

## Cuantificarea lizozimului din extracte apoase de albuș de ou hiperimun și din produse biologice prin testul ELISA Sandwich

### Quantification of lysozyme in hyperimmune egg white aqueous extracts and in biological products by Sandwich ELISA test

Viorica Chiurciu<sup>1</sup>, Mariana Oporanu<sup>1</sup>, V. Iordănescu<sup>1</sup>, Lucica Sima<sup>1</sup>, Teodora Supeanu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Romvac Company S.A., Șos. de Centură, nr. 7, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

[lucica.sima@romvac.ro](mailto:lucica.sima@romvac.ro)

**Cuvinte cheie:** lizozim, ou hiperimun, test ELISA

**Key words:** lysozyme, hyperimmune egg, ELISA test

#### Rezumat

Lizozimul este o proteină biologic activă prezentă în albușul de ou, având rol esențial în apărarea imunitară a embrionului. Datorită proprietăților sale antimicrobiene, acesta se extrage și se utilizează în prepararea diferitelor produse cu rol de conservant și/ sau de ingredient bioactiv. Analiza calitativă și cantitativă a acestuia poate fi efectuată prin variate metode de testare prezentate pe larg în literatura de specialitate. Lucrarea de față prezintă rezultatele obținute în urma evaluării conținutului de lizozim din soluții apoase derivate din albuș de ou hiperimun și din produsele biologice active în care acesta a fost inclus folosind tehnica ELISA sandwich.

#### Abstract

Lysozyme is a biologically active protein present in egg whites, having an essential role in the immune defense of the embryo. Due to its antimicrobial properties, it is extracted and used in the composition of various products as a preservative and/or a bioactive ingredient. Its qualitative and quantitative analysis can be performed by various test methods widely presented in the literature. The present paper presents the results obtained in assessing the lysozyme content of aqueous solutions derived from hyperimmune egg white and from biologically active products in which it was included by using the sandwich ELISA technique.

#### Introducere

Lizozimul (N-acetilmuramid glicanhidrolază sau muramidază) este o enzimă omniprezentă într-o varietate de lichide biologice și țesuturi atât la animale cât și la plante. Acesta este considerat o proteină-model utilizată în studii imunologice, structurale, fiziochimice, cristalografice și de evoluție (Vidal și col., 2005). Sursa principală de lizozim este albușul de ou, acesta reprezentând 3,4% din totalul proteinelor. De altfel, lizozimul reprezintă un factor cheie al sistemului imunitar al embrionului, având rol protector împotriva agresiunii bacteriene (Schneider și col., 2010). Sunt binecunoscute proprietățile sale antibacteriene, dar și cele antivirale, antitumorale și imunomodulatoare.

De aceea, lizozimul este folosit drept conservant în industria alimentară și în produsele farmaceutice (Kerkaert și col., 2010). Cercetătorii au utilizat o serie de metode de cuantificare a lizozimului, una dintre ele având la bază acțiunea litică a acestei enzime asupra peretelui celular al *Micrococcus lysodeikticus*. Alte metode de cuantificare a lizozimului se bazează pe evidențierea proteinei prin tehnici electroforetice, cromatografice și imunoenzimatice (MacKay și col., 1984). Tehnica ELISA, varianta sandwich, datorită sensibilității și specificității ridicate, se utilizează pentru determinarea cantitativă a lizozimului, fiind aplicabilă pentru o gamă variată de probe (ser, plasmă, lapte, lizate

celulare, omogenate tisulare, produse biologice care conțin albuș, alte lichide biologice) (Kerkaert și col., 2010; MacKay și col., 1984; Thonar și col., 1988).

Departamentul de Cercetare-Dezvoltare al Companiei Romvac a demarat un experiment care a vizat obținerea de produse terapeutice pe bază de lizozim, desfășurat în mai multe etape: extracția acestuia din albuș de ou hiperimun, purificarea, caracterizarea și încorporarea în produse variate și evaluarea acestora privind conținutul de lizozim. Prezenta lucrare descrie experimentele în care 8 probe constând în soluții apoase de albuș de ou hiperimun și produse biologic active cu conținut variabil de lizozim sunt analizate cantitativ prin tehnica ELISA sandwich.

