-TPP nanoparticles by ionic complexation	20000 U mg ⁻¹ , D: 50-280 nm, EE (%): 47.3, PIEA (%): 85	Possible antimicrobial material, evaluation not reported	Deng <i>et al.</i> , 2006
Commercial from chicken egg white	Nanofibers by electrospinning: deposition of the components by layers	25,000 U mg ⁻¹ Z: +26.4 mV	Evaluated as antimicrobial packaging. <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> were inhibited 60-80%	Huang <i>et al.</i> , 2012
Commercial from chicken egg white	CS-TPP nanoparticles by ionic complexation	~100,000 U mg ⁻¹ , D: 159 ± 24 nm, Z: +41.6 ± 1.1 mV, EE (%): 10 ± 0.2	Antimicrobial agent or possible drug. Evaluated against <i>S. epidermidis</i>	Piras <i>et al.</i> , 2014
Purified from egg white	CS beads crosslinked with glutaraldehyde	N/D	Control <i>Oenococcus oeni</i> during the winemaking process	Liburdi <i>et al.</i> , 2016
Commercial from chicken egg white	CS-TPP nanoparticles by ionic complexation	D: 297.9 nm, Z: + 39 mV, EE (%): 29.1	Activity against <i>Bacillus subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>Serratia marcescens</i> and <i>E. coli</i>	Matouskova <i>et al.</i> , 2016
Commercial from chicken egg white	CS-TPP nanoparticles by ionic complexation	D: 488.8 ± 10.22 nm, Z: +21.10 ± 0.84 mV, PDI: 0.71 ± 0.17, EE (%): 80%	Antibacterial material against <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	Wu <i>et al.</i> , 2017
Commercial from chicken egg white	CS and sodium alginate hydrogels	5000 U mg ⁻¹ , spherical shape, Z: -55 a -30 mV, SI: 45.66 ± 7.62, RRC(%): 87.72 ± 3.96	Controlled release material to control foodborne microorganisms. Complete inhibition of <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	Wu <i>et al.</i> , 2018b
Commercial from chicken egg white	CS-carrageenan-lysozyme nanoparticles by ionic complexation	40000 U mg ⁻¹ , D: 250 ± 8.1 nm, Z: +21.6 ± 0.8 mV, EE (%): 70 ± 1.7	Antifungal activity against <i>Aspergillus parasiticus</i>	Hernández-Téllez <i>et al.</i> , 2018
Commercial from chicken egg white	CS nanoparticles by ionic complexation with sodium alginate and calcium ions	4000 U mg ⁻¹ , D: 901.8 ± 75.50 nm Z: +2.58 ± 0.87 mV, EE (%): 92.79 ± 0.53	Antimicrobial material proposed for the food industry	Wu <i>et al.</i> , 2018c

^aCS: Chitosan; ^bD: hydrodynamic diameter (nm); ^cPIEA: post-immobilization enzyme activity; ^dZ: Z potential/charge; ^eEE: encapsulation efficiency; ^fT: film thickness; ^gSI: Swelling index; ^hRRC: relative release capacity; ⁱTPP: tripolyphosphate; ^jND: not determined. / ^aCS: Quitosano; ^bD: diámetro hidrodinámico (nm); ^cPIEA: actividad de la enzima después de la inmovilización; ^dZ: Z potencial/carga; ^eEE: eficiencia de encapsulación; ^fT: grosor de la película; ^gSI: Índice de dilatación; ^hRRC: capacidad relativa de liberación; ⁱTPP: tripolifosfato; ^jND: no determinado.

from plants, even if they are type-c or type-i, can affect a broad spectrum of phytopathogenic fungi, especially crop pathogenic species, where the enzyme was isolated (Wang *et al.*, 2005; Manikandan *et al.*, 2015). Although the research on chitosan and lysozyme has expanded in recent years, the functional materials developed from them have currently opened a new line of research worldwide.

