

## Lizozimul – component bioactiv al oului hiperimun PC2: caracterizare, purificare și activitate antimicrobiană

## Lysozyme – bioactive component of the hyperimmune egg PC2: characterization, purification and antimicrobial activity

Viorica Chiurciu<sup>1</sup>, Teodora Supeanu<sup>1</sup>, Ioana Alina Dimulescu<sup>1</sup>, Cristina Urducea<sup>1</sup>, Lucica Sima<sup>1</sup>,  
Victoriaș-Iulian Iordănescu<sup>1</sup>, Mariana Oporanu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

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

**Cuvinte cheie:** lizozim, purificare, cromatografie pe schimbători de ioni, Amberlite FPC 3500, *Micrococcus lysodeikticus*, determinarea lizei în placă

**Key-words:** lysozyme, purification, ion exchange chromatography, Amberlite FPC 3500, *Micrococcus lysodeikticus*, lysoplate method

### Rezumat

Lizozimul obținut din albuș de ouă hiperimune PC2, provenind de la găini imunizate cu un complex de antigene bacteriene și fungice, a fost purificat prin cromatografie de schimb ionic pe Amberlite FPC 3500. Purity lizozimului a fost analizată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS-PAGE). Pe baza modelului de migrare a marker-ului molecular s-a constatat prezența unei singure benzi cu masa moleculară de 14,1 kDa. Prin testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA) s-a evidențiat prezența lizozimului care s-a testat în diluții de la 1/2 la 1/32 comparativ cu lizozimul standard (Sigma) și cu cel obținut din ouă de la găini libere de germeni specifici (SPF) și convenționale (CV). S-a stabilit identitatea imunologică între lizozimul standard și lizozimul PC2 prin testul IDGA. Lizozimul PC2 a evidențiat reacții de aglutinare cu aspect de flocoane față de cultura de *Micrococcus lysodeikticus* și cu aspect granular față de cultura de *Staphylococcus aureus*. Activitatea antimicrobiană a lizozimului a fost intensă asupra bacteriilor Gram pozitive și mai puțin intensă asupra celor Gram negative. Concentrația lizozimului s-a pus în evidență prin testul de determinare a lizei în placă față de cultura de *Micrococcus lysodeikticus*. S-au obținut valori medii ale lizozimului purificat cuprinse între 12,5 mg/ml și 14 mg/ml. S-au determinat unitățile litice (mg/ml) în produse imunologic active care conțin lizozim (geluri, emulsii, soluții, pulberi). Valorile medii ( $\bar{x} \pm ds$ ) sunt cuprinse între 49,0 $\pm$ 0,34 și 60,5 $\pm$ 0,84. Acest studiu sugerează că lizozimul PC2 prezintă activitate imunologică având un rol important în mecanismele de apărare nespecifică a organismelor.

### Abstract

Lysozyme obtained from PC2 hyperimmune egg whites, originating from hens immunized with a complex of bacterial and fungal antigens, was purified by ion exchange chromatography on Amberlite FPC 3500 resin. The purity of lysozyme was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis in denaturing system (SDS-PAGE). Based on the migration pattern of the molecular marker, the presence of a single band with a molecular mass of 14.1 kDa was found. The agar gel immunodiffusion test (AGID) showed the presence of lysozyme which was tested in dilutions from 1/2 to 1/32 as compared to standard lysozyme (Sigma) and that obtained from eggs from chickens free of specific germs (SPF) and conventional (CV). The immunological identity between the standard lysozyme and the PC2 lysozyme was established by the AGID test. The PC2 lysozyme showed agglutination reactions with flaky clumps in the presence of *Micrococcus lysodeikticus* cultures and with granular clumps in the presence of *Staphylococcus aureus* cultures. The antimicrobial activity of lysozyme was intense against Gram-positive bacteria and less intense against Gram-negatives. The concentration of lysozyme was assessed by the lysoplate method against a *Micrococcus lysodeikticus* culture. Mean values ( $\bar{x} \pm ds$ ) of purified lysozyme were obtained, ranging between 12.5 mg/mL and 14,0 mg/mL. Lythic units (mg/mL) were determined in immunologically active products containing lysozyme (gels, emulsions, solutions, powders). The mean values ( $\bar{x} \pm ds$ ) were between 49.0 $\pm$ 0.34 and 60.5 $\pm$ 0.84. This study suggests that PC2 lysozyme exhibits an immunologic activity with an important role in the mechanisms of non-specific defence of organisms.