## 1. Material și Metodă

Cuantificarea lizozimului a fost efectuată prin tehnica ELISA sandwich utilizând kit-ul de reagenți Chicken LYZ / Lysozyme ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, Inc.), descris în Tabelul 1. Acesta presupune o detecție colorimetrică la o lungime de undă de 450 nm, substratul cromogenic utilizat fiind TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidină).

Capacitatea de detecție a kit-ului este de 0,625-40 ng/mL, iar sensibilitatea este de obicei până la valoarea de 0,262 ng/mL.

**Tabelul 1.** Componentele kitului Chicken LYZ / Lysozyme ELISA (Sandwich ELISA)

Componente	Cantitate
Placă ELISA cu 96 stripuri căptușite	1 buc.
Standard liofilizat	2 flacoane
Diluant pentru probe	1 flacon cu 20 mL
Diluant de analiză A	1 flacon cu 12 mL
Diluant de analiză B	1 flacon cu 12 mL
Reagent de detecție A	1 flacon cu 120 μL
Reagent de detecție B	1 flacon cu 120 μL
Tampon de spălare (30x)	1 flacon cu 20 mL
Substrat TMB	1 flacon cu 9 mL
Soluție de spălare	1 flacon cu 6 mL
Folii adezive pentru placă	4 buc.

**Probele** testate au fost următoarele:

- P1 - Lizozim extras în soluție apoasă,
- P2 - Lizozim extras în soluție apoasă și concentrat,

- P3 - Proteine bioactive extrase din gălbenuș și albuș de ou hiperimun în soluție apoasă,
- P4 - Lizozim liofilizat și reconstituit la concentrația de 1 mg/ mL,
- P5 - Lizozim extras în soluție apoasă din ouă hiperimune recoltate de la găini hiperimunizate cu antigenul monovalent *Staphylococcus aureus*,
- P6 - Gel cu 46% soluție apoasă de lizozim,
- P7 - Gel cu 40% soluție apoasă de lizozim,
- P8 - Cremă cu lizozim.

Proba 5 conține lizozim extras din ouă recoltate de la găini hiperimunizate cu antigenul *Staphylococcus aureus*; celelalte probe conțin lizozim extras din ouă recoltate de la găini hiperimunizate cu antigen multiplu:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Salmonella spp.*,
- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Salmonella enteritidis*,
- *Salmonella typhimurium*,
- *Streptococcus mutans*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus grup B*,
- *Proteus mirabilis*,
- *Acinetobacter baumannii*,
- *Helicobacter pylori*,
- *Clostridium difficile*,
- *Candida albicans*,
- *Candida glabrata*,
- *Candida krusei*.

### 1.1. Prepararea probelor

Pentru a putea calcula concentrația de lizozim din probe, valorile densității optice ( $DO_{450nm}$ ) obținute în urma citirii la spectrofotometru trebuie să se încadreze în gama de valori DO obținute pentru lizozimul standard. În acest scop, probele sunt pregătite în diluții seriale, conform recomandărilor producătorului kitului, respectiv urmând Tabelul 2.

**Tabelul 2.** Prepararea de diluții seriale pentru probele testate

Tub	Diluția	Preparare
Tub 1	1:1	250 $\mu$ L probă
Tub 2	1:10	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 1
Tub 3	1:100	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 2
Tub 4	1:10 <sup>3</sup>	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 3
Tub 5	1:10 <sup>4</sup>	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 4
Tub 6	1:10 <sup>5</sup>	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 5
Tub 7	1:10 <sup>6</sup>	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 6
Tub 8	1:10 <sup>7</sup>	225 $\mu$ L tampon diluție + 25 $\mu$ L soluție din Tub 7

## 1.2. Prepararea lizozimului standard

Se resuspendă lizozimul standard liofilizat în 1 mL diluant pentru probe. Se obține astfel o soluție a acestuia de concentrație 80 ng/mL. Soluția respectivă se prepară în diluții seriale (**Tabelul 3**), care se folosesc imediat pentru testare.

