

OBȚINEREA ȘI UTILIZAREA LIZOZIMEI DIN ALBUȘ DE OU

Autori: Nina MIJA, Vadim CURACIOV, Boris CARABULEA

Universitatea Tehnică a Moldovei

Abstract: *Lucrarea este dedicată procesului de extragere și utilizare a lizozimei din albuș de ou – proteină cu proprietăți antibiotice. La extragere se folosesc soluții de sare și acizi cu diferite concentrații pentru a asigura extragerea deplină a lizozimei și elaborarea regimului optim de obținere. Frațiile proteice de lizozimă sau utilizată la prepararea produselor lactate cu scopul de a inhiba activitatea microorganismelor patogene în procesul de fermentare a brânzeturilor de tip „Telemea”. Această fracție proteică (lizozima) se dizolvă bine în lapte și ușor se asimilează de organismul uman.*

Cuvinte cheie: *Lizozime, proteine, proprietăți antimicrobiene, fracționare, α – lactalbumină, brânză.*

1. Introducere

Lizozimul (E 1105) din albușul de ou se utilizează în industria brânzeturilor, pentru împiedicarea dezvoltării bacteriilor sporulate aparținând genului *Clostridium* și în special *Clostridium tirobotiricum*, care pot metaboliza acidul lactic pe care-l transformă în acid butiric și cantități importante de CO₂ și H₂. În afară de gustul neplăcut produce și o balonare a acestora, cu formare de găuri mari neregulate, care pot conduce chiar la “ruperea” brânzei.

Prin adaos de lizozimă se realizează liza celulei vegetative și deci se împiedică dezvoltarea bacteriilor butirice în lapte. Dacă în lapte ajung spori de *Cl. Tirobotiricum*, aceștia rezistă la pasteurizare și rămân în coagul, deci provoacă balonarea târzie a brânzeturilor.

Lizozimul împiedică dezvoltarea lactobacililor și în special dezvoltarea bacteriilor *Lb. helveticus*, folosite la fabricarea brânzei Șvaiter, astfel se împiedică acidifierea (maturarea) normală, lentă a laptelui. Bacteriile propionice nu sunt inhibitate de lizozime.

Lizozimul prezintă o globulină bazică (G₁). Este relativ stabilă la căldură, frig și alte condiții de activitate, fiind instabilă la acțiunea alcaliilor. Are acțiunea enzimatică ca depolimerizator al mucoproteinelor și activitatea chitinazică.

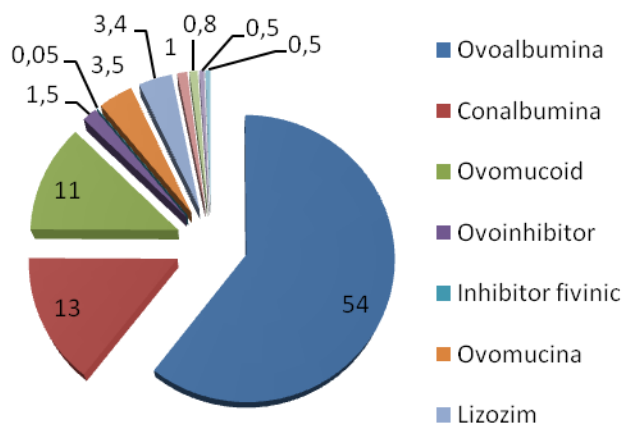


Fig. 1. Conținutul proteinelor în albușul de ou, (%)

Activitatea lizozimei se manifestă prin perforarea peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive, distruge bacteriile odontogene implicate în formarea tartrului dentar. Lizozimele catalizează hidroliza legăturilor B-1,4-glucozidice dintre acidul N-acetilmuramic și N-acetil-glucoz-amina, care se găsesc în peretele celular ale anumitor microorganisme. Lizozima este utilizată pentru hidroliza acestui perete microbial cu eliberarea conținutului celular.

Enzimele care posedă activitate lizozimică au fost identificate în bacterii, bacteriofagi și leucocite, secreții nazale, saliva și lacrimi – toate exercitându-și activitatea împotriva bacteriilor Gram pozitive. Acest efect antimicrobian a fost demonstrat și asupra populațiilor bacteriene patogene la nivelul cavitației bucale.