## Introducere

Lizozimul este o glicozid-hidrolază cu rol important în mecanismul de apărare antibacterian. Principala sa acțiune este liza polizaharidelor din peretele celular al bacteriilor prin scindarea legăturii glicozidice  $\beta$ -1,4 dintre acidul N-acetilmuramic (NAM) și N-acetilglucozamină (NAG). Din aceste motive se mai numește N-acetilmuramid glicanhidrolază sau muramidază. S-a demonstrat activitatea sa bacteriostatică, bacteriolitică și bactericidă, în special față de bacteriile Gram pozitive, printre ele fiind și un număr mare de patogeni prezenți în hrană [7]. Lizozimul din albușul de ou are proprietăți deosebite fiind considerat un bun conservant pentru alimente [5, 11]. Molecula modificată de lizozim este folosită în multe domenii, de exemplu pentru prevenirea infecțiilor, acționând ca un antibiotic natural sau ca stimulator nespecific al sistemului imun [9]. În industria farmaceutică, s-a extins folosirea lizozimului în diferite formulări (creme, picături oftalmice, geluri etc.) [5]. Albușul de ou de găină reprezintă sursa cea mai importantă de lizozim (3,5%). Lizozimul din albuș este un polipeptid cu 129 aminoacizi având o masă moleculară de 14 kDa [6]. Punctul izoelectric este cuprins între 10-11. Lizozimul a fost prima proteină secvențializată, a cărei structură tridimensională a fost complet analizată. Este o moleculă constând din două domenii legate printr-un  $\alpha$ -helix [2].

Lizozimul este prezent în secreții, toate lichidele corpului și țesuturile organismului uman și animal. De asemenea, a fost izolat din plante, bacterii și bacteriofagi fiind o enzimă foarte stabilă [8]. Reprezintă un factor cheie de apărare naturală a oului împotriva agresiunii bacteriene. Acțiunea litică a lizozimului asupra peretelui celular al culturii de *Micrococcus lysodeikticus* reprezintă una dintre metodele utilizate la evaluarea activității enzimatică [7].

Datorită folosirii enzimei în diferite domenii, studiile de purificare ale acesteia au devenit esențiale. Diferite metode precum cristalizarea și precipitarea [4], filtrarea prin membrană [6], cromatografia de afinitate [11], cromatografia pe schimbători de ioni [1] și

ultrafiltrarea [5] sunt utilizate în procesele de purificare a lizozimului.

Cercetările efectuate au avut ca scop purificarea, caracterizarea și determinarea concentrației de lizozim din albuș de ouă hiperimune PC2 și din produse imunologic active care conțin această proteină.

## 1. Materiale și metode

Studiul a fost efectuat în Departamentul de Cercetare-Dezvoltare al Romvac Company S.A.

### 1.1. Ouăle hiperimune PC2

S-au obținut după metodologia descrisă de Chiurciu și col. (2014) și provin de la găini din rasa Rhode Island Red, clinic sănătoase în vârstă de 20-23 săptămâni, imunizate cu antigene bacteriene și fungice [3,10].

### 1.2. Ouăle de la găini libere de germeni specifici (SPF) și ouă convenționale (CV)

Au fost obținute din fermele companiei.

### 1.3. Cultura de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma Aldrich)

S-a obținut pe mediu BHI îmbogățit cu 8% ser fetal. Cultura obținută s-a spălat de trei ori cu tampon fosfat pH=6,2 prin centrifugare la 3400 xg timp de 20 minute. Suspensia s-a citit la spectrofotometru SpectraMax 190 (Molecular Devices LLC) stabilindu-se densitatea optică (DO)=2,4.

### 1.4. Lizozim din albuș de ou, pulbere liofilizată (Sigma Aldrich)

S-a utilizat ca standard în experimentele efectuate.

### 1.5. Serul anti-lizozim

S-a preparat în Romvac Company S.A prin imunizarea iepurilor cu lizozim standard. S-au efectuat trei inoculări cu 5 mg/ml lizozim emulsificat în adjuvant Montanide ISA 70 (SEPPIC). Prima inoculare s-a făcut pe cale

intradermică cu 2 ml antigen administrat în 3-4 puncte pe laturile corpului.

A doua inoculare s-a efectuat la 21 zile de la prima administrare pe aceeași cale și aceeași doză similară primei inoculări. A treia s-a făcut la 14 zile după a doua administrare.