**Tabelul 3.** Prepararea lizozimului standard în diluții seriale

Tub	Diluția	Preparare
Tub 1	40 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L standard
Tub 2	20 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L soluție din Tub 1
Tub 3	10 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L soluție din Tub 2
Tub 4	5 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L soluție din Tub 3
Tub 5	2,5 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L soluție din Tub 4
Tub 6	1,25 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L soluție din Tub 5
Tub 7	0,625 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție + 250 $\mu$ L soluție din Tub 6
Tub 8	0 ng/mL	250 $\mu$ L tampon diluție

## 1.3. Prepararea reagenților

Toți reagenții se aduc la temperatura camerei înainte de utilizare.

**Reagenții de detecție A și B.** Se pregătesc cantități suficiente de reagenți necesari testării probelor.

Se diluează Reagentul de detecție A într-o diluție de 1:100 utilizând Diluant de

analiză A. Se diluează Reagentul de detecție B într-o diluție de 1:100 utilizând Diluant de analiză B.

**Soluția de spălare.** Se prepară 600 mL Soluție de spălare prin diluarea a 20 mL soluție concentrată de 30x cu 580 mL apă deionizată. Soluția de spălare se depozitează apoi la 4°C.

**Substratul TMB.** Se extrage cantitatea necesară utilizând materiale sterile.

### 1.2.1. Tehnica de lucru

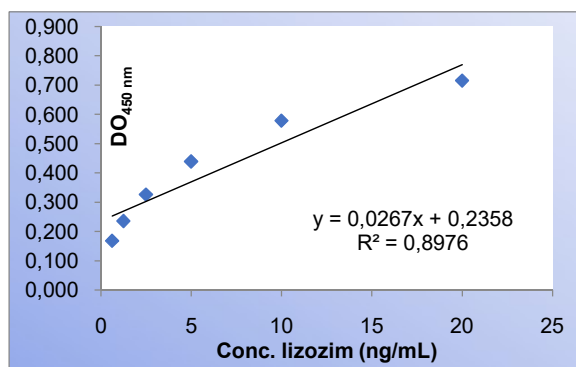
Reagenții și probele se aduc la temperatura camerei fără încălzire suplimentară și se amestecă ușor prin agitare, evitând spumarea. Se prepară reagenții, standardul și probele.

1. Se aplică câte 100  $\mu$ L de lizozim standard, martor negativ și probe în godeuri, se acoperă cu folie și se incubează 1 h la 37°C.
2. Se aspiră lichidul din fiecare godeu, nu se spală.
3. Se adaugă 100  $\mu$ L soluție de Reagent de detecție A în fiecare godeu, se acoperă cu folie și se agită ușor pentru amestec. Se incubează 1 h la 37°C.
4. Se aspiră lichidul din fiecare godeu și se spală de 3 ori. A se lăsa fiecare spălare să stea 1-2 minute înainte de a fi aspirată complet. După ultima spălare, a se aspira pentru îndepărtarea tamponului de spălare rămas, apoi a se răsturna placa să atingă o hârtie absorbantă curată.
5. Se adaugă 100  $\mu$ L soluție de Reagent de detecție B în fiecare godeu și se acoperă cu o altă folie. Se incubează 30 min la 37°C.
6. Se aspiră lichidul din fiecare godeu și se spală de câte 5 ori în mod similar pasului 4.
7. Se adaugă 90  $\mu$ L TMB, se acoperă cu o altă folie și se incubează 10-20 min la 37°C. A se feri de lumină și a se urmări periodic virarea culorii.
8. Se adaugă 50  $\mu$ L soluție de stopare în fiecare godeu. Se adaugă în aceeași ordine în care s-a adăugat TMB.
9. Se citește imediat densitatea optică ( $DO_{450}$  nm).

## 2. Rezultate și Discuții

Lizozimul extras din albuș de ou hiperimun și cel integrat în produse biologice a fost cuantificat prin metoda ELISA sandwich utilizând kit-ul de reagenți Chicken LYZ/ Lysozyme ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, Inc.).