Scopul acestei lucrări este studierea modului de obținere a lizozimei din albuș de ou și analiza rezultatelor obținute în urma înglobării acestei fracții proteice în produse lactate - brânza "Telemea".

2. Materii prime și metode de analiză

În cercetare au fost utilizate materiile prime: ouă de găină; soluție de NaOH 0,1N; soluție de NaOH 20 – 30 %; soluție de CuSO₄ de 1 %; soluții de aminoacizi 0,1%; soluție de ninhidrină 0,2%; cationiți; soluție de HCl 1N; săruri de Na₂CO₃ și NaCl cristaline, acid CH₃-COOH lichid.

Compoziția oului integral variază în funcție de specie, în limite foarte restrânse. Compoziția chimică a oului de găina ca materie primă este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1

Compoziția chimică a oului integral (melanj), albuș și gălbenuș. [4]

Componentul	Oul integru, %	Albuș, %	Gălbenuș, %
Apă	75	88	48
Proteine	13,3	10,5	16
Lipide	11,6	0,03	34
Glucide	0,8	0,8	0,9
Cenușă	0,9	0,7	0,6

La determinarea indicilor de calitate și mediului de extragere a lizozimei sau utilizat următoarele metode de analiză:

Metoda cromatografică. Esența metodei constă în trecerea albușului de ou nediluat, prin coloana cromatografică de cationiți, în care are loc absorbția maximă a lizozimei pe suprafața cationiților, după care lizozima este extrasă de pe suprafață cu ajutorul soluției de carbonat de amoniu cu pH 9 .

Metoda fizico-chimică. Esența metodei constă în tratare termică a albușului de ou și separarea fracției proteice de lizozimă prin acțiunea acizilor alimentari (exemplu: CH₃-COOH).

Determinarea alcalinității. Această metodă este utilizată pentru determinarea acidității produselor lactate cu adaus de lizozimă.

Reacția Biuret. Identificarea proteinelor din produsele alimentare. Această reacție este utilizată pentru determinarea concentrației de proteine, în soluții puternic alcaline.

Reacția cu ninhidrină. Identificarea aminoacizilor. Această reacție fiind foarte sensibilă este utilizată în metode de identificare și dozare ale aminoacizilor, datorită acțiunii ninhidrinei cu pH 4 – 8, reprezentând o reacție calitativă de determinare a lizozimei.

3. Analiza și discuții

Prospețimea ouălelor. La extragerea lizozimei se recomandă de a folosi numai ouă proaspete. În acest scop sa determinat prospețimea cu ajutorul ovoscopului, fig. 2, a. Ouăle proaspete au o cameră de aer foarte mica. Pe măsura învechirii, camera de aer se mărește și devine mobilă. Interiorul ouălor proaspete este limpede, gălbenușul este întreg, așezat în centru și apare o umbră fără contur determinat. Pe măsura alterării, gălbenușul devine vizibil, este mobil sau poate fi fixat pe coaja, fig. 2, b.

La ouăle infectate se pot observa colonii de mușci sau bacterii pe membranele cochilifere, sub forma de pete de culoare închisă sau chiar negre. Aceste ouă sunt scoase din circuitul economic, deoarece reprezintă un real pericol de infectare a organismului uman, inclusiv a mediului.

În urma defășurării proceselor de respirație sau degradare componenții chimici sunt hidrolizați sau chiar oxidați. Din aceste motive, camera de aer crește, iar ouăle își reduc densitatea în funcție de prospețime și ca urmare, ocupă poziții diferite într-un vas cu apă rece sau în soluție de sare la diferite concentrații, fig. 2, c.

Proteinele oului includ un șir de fracții, care se caracterizează cu diferite puncte izoelectrice, care se ating la anumite valori ale pH-ului. Această caracteristică da posibilitatea de a separa fiecare fracție și de a determina cantitatea ei.

În figura 3 sunt prezentate fracțiile proteice ale oului și valorile pH-ului, la care pot fi selectate și determinate, pentru a aprecia conținutul acestor proteine. Pentru fracția de lizozimă punctul izoelectric optim se atinge la valoarea pH = 10,7.