### 1.6. Separarea lizozimului din albuș de ouă hiperimune PC2 pe schimbatori de ioni

Lizozimul s-a preparat după metoda lui Abeyrathne și colab. (2014) cu anumite modificări. Purificarea s-a făcut prin cromatografie pe schimbători de cationi utilizând Amberlite FPC 3500 (Acros Organics). Albușul s-a diluat cu un volum egal de apă deionizată 1:1 calculându-se 0,5 g Amberlite (styrene-divinylbenzene total exchange capacity >2,6 mEq/g) la 10 ml albuș; amestecul s-a omogenizat timp de 12 h la 4 °C folosind un agitator magnetic (Stuart US152) cu viteză scăzută. Soluția s-a centrifugat la 3400 x g timp de 20 minute la 4 °C; Amberlite-ul s-a colectat și s-a spălat de câteva ori cu apă deionizată apoi cu tampon glicină – NaOH 0,1M, pH=9,3. Lizozimul s-a eluat cu tampon glicină – NaOH 0,1 M, pH=9,3 conținând NaCl 0,5 M. Eluatul s-a desalifiat prin ultrafiltrare pe casetă de 30 kDa (Millipore) și s-a liofilizat utilizând aparatul Zirbus Sublimator 150 DKS.

### 1.7. Testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA)

S-a efectuat în plăci Petri de 90 mm diametru, utilizând gel de agar Noble (Difco) 1% preparat în tampon borat pH = 8,6. S-au efectuat 7 godeuri, de 6 mm diametru, unul central și șase periferice. În godeul central s-au repartizat 40 μl ser anti-lizozim, iar în godeurile periferice 40 μl lizozim purificat lucrat integral și în diluții binare de la 1/2 la 1/2048. Ca martor de reacție s-a utilizat lizozim standard (20 mg/ml). Reacțiile s-au citit la 24 ore prin vizualizarea liniilor de precipitare.

### 1.8. Electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS-PAGE)

Electroforeza s-a efectuat după metoda Laemmli la un aparat OmniPAGE

Electroblotter (Cleaver Scientific Ltd.). Probele de lizozim s-au diluat la o concentrație finală de proteină de 2 mg/ml folosind tampon Laemmli cu 2-mercaptoetanol și albastru de bromfenol (Sigma Aldrich).

După incubarea probelor timp de 10 minute la 96 °C s-au adăugat câte 5 μl din fiecare probă în gelul de migrare 10% și de concentrare 4%. S-a utilizat un marker de proteine VI (AppliChem) conținând un amestec de 12 proteine cu mase moleculare de la 10 până la 245 kDa. Electroforeza s-a realizat la 90 mV și 185 mA, timp de 90 minute; colorarea s-a efectuat cu Comassie Brilliant Blue (Sigma Aldrich).

### 1.9. Reacția de aglutinare rapidă (RAR)

Testul s-a efectuat în plăci de sticlă cu 12 godeuri de 16 mm diametru și 1,5 mm adâncime (Marienfeld). Cultura de *Micrococcus lysodeikticus* s-a utilizat ca martor pozitiv de reacție. Pentru efectuarea testului s-au folosit culturi bacteriene inactivate (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*) lizozim standard ca martor pozitiv și lizozim provenit din albuș de ouă SPF ca martor negativ.

### 1.10. Metoda difuzimetrică de determinare a lizei în placă

Șase ml suspensie de *Micrococcus lysodeikticus* s-au adus la temperatura de 56 °C și s-au amestecat cu 6 ml agar Noble 2% preparat în tampon fosfat pH=6,2.

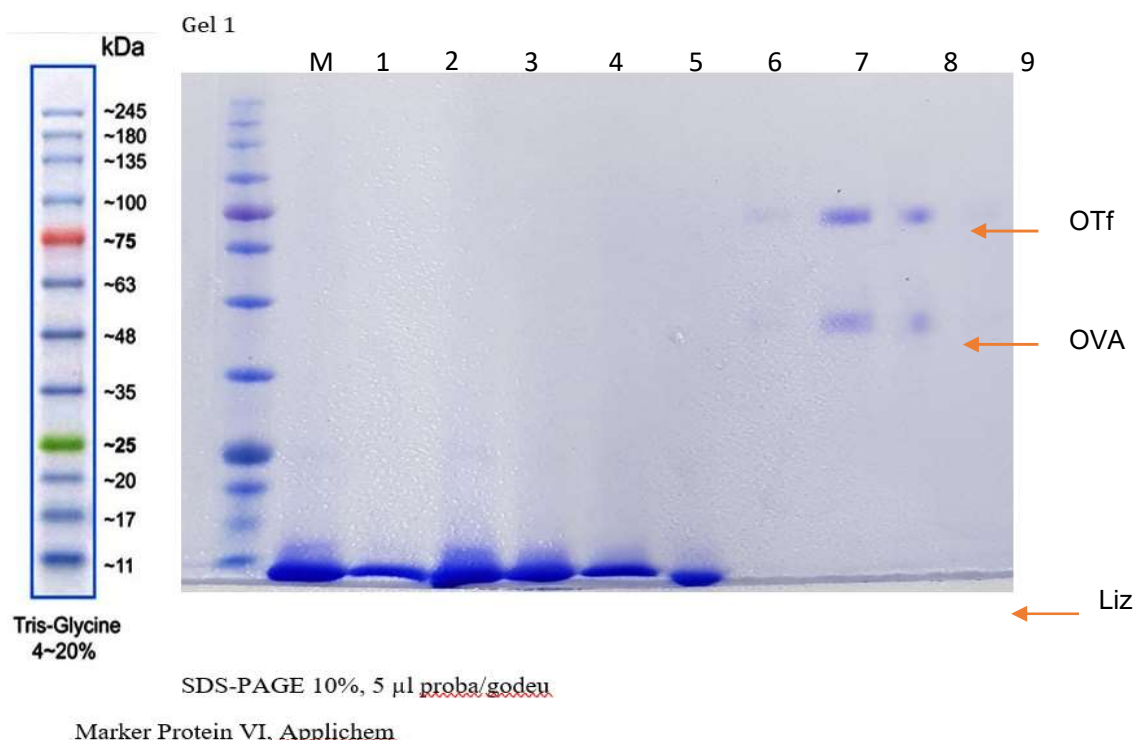
Amestecul s-a turnat în plăci Petri de 90 mm diametru și s-a lăsat la temperatura camerei pentru solidificare. În gel s-au efectuat godeuri de 5 mm diametru la distanța de 1 cm. În godeul central s-au repartizat lizozim standard iar în godeurile laterale probele de lizozim de analizat; citirea reacției s-a făcut la 24 ore. Diametrele zonelor de liză s-au citit în mm cu ajutorul unui șubler digital cu afișaj electronic (Digital Caliper).