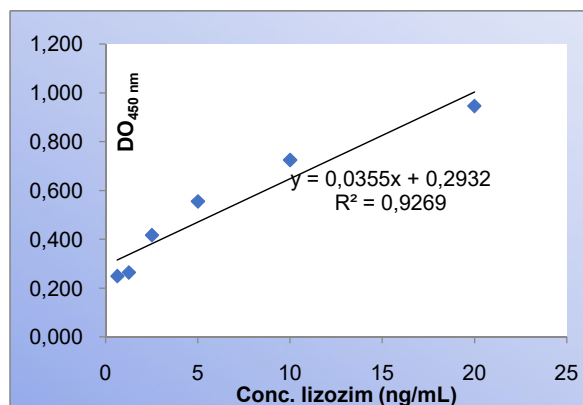
Lizozimul standard din kit (80 ng/mL) aplicat în diluții seriale (40 ng/mL; 20 ng/mL; 10 ng/mL; 5 ng/mL; 2,5 ng/mL; 1,25 ng/mL; 0,625 ng/mL) a fost utilizat pentru a realiza curbe de calibrare (Figura 1 și Figura 2) pe baza valorilor  $DO_{450nm}$  măsurate.



**Figura 1.** Curba de calibrare utilizată pentru determinarea cantitativă a lizozimului din probele P1-P4, reprezentând soluții apoase

Pentru prima curbă de calibrare s-a obținut ecuația dreptei  $y = 0,0267x + 0,2358$  cu un coeficient de corelație  $R^2 = 0,8976$ , ilustrată în Figura 1.

Utilizând această ecuație s-au calculat concentrațiile de lizozim din probele P1-P4.



**Figura 2.** Curba de calibrare utilizată pentru determinarea concentrației de lizozim din probele P5-P8 reprezentând produse biologice

Pentru a doua curbă de calibrare s-a obținut ecuația dreptei  $y = 0,0355x + 0,2932$ , cu un coeficient de corelație  $R^2 = 0,9269$ , ilustrată în Figura 2.

Utilizând această ecuație s-au calculat concentrațiile de lizozim din probele P5-P8, reprezentând produse biologice.

Ținând cont de tehnica de extracție a lizozimului din albuș și de modul de preparare a produselor în care a fost încorporat, probele P1, P2, P4 au fost diluate serial începând cu diluția  $1:10^3$ ; P3 și P5 începând cu diluția  $1:10^2$ ; P6 și P7 diluate începând cu  $1:10$ , iar P8 începând cu diluția  $1:2$  (Tabelele 4 și 5).

Rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile 3 și 4 și în Tabelele 6 și 7.

**Tabelul 4.**  
Configurarea plăcii ELISA nr. 1

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	St dil 1	St dil 1	P1 $1:10^3$	P1 $1:10^3$	P3 $1:10^2$	P3 $1:10^2$							A
B	St dil 2	St dil 2	P1 $1:10^4$	P1 $1:10^4$	P3 $1:10^3$	P3 $1:10^3$							B
C	St dil 3	St dil 3	P1 $1:10^5$	P1 $1:10^5$	P3 $1:10^4$	P3 $1:10^4$							C
D	St dil 4	St dil 4	P1 $1:10^6$	P1 $1:10^6$	P3 $1:10^5$	P3 $1:10^5$							D
E	St dil 5	St dil 5	P2 $1:10^3$	P2 $1:10^3$	P4 $1:10^3$	P4 $1:10^3$							E
F	St dil 6	St dil 6	P2 $1:10^4$	P2 $1:10^4$	P4 $1:10^4$	P4 $1:10^4$							F
G	St dil 7	St dil 7	P2 $1:10^5$	P2 $1:10^5$	P4 $1:10^5$	P4 $1:10^5$							G
H	Blank	Blank	P2 $1:10^6$	P2 $1:10^6$	P4 $1:10^6$	P4 $1:10^6$							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

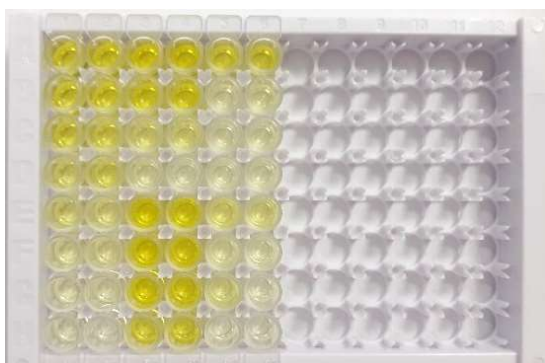


Figura 3. Imaginea plăcii ELISA nr. 1

Tabelul 5.