Conclusions and perspectives. Lysozymes are present in a variety of living organisms, and notably, they play an important role in the immunological system, digestion, and nutrition. To date, it is well known that lysozymes and lysozyme-like enzymes can inhibit bacterial growth and affect fungi and yeasts. The reported action mechanisms for inhibiting fungi and bacteria include aggregation on the cell surface and, subsequently, the activity of muramidase and/or isopeptidase, which compromise important proteins and polysaccharides present in the cell wall. However, the mechanism to inhibit the fungal and yeast polysaccharides is still unclear. Although the type-c lysozyme is the most common enzyme used for antimicrobial purposes, other types are exhibiting this activity; thus, all types of lysozymes and lysozyme-like enzymes should be carefully studied, particularly those from plants and insects, since they can affect not only bacteria but also phytopathogenic fungi and yeast. Based on the literature review, it has been proposed to develop micro and nanomaterials formulated with these antimicrobial enzymes and polymeric matrices and the latter with polycationic polymers such as chitosan. Since it is expected that this combination could be capable of acting synergically for food preservation, crop protection, and pharmaceutical formulations, moreover, it is crucial to study the implications of its application at the laboratory and at higher-levels, specifically, on those materials directed to the control of phytopathogenic fungi.

de la enzima es el quitosano; la inmovilización se realizado por medio de la interacción electrostática entre las cargas positivas del quitosano y la carga negativa del tripolifosfato (TPP) (Yu *et al.*, 2018). Sin embargo, la incorporación de otros contraiones, como el alginato de sodio, el carragenano y el glutaraldehído, ha permitido la síntesis de estos materiales, sin que pierdan su actividad biológica (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018c).

Otro aspecto que cabe destacar es que, debido a la complejidad del aislamiento y la purificación de las enzimas de fuentes naturales, estos materiales suelen ser sintetizados con lisozimas comerciales de clara de huevo de pollo, reduciendo su aplicación en la actividad biológica (Cuadro 2). Algunos reportes sugieren que las lisozimas aisladas de plantas, ya sea si son de tipo-c o de tipo-i, pueden afectar una amplia diversidad de hongos, especialmente especies fitopatógenas, donde las enzimas fue aislada (Wang *et al.*, 2005; Manikandan *et al.*, 2015). Aunque en los últimos años se ha hecho mucho más investigación sobre el quitosano y la lisozima, hoy en día, los materiales funcionales generados a base de éstos han abierto una nueva línea de investigación en todo el mundo.

Conclusiones y perspectivas. Las lisozimas están presentes en una gran variedad de organismos vivientes y, de manera notable, desempeñan una función importante en el sistema inmunológico, la digestión y la nutrición. Hoy en día se sabe que las lisozimas y las enzimas tipo lisozima pueden inhibir el crecimiento bacteriano y afectar el desarrollo de hongos y levaduras. Los mecanismos de acción para inhibir el desarrollo de hongos y bacterias que se han reportado incluyen agregación en la superficie de la célula y, posteriormente, la actividad de la muramidasa y/o isopeptidasa, que afecta importantes proteínas y polisacáridos presentes en la pared celular. Sin embargo, todavía no se sabe muy bien de qué manera el mecanismo inhibe los polisacáridos

LITERATURE CITED

- Bautista-Baños S, Romanazzi G and Jiménez-Aparicio A. 2016. Chitosan in the preservation of agricultural commodities. 1st Edition. Elsevier Academic Press. New York, USA. 384 pp. ISBN 9780128027356. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03033-X>
- Bilal M and Iqbal HMN. 2019. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules* 130(1): 462–482. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.152>
- Cao D, Wu H, Li Q, Sun Y, Liu T, Fei J, Zhao Y, Wu S, Hu X and Li N. 2015. Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PloS one* 10(2): e0118626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118626>
- Chen T, Ren C, Wang Y, Luo P, Jiang X, Huang W and Hu C. 2016. Molecular cloning, inducible expression and antibacterial analysis of a novel i-type lysozyme (lyz-i2) in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 54(1): 197–203. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.04.008>
- Deng Q, Zhou C and Luo B. 2006. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology* 44(5): 336–342. <https://doi.org/10.1080/13880200600746246>
- Fiolka MJ, Ptaszyńska AA and Czarniawski W. 2005. Antibacterial and antifungal lysozyme-type activity in *Cameraria ohridella* pupae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90(1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.06.015>
- Gálvez-Irqui AC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Calderón-Santoyo M, Argüelles-Monal WM and Plascencia-Jatomea M. 2019. Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:2985–3000. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09670-w>
- Gow NAR, Latge JP and Munro CA. 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. Pp: 267–291. In: Heitman JGN, Howlett B, Crous P and Stukenbrock EJT (Eds.). *The Fungal Kingdom*. Vol. 5. ASM Press. Washington, DC., USA. 1160p. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>
- Han T, Nwe N, Furuike T, Tokura S and Tamura H. 2012. Methods of *N*-acetylated chitosan scaffolds and its *In-vitro* biodegradation by lysozyme. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 5(1): 15–23. <https://doi.org/10.4236/jbise.2012.51003>
- Hardin J, Bertoni GP and Kleinsmith LJ. 2016. Enzymes: The Catalysts of Life. Pp:142-146. In: Hardin J and Bertoni G (Eds.). *Becker's World of the Cell*. 9th ed. Pearson Higher Ed. USA. 920p.
- Held J and van Smaalen S. 2014. The active site of hen egg-white lysozyme: flexibility and chemical bonding. *Acta Crystallographica Section D* 70(4): 1136–1146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S1399004714001928>
- Hernández-Téllez CN, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Rosas-Burgos EC, Lizardi-Mendoza J,