Valorile concentrației în lizozim se interpretează pe o curbă etalon și se exprimă în mg/ml.

## 2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Purificarea lizozimului PC2 din albuș de ouă hiperimune, SPF și CV s-a realizat prin cromatografie pe schimbători de ioni, utilizând Amberlite FPC 3500. Folosind această metodă, lizozimul poate fi obținut în cantități apreciabile și cu grad de puritate ridicat. Probele analizate sunt prezentate în fig. 1.

Prin tehnica SDS-PAGE, pe baza modelului de migrare a marker-ului molecular s-a constatat prezența unei singure benzi ceea ce demonstrează puritatea lizozimului testat. Calculul maselor moleculare a evidențiat că lizozimul obținut din albuș de la găini SPF, PC2 și CV este pur și prezintă aceeași masă moleculară (14,1 kDa). Rezultatele sunt prezentate în fig. 1, tabelul 1 și fig. 2.



**Fig. 1. SDS-PAGE- Testarea purității lizozimului (Liz) obținut prin cromatografie pe schimbători ioni (Amberlite FPC 3500) din albuș de ouă PC2, CV și SPF:** M- marker proteine; 1- lizozim standard (20 mg/ml), diluția 1/20; 2- lizozim SPF (10 mg/ml), diluția 1/10; 3- lizozim PC2 seria I (10 mg/ml), diluția 1/10; 4- lizozim PC2 seria II (10 mg/ml), diluția 1/10; 5- lizozim PC2 seria III (10 mg/ml), diluția 1/10; 6- lizozim CV (10 mg/ml), diluția 1/10; 7,8,9- fracțiunile ovotransferină (OTf) și ovoalbumină (OVA) din albuș PC2 după separarea lizozimului.

**Tabelul 1.**  
**Calculul maselor moleculare (M) ale lizozimului din albuș ouă PC2, CV și SPF**

Gel 1	dp	Rf	Log M	Masa moleculară (M)	M (kDa)
1- lizozim standard 20 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
2- lizozim SPF 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
3- lizozim PC2 seria I 10 mg/ml	47	0.7460	4.404502	25381	25.38
	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
4- lizozim PC2 seria II 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
5- lizozim PC2 seria III 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
6- lizozim CV 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
7- OTf	20	0.3175	4.860866	72588	72.58
OVA	33	0.5238	4.641136	43766	43.76
8- OTf	20	0.3175	4.860866	72588	72.58
OVA	33	0.5238	4.641136	43766	43.76
9- OTf	20	0.3175	4.860866	72588	72.58
OVA	33	0.5238	4.641136	43766	43.76

După izolarea lizozimului din albuș au rămas fracțiunile majore: ovotransferina (M=72,58 kDa) și ovoalbumina (M=43,76 kDa). Acestea sunt prezente în fig. 1 și tabelul 1 (fracțiunile 7,8 și 9) și pot fi separate secvențial folosind tehnici de precipitare și tratament termic.