Valorile densităților optice obținute pentru lizozimul standard și Probele testate P1-P4

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.791	0.889	1.130	1.211	0.732	0.714							A
B	0.701	0.730	0.860	0.946	0.193	0.228							B
C	0.629	0.529	0.359	0.340	0.183	0.198							C
D	0.402	0.478	0.196	0.149	0.170	0.177							D
E	0.346	0.308	1.356	1.077	0.369	0.314							E
F	0.225	0.247	1.352	1.111	0.199	0.185							F
G	0.167	0.171	1.205	1.027	0.302	0.139							G
H	0.156	0.114	0.669	0.697	0.139	0.126							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Se remarcă valori medii ale DO  $\bar{x}=1,171$  ridicate decât valoarea medie a DO pentru pentru proba P1 și  $\bar{x}=1,216$  pentru P2 mai lizozimul standard ( $\bar{x}=0,840$ ) la aceeași diluție.

Tabelul 6.

Configurarea plăcii ELISA nr. 2

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	St dil 1	St dil 1	P5 1:10 <sup>2</sup>	P5 1:10 <sup>2</sup>	P7 1:10	P7 1:10							A
B	St dil 2	St dil 2	P5 1:10 <sup>3</sup>	P5 1:10 <sup>3</sup>	P7 1:10 <sup>2</sup>	P7 1:10 <sup>2</sup>							B
C	St dil 3	St dil 3	P5 1:10 <sup>4</sup>	P5 1:10 <sup>4</sup>	P7 1:10 <sup>3</sup>	P7 1:10 <sup>3</sup>							C
D	St dil 4	St dil 4	P5 1:10 <sup>5</sup>	P5 1:10 <sup>5</sup>	P7 1:10 <sup>4</sup>	P7 1:10 <sup>4</sup>							D
E	St dil 5	St dil 5	P6 1:10	P6 1:10	P8 1:2	P8 1:2							E
F	St dil 6	St dil 6	P6 1:10 <sup>2</sup>	P6 1:10 <sup>2</sup>	P8 1:10	P8 1:10							F
G	St dil 7	St dil 7	P6 1:10 <sup>3</sup>	P6 1:10 <sup>3</sup>	P8 1:10 <sup>2</sup>	P8 1:10 <sup>2</sup>							G
H	Blank	Blank	P6 1:10 <sup>4</sup>	P6 1:10 <sup>4</sup>	P8 1:10 <sup>3</sup>	P8 1:10 <sup>3</sup>							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

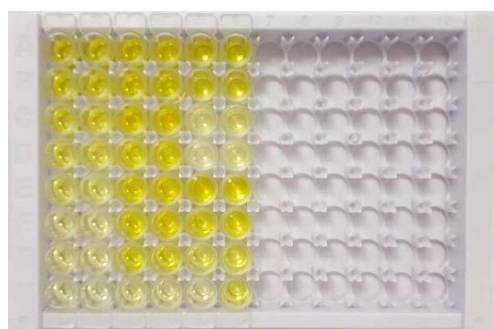


Figura 4. Imaginea plăcii ELISA nr. 2

Tabelul 7.