de los hongos y la levadura. Aunque la lisozima de tipo-c es la que más se utiliza con propósitos antimicrobianos, otros tipos de lisozima manifiestan esta actividad. Por esta razón, es necesario estudiar cuidadosamente todos los tipos de lisozimas y las enzimas tipo lisozima, en particular las de plantas e insectos, ya que pueden afectar no solo a las bacterias sino también a los hongos patógenos y a levaduras. Con base en una revisión de literatura, se ha propuesto la producción de micro- y nanomateriales formulados con estas enzimas antimicrobianas y matrices poliméricas, y estas últimas con polímeros policatiónicos como el quitosano. Dado que se espera que esta combinación pueda actuar de manera signéfica en la preservación de alimentos, la protección de cultivos y formulaciones farmacéuticas, es además indispensable estudiar las implicaciones de su aplicación en el laboratorio y a niveles más altos, específicamente, en materiales destinados al control de hongos fitopatógenos.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Torres-Arreola W and Plascencia-Jatomea M. 2018. Chitosan/ carrageenan/lysozyme particles: Synthesis, characterization and antifungal activity against *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17(3): 897-912. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Hernandez>
- Hernández-Téllez CN, Rodríguez-Córdova FJ, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Lizardi-Mendoza J and Plascencia-Jatomea M. 2017. Activity of chitosan-lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and  $\beta$ -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech* 7(5): 279. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0913-4>
- Huang W, Xu H, Xue Y, Huang R, Deng H and Pan S. 2012. Layer-by-layer immobilization of lysozyme-chitosan-organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International* 48(2): 784–791. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.06.026>
- Jana M, Ghosh A, Santra A, Kar RK, Misra AK and Bhunia A. 2017. Synthesis of novel muramic acid derivatives and their interaction with lysozyme: Action of lysozyme revisited. *Journal of Colloid and Interface Science* 498: 395–404. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.03.060>