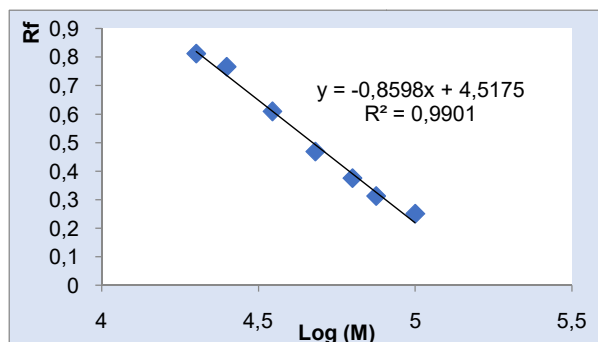


Fig. 2. Calculul maselor moleculare ale seriilor de lizozim SPF, PC2 și CV precum și a fracțiilor proteice rămase în albuș după izolarea lizozimului (OTf și OVA)

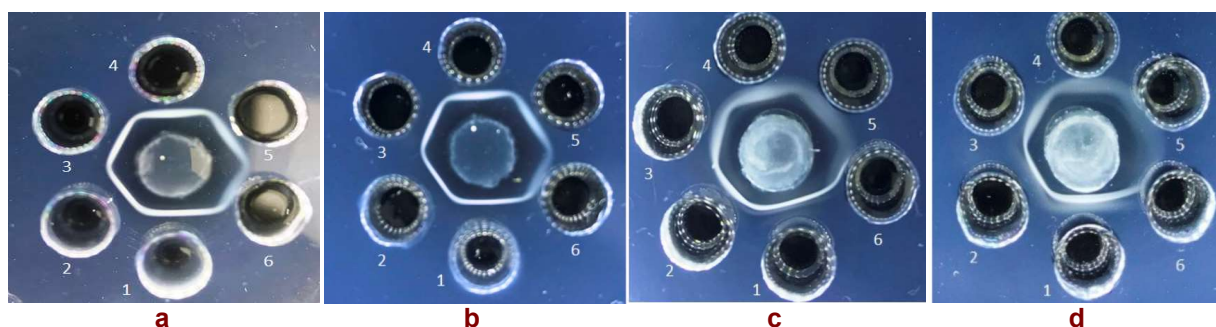


Fig. 3. Testul IDGA: (a)– lizozim standard; (b)– lizozim din albuș de ouă PC2; (c)– lizozim din albuș de ouă SPF, (d)– lizozim din albuș de ouă CV; godeul 1 – lizozim integral; godeurile 2-6 – lizozim în diluții de la 1/2 – 1/32; godeul central – ser anti-lizozim

Lizozimul PC2 s-a testat comparativ cu lizozimul standard prin testul IDGA.

Rezultatele indică identitatea dintre lizozimul standard (godeurile 3 și 5) și lizozimul PC2 (godeurile 2 și 6).

Testul s-a efectuat utilizând ser de iepure anti-lizozim. Linia de precipitare dintre cele două probe prezintă continuitate ceea ce demonstrează identitatea imunologică a acestora (fig. 4).

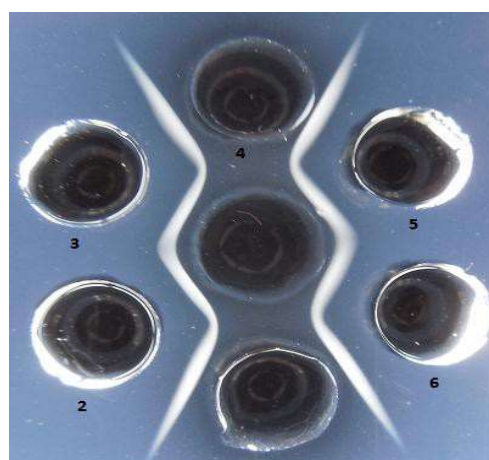
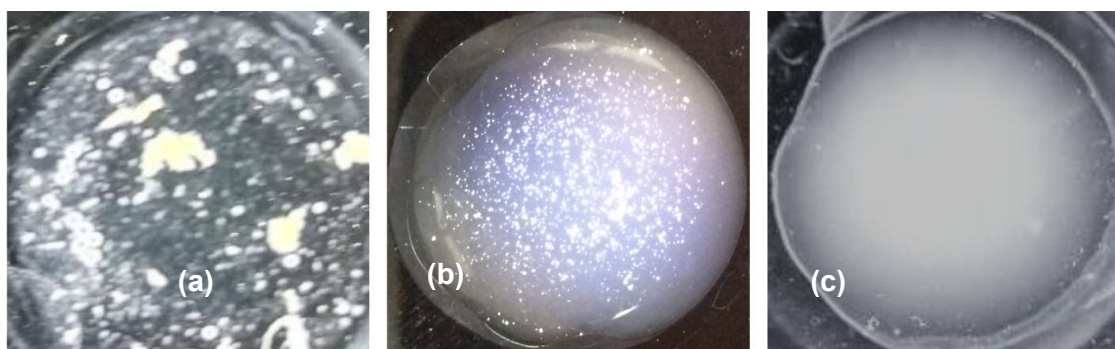