Valorile densităților optice obținute pentru lizozimul standard și Probe testate P5-P8

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.053	1.053	1.366	1.334	1.440	1.390							A
B	0.976	0.916	1.242	1.352	0.960	0.966							B
C	0.759	0.691	1.561	1.503	0.305	0.382							C
D	0.560	0.551	1.075	1.234	0.202	0.284							D
E	0.471	0.364	1.428	1.405	1.523	1.211							E
F	0.283	0.246	1.217	1.246	1.030	1.119							F
G	0.274	0.226	0.917	0.825	0.474	0.626							G
H	0.199	0.181	0.294	0.289	0.204	0.558							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Se remarcă faptul că valoarea medie a DO pentru proba P5 este de 1,350 mai mare comparativ cu valoarea medie a DO pentru standard ( $\bar{x}=1,053$ ) la aceeași diluție.

În Tabelul 7 și Figurile 5 și 6 sunt prezentate concentrațiile de lizozim obținute pentru probele analizate.

Se remarcă o valoare ridicată a lizozimului în proba concentrată (1674,906 mg/100 mL) pentru P2 și o valoare scăzută (0,397 mg/100 mL) în proba P4 liofilizată și ajustată la 1 mg pulbere liofilizată/ mL. În produse, concentrația lizozimului variază în funcție de procentul de lizozim adăugat.

Tabel 8.

Rezultatele concentrației în lizozim din probele P1-P8 obținute prin testul ELISA sandwich

Proba		Concentrație lizozim (mg/ 100 mL)
P1	Lizozim extras în soluție apoasă	42,547
P2	Lizozim extras în soluție apoasă și concentrat	1674,906
P3	Proteine bioactive extrase din gălbenuș și albuș din ou hiperimun în soluție apoasă	0,182
P4	Lizozim extras liofilizat reconstituit la concentrația de 1 mg/mL	0,397
P5	Lizozim purificat extras din ouă hiperimune recoltate de la găini hiperimunizate cu antigenul <i>Staphylococcus aureus</i>	386,856
P6	Gel cu 46 % soluție apoasă de lizozim	1,628
P7	Gel cu 40 % soluție apoasă de lizozim	0,141
P8	Cremă cu lizozim	0,072

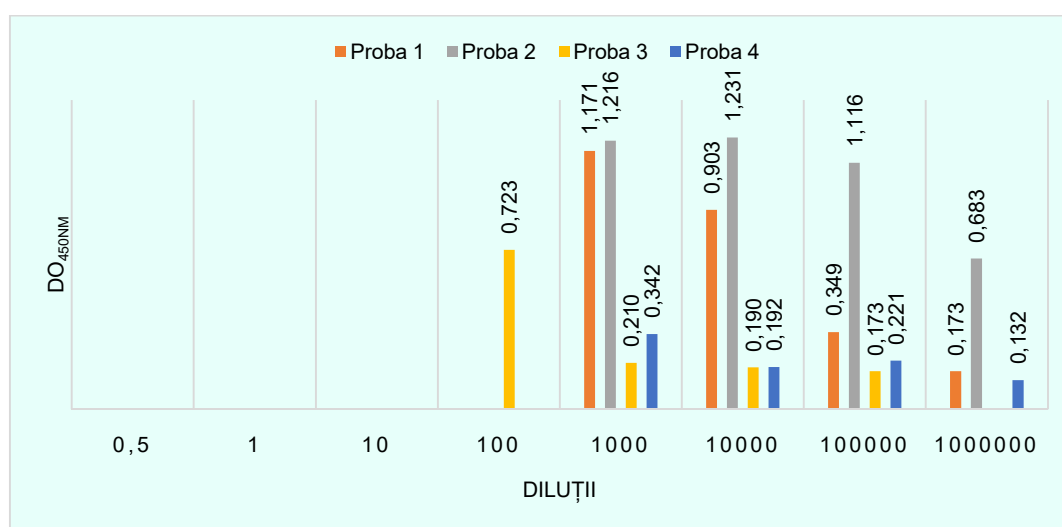


Figura 5. Valorile densităților optice ale probelor P1-P4 obținute prin testul ELISA sandwich