- Kim M, Park M and Jeong Y. 2012. Purification and characterization of lysozyme from filipino venus, *Ruditapes philippinarum*. Food Science and Biotechnology 21(5): 1463–1468. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0193-z>
- Liburdi K, Benucci I, Palumbo F and Esti M. 2016. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. Food Control 63: 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.015>
- Lopera D, Aristizabal BH, Restrepo A, Cano LE and González A. 2008. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungi fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 50(3): 169–175. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000300008>
- Manikandan M, Balasubramaniam R and Chun SC. 2015. A single-step purification of Cauliflower lysozyme and its dual role against bacterial and fungal plant pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology 177(2): 556–566. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1747-3>
- Matouskova P, Marova I, Bokrova J and Benesova P. 2016. Effect of encapsulation on antimicrobial activity of herbal extracts with lysozyme. Food technology and biotechnology 54(3): 304. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4413>
- Monteiro JM, Pereira AR, Reichmann NT, Saraiva BM, Fernandes PB, Veiga H and Pinho M. G. 2018. Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis. Nature 554(7693): 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature25506>
- Oh YH and Park NG. 2018. Isolation of an invertebrate-type lysozyme from the body wall of spoon worm, *Urechis unicinctus*. Journal of Life Science 28(3): 300–306. <https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.3.300>
- Phillips D. 1967. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. Pp: 483–495. In: Symposium on Three-Dimensional Structure of Macromolecules of Biological Origin on October 19, 1966. Vol. 57(3). National Academy of Sciences. Durham, North Carolina, USA. 550p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC335535/?page=10>
- Piras AM, Maisetta G, Sandreschi S, Esin S, Gazzarri M, Batoni G and Chiellini F. 2014. Preparation, physical-chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. International Journal of Biological Macromolecules 67: 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.016>
- Sheng L, Wang J, Huang M, Xu Q and Ma M. 2016. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. International Journal of Biological Macromolecules 92: 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.068>
- Sawasdiupksa N, Lei Z, Sumner LW, Niyomploy P and Sangvanich P. 2011. A lysozyme with antifungal activity from *Pithecellobium dulce* seeds. Food Technology and Biotechnology 49(4): 489–494. [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=111619](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=111619)
- Sebaa S, Hizette N, Boucherit-Otmani Z and Courtois P. 2017. Dose-dependent effect of lysozyme upon *Candida albicans* biofilm. Molecular Medicine Reports 15(3): 1135–1142. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6148>
- Sowa-Jasilek A, Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Wydrych J, Skrzypiec K, Mak P and Cytryńska M. 2016. *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells. Microbiological Research 193: 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.10.003>
- Stick RV, Williams SJ, Stick RV and Williams SJ. 2009. Enzymatic cleavage of glycosides: mechanism, inhibition and synthetic applications. Pp: 253–284. In: Stick RV and Williams S (Eds.). Carbohydrates: the essential molecules of life. Elsevier Science. 2nd Ed. 496pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-52118-3.00007-7>
- Strader S. 2018. Human Lysozyme. University of Virginia. [https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch06\\_Strader\\_S\\_Lysozyme\\_\(Human\)-\\_/index.html](https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch06_Strader_S_Lysozyme_(Human)-_/index.html). (Consulta, 23 Julio 2020).
- Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Kumar VA and Biswas R. 2013. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. Microbiological Research 168(7): 396–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.005>
- Taylor EJ, Skjöt M, Skov LK, Klausen M, De Maria L, Gippert GP, Turkenburg JP, Davies GJ and Wilson KS. 2019. The C-type lysozyme from the upper gastrointestinal tract of *Opisthocomus hoatzin*, the stinkbird. International Journal of Molecular Science 20(22): 5531. <https://doi.org/10.3390/ijms20225531>
- Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS and Guebitz GM. 2013. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. Biotechnology Journal 8(1): 97–109. <https://doi.org/10.1002/biot.201200313>
- Wang D and Jiang W. 2019. Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. International Journal of Biological Macromolecules 126: 1125–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.243>
- Wang S, Ng TB, Chen T, Lin D, Wu J, Rao P and Ye X. 2005. First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. Biochemical and Biophysical Research Communications 327(3): 820–827. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.077>
- Wang ZZ, Zhan LQ and Chen X. 2018. Two types of lysozymes from the whitefly *Bemisia tabaci*: Molecular characterization and functional diversification. Developmental and Comparative Immunology 81: 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.012>
- Woods CN, Hooper DN, Ooi EH, Tan L-W and Carney AS. 2011. Human lysozyme has fungicidal activity against nasal fungi. American Journal of Rhinology & Allergy 25(4): 205–208. <https://doi.org/10.2500/ajra.2011.25.3631>
- Wu T, Ge Y, Li Y, Xiang Y, Jiang Y and Hu Y. 2018a. Quality enhancement of large yellow croaker treated with edible coatings based on chitosan and lysozyme. International Journal of Biological Macromolecules 120: 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.08.188>
- Wu T, Huang J, Jiang Y, Hu Y, Ye X, Liu D and Chen J. 2018b. Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. Food Chemistry 240: 361–369. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.07.052>
- Wu T, Jiang Q, Wu D, Hu Y, Chen S, Ding T and Chen J. 2019. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. Food Chemistry 274: 698–709. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.017>

- Wu T, Li Y, Shen N, Yuan C and Hu Y. 2018c. Preparation and characterization of calcium alginate-chitosan complexes loaded with lysozyme. *Journal of Food Engineering* 233: 109-116. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.03.020>
- Wu T, Wu C, Fu S, Wang L, Yuan C, Chen S and Hu Y. 2017. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 155: 192–200. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.08.076>
- Yu WZ, Zhang Y, Liu X, Xiang Y, Li Z and Wu S. 2018. Synergistic antibacterial activity of multi components in lysozyme/chitosan/silver/hydroxyapatite hybrid coating. *Materials & Design* 139: 351–362. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2017.11.018>
- Yu YS, Lee JY, Woo JW, Kim JS, Bae YH, Cho SJ and Park SC. 2019. Identification and expression pattern of a new digestive invertebrate-type lysozyme from the earthworm. *Genes & Genomics* 41(3): 367–371. <https://doi.org/10.1007/s13258-018-0776-z>
- Zhou J, Zhao S, Fang WH, Zhou JF, Zhang JX, Ma H and Li XC. 2017. Newly identified invertebrate-type lysozyme (SpLys-i) in mud crab (*Scylla paramamosain*) exhibiting muramidase-deficient antimicrobial activity. *Developmental & Comparative Immunology* 74: 154–166. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2017.04.017>