Fig. 4. Testul IDGA: stabilirea identității între lizozimul standard (godeurile 3 și 5) și lizozimul PC2 (godeurile 2 și 6); în godeurile 1,4 și central s-a repartizat ser de iepure anti-lizozim

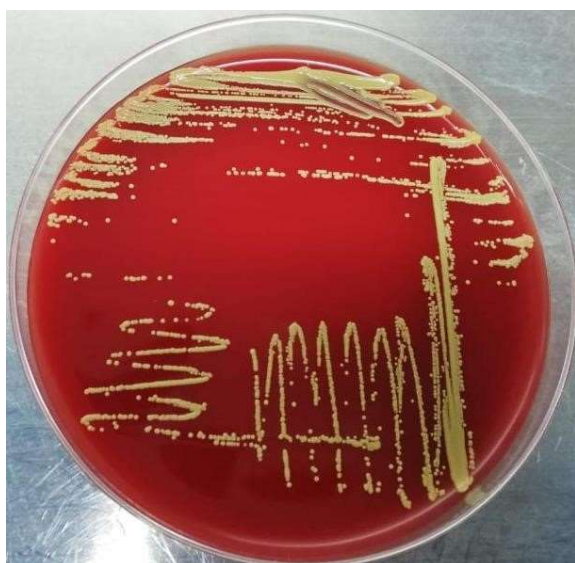
Fig. 5a evidențiază aglutinarea cu aspect de flocoane dintre lizozimul PC2 și cultura de *Micrococcus lysodeikticus*. Aglutinarea dintre lizozimul PC2 și cultura de *Staphylococcus*

*aureus* a prezentat aspect granular (fig. 5b). Martorul negativ cu aspect omogen a fost reprezentat de cultura de *Micrococcus lysodeikticus* și soluția de NaCl 0,15M (fig. 5c).



**Fig. 5. Reacția de aglutinare rapidă pe lama (RAR): (a)- lizozim PC2 și cultură de *Micrococcus lysodeikticus* (reacție pozitivă, cu aspect de flocoane); (b)- lizozim PC2 și cultură de *Staphylococcus aureus* (reacție pozitivă cu aspect granular); (c)- cultura de *Micrococcus lysodeikticus* și soluție NaCl 0,15M (reacție negativă)**

Aspectul culturii de *Micrococcus lysodeikticus* pe mediu agar cu sânge este redat în fig. 6.



**Fig. 6. Cultura de *Micrococcus lysodeikticus* de 24 ore pe mediu agar cu sânge**

Activitatea aglutinantă a lizozimului PC2 a fost evidențiată față de bacterii Gram pozitive și Gram negative. Rezultatele prezentate au demonstrat că lizozimul aglutinează bacteriile Gram pozitive iar bacteriile Gram negative sunt parțial aglutinate (tabelul 2).

Concentrația lizozimului purificat s-a facut prin metoda difuzimetrică a lizei în placă. Acțiunea litică a lizozimului asupra culturii de *Micrococcus lysodeikticus* este redată în fig. 7.

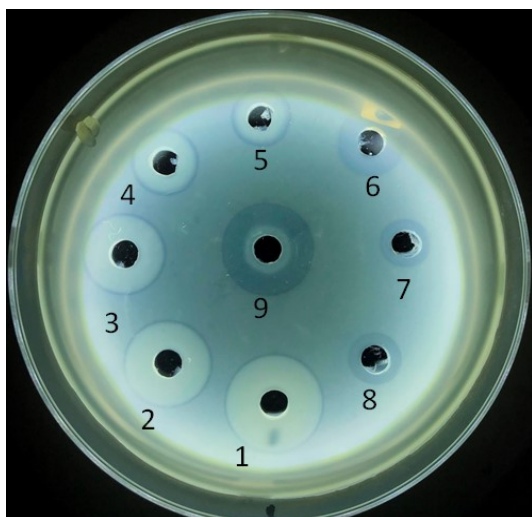
**Tabelul 2. RAR- testarea activității antimicrobiene a lizozimului PC2, CV și SPF față de bacterii Gram pozitive și Gram negative**

Specii bacteriene	Lizozim PC2	Lizozim CV	Lizozim SPF
<b>Bacterii Gram pozitive</b>			
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	+++	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	±	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	-	-
<b>Bacterii Gram negative</b>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	±	±	-