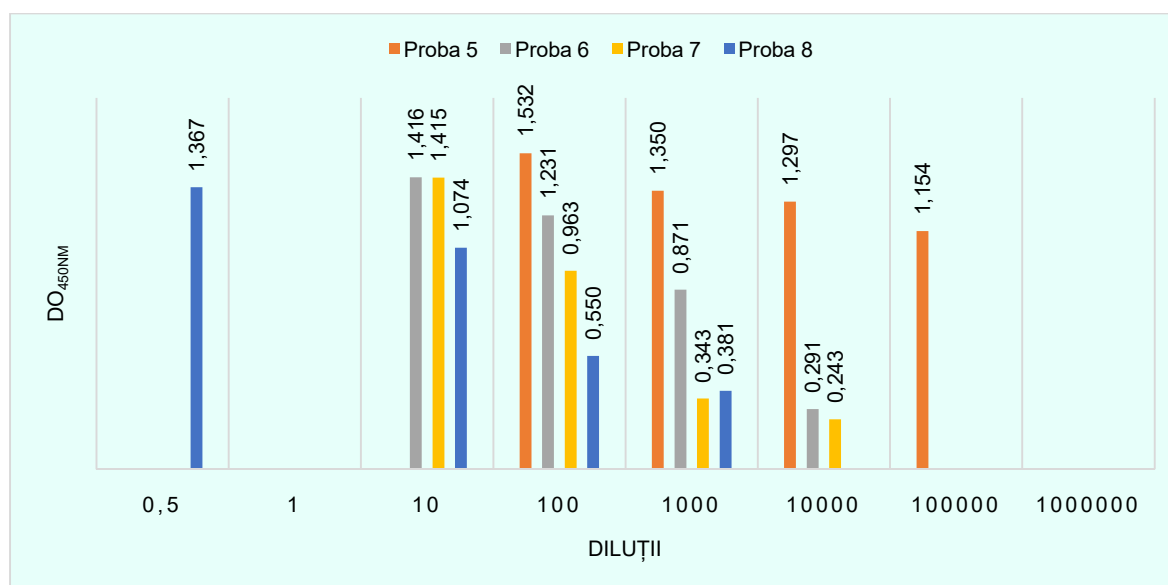


Figura 6. Valorile densităților optice ale probelor P5-P8 obținute prin testul ELISA sandwich

### 3. Concluzii

- Metoda ELISA sandwich a fost utilizată pentru determinarea concentrației de lizozim extras din albuș de ou hiperimun din diferite probe constând în soluții apoase și produse biologice active.
- Rezultatele au relevat valori ale concentrației de lizozim extras variabile în funcție de probele testate. În produsele biologice, concentrația lizozimului a avut valori mai mici comparativ cu soluțiile apoase din care au fost preparate.
- Metoda s-a dovedit a fi sensibilă și specifică, putând fi utilizată în mod curent în cuantificarea lizozimului prezent în diferite produse.

### 4. Mulțumiri

Lucrarea a fost realizată prin proiectul POC-G, Cod SMIS: 105631, ID: P\_40\_197, Grant nr. 52/2016, obținut de către Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București, Componentă de proiect nr. 673/2019 Romvac Company S.A.

### Bibliografie

1. Kerkaert, B., Mestdagh, F., De Meulenaer, B., (2010). Detection of Hen's Egg White Lysozyme in food: Comparison between a

sensitive HPLC and a commercial ELISA method. *Food Chemistry*, **120**, 580-584.

2. MacKay, B.J., Hannah Goodman, Cox, D., Barbara L. Crossbard, Iacono, V.J., Pollock, J.J., (1984). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Lysozyme in Human Parotid and Submandibular-Sublingual Salivas. *Journal of Clinical Microbiology*, **19** (6), 844-848.
3. Schneider Nadine, Ingrid Weigel, Werkmeister, K., Monika Pischetsrieder, (2010). Development and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Quantification of Lysozyme in Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 76-81.
4. Thonar, E. J-M. A., Susan B. Feist, Fassbender, K., Lenz, M. E., Matijevitch, B.L., Kuettner, K.E., (1988). Quantification of hen egg white Lysozyme in cartilage by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Connect. Cell and Tissue Research*, **17**, 181-198.
5. Vidal Mary-Laure, Gautron, J., Nys, Y., (2005). Development of an ELISA for Quantifying Lysozyme in Hen Egg White. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2379-2385.