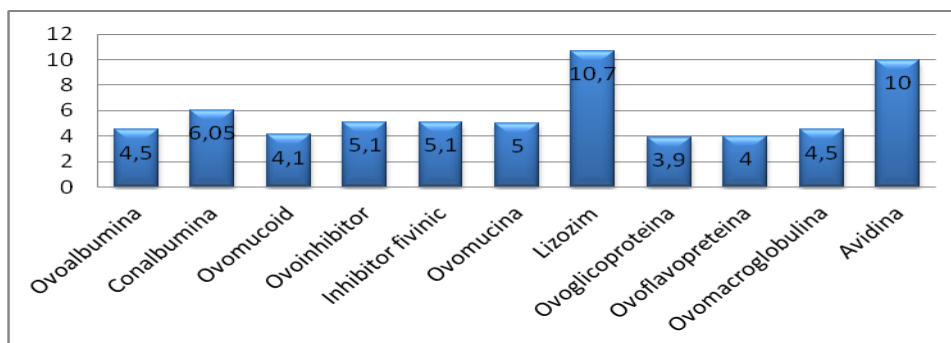
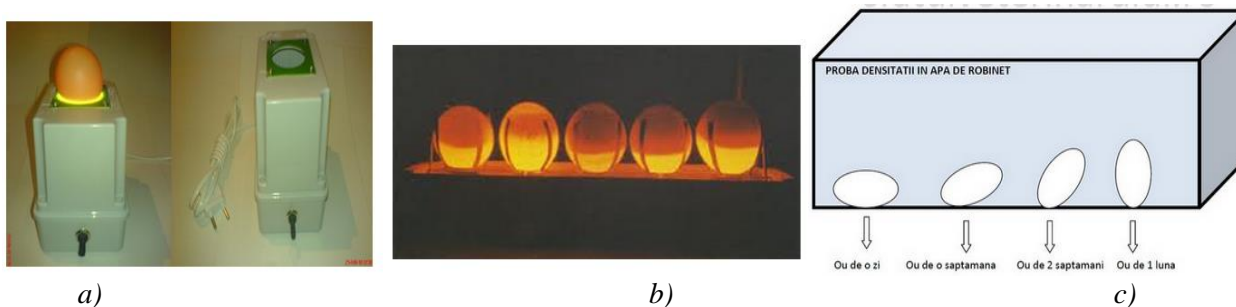


Fig. 3. Punctele izoelectrice ale fracțiilor proteice la valorile optime ale pH-ului

Obținerea fracției de lizozimă, prezintă un proces tehnologic, care include diferite operațiuni de tratare cu soluții alimentare pentru o extragere mai complexă și totodată selectarea ei din albușul de ou. Schema tehnologică de tratare a albușului de ou cu obținerea lizozimei este prezentată în fig. 4.

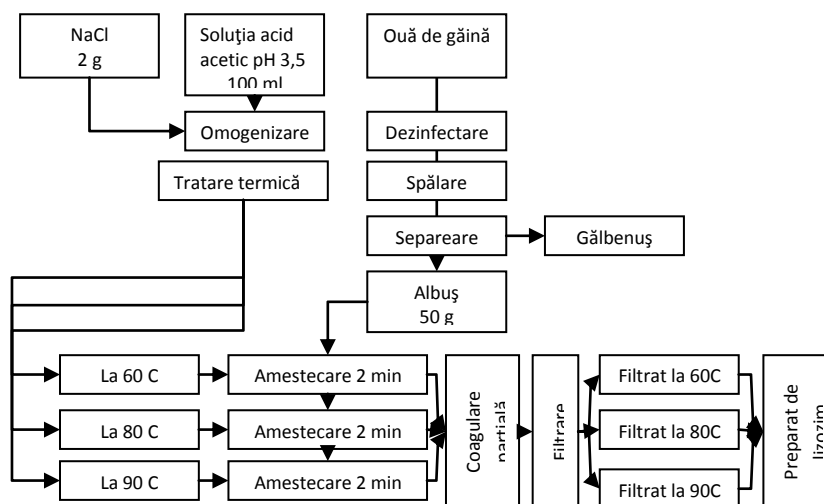


Fig. 4. Schema generală de separare a fracțiilor proteice de lizozimă din albușul de ou

Conform schemei fig. 4, ouăle se șterg cu alcool pentru dezinfectare, apoi se separă albușul de celelalte componente. Albușul în cantitate de 0,5 kg se supune malaxării pentru a obține o masă omogenă.