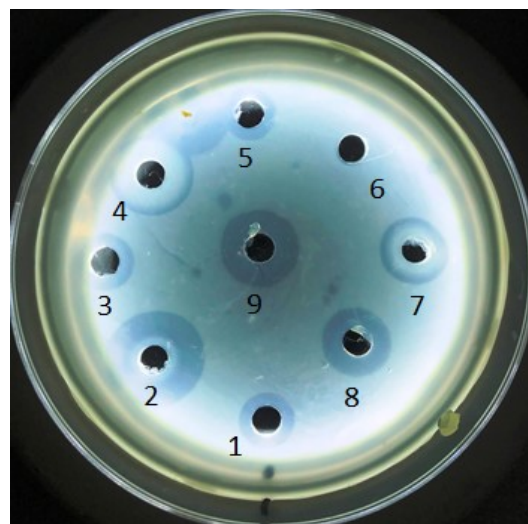
Lizozimul PC2 liofilizat s-a testat în concentrațiile de 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml și 2,5 mg/ml obținându-se valori ale lizozimului de respectiv 60,5 mg/ml, 50,5 mg/ml, 37,0 mg/ml, 25,5 mg/ml.

Lizozimul provenind din albuș de ou de la două loturi de găini CV (lot I – n = 30; lot II - n=30) a prezentat concentrații medii de 12,5 mg/ml, respectiv 14,0 mg/ml (tabelul 3).

Valorile medii ale concentrației de lizozim SPF (lot I - n=30) au fost de 4,4 mg/ml și de 4,6 mg/ml pentru lizozim SPF (lot II - n=30). Se remarcă valori ridicate ale concentrației de lizozim PC2.



**Figura 7. Dozarea lizozimului prin metoda difuzimetrică de determinare a lizei în placă**  
**Godeuri:** 1- lizozim PC2 (20 mg/ml); 2- lizozim PC2 (10 mg/ml); 3- lizozim PC2 (5 mg/ml); 4- lizozim PC2 (2,5 mg/ml); 5- lizozim CV lot I; 6- lizozim CV lot II; 7- lizozim SPF lot I; 8- lizozim SPF lot II; 9- lizozim standard 20 mg/ml.



**Fig. 8. Dozarea concentrației de lizozim PC2 din produse imunologic active prin metoda de determinare a lizei în placă / Godeuri:** 1- Emulsie cu lizozim lot I; 2- Pulbere din albuș; 3- Emulsie cu lizozim lot II; 4- Gel cu lizozim; 5- Lizozim SPF; 6- Soluție NaCl 0,15M; 7- Soluție de proteine din ouă PC2 lot 32; 8- Soluție de proteine din ouă PC2 lot 33; 9- Lizozim PC2

În fig. 8 sunt prezentate valorile medii ( $\bar{x} \pm ds$ ) ale diametrelor zonelor de liză (mm) și unitățile litice mg/ml ( $\bar{x} \pm ds$ ) ale lizozimului PC2 din unele produse imunologic active care au în compoziție numai lizozim (gel, emulsie) și proteine din ouă hiperimune PC2 (soluție, pulbere).

Diametrul zonelor de liză (valori medii) a variat în funcție de cantitatea de lizozim adăugată în formula de preparare a produsului astfel: gel cu lizozim  $\bar{x} = 16,6 \pm 0,27$  mm și  $55,5 \pm 0,31$  mg/ml unități litice; soluție de proteine din ouă hiperimune PC2  $\bar{x} = 14,5 \pm 0,34$  mm și  $50,0 \pm 0,70$  mg/ml unități litice; emulsie cu lizozim  $\bar{x} = 13,9 \pm 0,37$  mm și  $49,0 \pm 0,34$  mg/ml unități litice; pulbere din albuș  $\bar{x} = 17,7 \pm 0,54$  mm și  $60,5 \pm 0,84$  mg/ml unități litice.

**Tabel 3.**  
**Testarea concentrației de lizozim PC2 din produse imunologic active prin metoda de determinare a lizei în placă**

Preparate	n loturi	Diametrul zonei de liză (mm) $\bar{x} \pm ds$	Unități litice (mg/ml) $\bar{x} \pm ds$
Gel cu lizozim	5	16,6 $\pm$ 0,27	55,5 $\pm$ 0,31
Soluție de proteine din ouă hiperimune PC2	33	14,5 $\pm$ 0,34	50,0 $\pm$ 0,70
Emulsie cu lizozim	4	13,9 $\pm$ 0,37	49,0 $\pm$ 0,34
Pulbere din albuș	6	17,7 $\pm$ 0,54	60,5 $\pm$ 0,84

Rezultatele obținute demonstrează ca lizozimul poate fi izolat din albuș de ou, prin cromatografie pe schimbători de ioni utilizând Amberlite FPC 3500. Rezultatele prezentate sunt în acord cu date din literatură privind purificarea și caracterizarea lizozimului din albuș de găină [1, 4, 9].

Lizozimul PC2 purificat are capacitatea de a liza membrana celulară a unor bacterii Gram pozitive datorită stratului de peptidoglican (substrat pentru lizozim). Bacteriile Gram negative sunt mai puțin susceptibile la acțiunea bacteriolitică a acestei enzime deoarece au o structură mai complexă a peretelui celular [8].

Datorită proprietăților antimicrobiene ale lizozimului, acesta poate fi folosit în industria alimentară (pentru conservarea carcaselor, brânzeturilor, vinului), în industria farmaceutică (lizozimul fiind inclus în diverse preparate terapeutice) și în medicină (sub formă de aerosoli, profilactic pentru tratarea cariilor dentare, pentru protecția și repararea unor leziuni distrofice și inflamatorii ale pielii și țesuturilor moi) [5, 7].

### 3. CONCLUZII

Lizozimul reprezintă un component biologic activ al albușului de ou hiperimun PC2

ce poate fi obținut în cantități apreciabile și purificat prin tehnici cromatografice. Specificitatea lizozimului PC2 constă în faptul că reacționează cu epitopii antigenelor utilizate la imunizarea găinilor. Acesta are un rol important în apărare fiind considerat parte a sistemului imunitar.

Lizozimul scindează componentul peptoglican al peretelui celular bacterian, care pierzându-și integritatea determină moartea celulei. În plus, produsele de hidroliză sunt capabile de a spori secreția de imunoglobuline, de activare a macrofagelor și de eliminare rapidă a bacteriilor patogene.

Aceste date indică faptul că lizozimul poate fi o alternativă viabilă la antibiotice putând fi adăugat în hrana animalelor (Oliver și col., 2015). Datorită proprietăților sale, lizozimul PC2 poate fi utilizat în industria alimentară pentru prelungirea valabilității produselor, cât și în aplicații biomedicale ca preparat cu potențial imunoterapeutic.

Rezultatele acestei cercetări ar putea fi considerate de referință pentru alte studii viitoare.

#### 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. **Abeyrathne, E.D.N.S., Lee, H.Y., Ahn D.U.** (2014). Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin and ovoalbumin from egg white, *Poult. Sci.* **93** [4], 1001-1009.
2. **Al Awwaly, K. U., Manab A., Manik Eirry Sawitri, Eny Sri Widayastuti, Yuny Susanti Haniyah** (2016). Hen Egg White Lysozyme Extraction Using SiO<sub>2</sub>: Effect of pH and Mineral on Antimicrobial Activity, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **5** [3], 432-436.
3. **Chiurciu Viorica, I.V. Pătrașcu, C. Chiruciu, Georgiana Topilescu.** Specific Chicken Immunoglobulins (IgY) for Prevention and Treatment and Human Bacterial Infections. European Biotechnology Congress Lecce 2015.
4. **Gemili S., E.S., Umdu, Nilgün Yaprak, Fatma Işık Üstok, F.Y.G., Yener, Çiğdem Mecitoğlu Güçbilmez, Sacide Alsoy Altinkaya, A., Yemenicioğlu** (2007). Partial Purification of Hen Egg White Lysozyme by Ethanol Precipitation Method and Determination of the Thermal Stability of Its Lyophilized Form. *Turk J Agric For*, **31**, 125-134.
5. **Leśnierowski, G., Renata Cegielska-Radziejewska.** (2012). Potential possibilities of production, modification and practical application of lysozyme, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **11** [3], 223-230.
6. **Lu J., Y., Wan, Z., Cui** (2005). Fractionation of Lysozyme and Chicken Egg Albumin Using Ultrafiltration with 30-kDa Commercial Membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, 7610-7616.
7. **Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton, Rüdiger Schade** (2007). Bioactive Egg Compounds. Egg white compounds, Lysozyme, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
8. **Ramanauskiene Kristina, Asta Marija Inkeniene, A., Savickas, Ruta Masteikova, V., Brusokas** (2009) Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. *Acta Pol. Pharm.*, **66** (6), 681-688.
9. **Shahmohammadi A.** (2018). Lysozyme separation from chicken egg white: a review. *Eur. Food Res. Technol.*, **244** (4), 577-593.
10. **Supeanu Teodora., Mădălina Tablică, Cristina Urducea., Ioana Alina Dimulescu., Lucica Sima, Viorica Chiurciu., Mariana Oporanu, C. Chiurciu** (2019). *Hiperimmune egg: Preparation, characterization and alternative imunoterapeuthic activity.* *Vet. Drug*, **13** [1], 84-93.
11. **Susanto, E., Rosyidi, D., Lilik Eka Radiati, Manab, A.** (2014). Improved antibacterial spectrum of hen egg white lysozyme with thermal modified, *RRBS*, **8** [11], 437-442.