Într-o colbă de 3 l se toarnă 1 l de H₂O distilată, se adaugă acid acetic pentru a obține aciditatea activă de pH 3,5, după care se adaugă 20 g NaCl și se supune încălzirii. Extragerea lizozimei se face prin încălzire la o temperatură constantă de 60 – 100 °C, cu intervalul de 10 °C. În procesul de încălzire soluția acidă se amestecă lent. În soluția încălzită la o temperatură constantă se adaugă 0,5 kg albuș, se menține timp de 1 – 2 min. Suspensia obținută se răcește, se filtrează. În fracția filtrată se adaugă CaCO₃, pentru a majora aciditatea activă până la pH = 7, la care are loc sedimentarea cretei, iar soluția lichidă cu conținut de lizozimă se filtrează de 2 ori. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2.

Extragerea lizozimei la diferite temperaturi		
Temperatura, °C	Consistența masei la extragere	Conținutul de lizozimă, %
60	Masă gelatinoasă, filtrare slabă	18
70	Masă gelatinoasă urmărit de formarea fulgilor	28
80	Depunerea masei fibrilare restului de proteine	43
90	Depunerea masei fibrilare restului de proteine	69
100	Depunerea masei fibrilare restului de proteine	48

Analizând datele tabelului 2 se poate concluziona, că temperatura optimă de separare este 85÷90°C. La o temperatură mai joasă de 60 °C, are loc denaturarea lentă a proteinelor ceea ce duce la separarea neefectivă a lizozimei. Cea mai mare cantitate de lizozimă (69%), se obține la temperatura de 90 °C.

Lizozima obținută s-a utilizat la fabricarea brânzei de vaci "Telemea". În laptele normalizat s-a adăugat cantitatea necesară de lizozimă, după care s-a efectuat fermentarea cu obținerea brânzei respective. Compoziția brânzei "Telemea" este prezentată în tabelul 3.

Tabelul 3.

Compoziția chimică și valoarea energetică a brânzei "Telemea"				
Denumirea produsului	Proteine	Lipide	Carbohidrați	Valoarea energetică, kcal/100 g
Brânza „Telemea”	15	24	0,7	279

Brânza "Telemea" cu conținut de lizozimă a fost supusă păstrării la temperatura 0...+4 °C, timp de 15 zile. Pe parcursul păstrării peste fiecare 2 – 3 zile s-a determinat conținutul și tipul de microorganisme. S-a constatat, că procesul de dezvoltare a mucegaiului apare la a 12 zi. S-a observat că cu cât conținutul de lizozimă în produs este mai mare cu atât durata de păstrare este mai avansată.

Concluzii:

1. Lizozima este o proteină din ou, care poate fi extrasă în soluții bazice sau acide. În lucrarea dată s-a folosit metoda acidă, în care soluția a fost adusă la pH = 3,5 apoi prin neutralizare - majorată până la pH =7,0.

2. S-a studiat influența temperaturii asupra procesului de extragere a lizozimei în intervalul 60 – 100 °C, cu frecvența de 10 °C. S-a constatat, că cea mai mare cantitate de lizozimă se obține la temperatura 90 °C.

3. În scopul majorării duratei de păstrare, lizozima obținută din albușul de ou, s-a utilizat la fabricarea brânzei "Telemea". S-a stabilit, că lizozima este un protector-antibiotic natural, care asigură majorarea duratei de păstrare a brânzei de 2-3 ori față de durata de păstrare indicată în documentația tehnică.

Bibliografia:

1. Metode de indentificare a proteinelor ouălelor și determinarea conținutului de aminoacizi. <http://acio.ru/read.php?id=8>
2. Leon Bugan. Determinarea lizozimei ca fracție proteica, prin diferite metode .
3. Jurnalul Nutrițional. J. Nutr., 1984. Analiza aminoacizilor și determinarea indicelui chimic al proteinei. Patent nr.114:682-691, USA.