

Gyvininkystė *Animal Husbandry* *Животноводство*

Lizocimo įtaka technologinėms pieno savybėms

Sigita Urbienė¹,

Vytautas Avižienis²,

Jelena Šapošnikova¹

¹Lietuvos žemės ūkio universitetas,
Studentų g. 11, LT-53361 Akademija,
Kauno rajonas,
el. paštas Sigita.Urbienė@lzuu.lt

²AB „Biosintezė“, Fermentų g. 8,
LT-02241 Vilnius

Straipsnyje ištirta lizocimo įtaka technologinėms pieno savybėms. Gauta, kad lizocimas trukdo vystytis pašalinei mikroflorai bei teigiamai veikia susidariusios pieno fermentinės struktūros kokybę. Nustatyta, kad lizocimo priedas prailgina baktericidinės fazės trukmę. Fermentinės struktūros susidarymo tyrimai leido padaryti išvadą, kad bandiniuose su lizocimo priedais pieno fermentinė struktūra susidarė 12–15% greičiau negu be lizocimo. Be to, dėl didesnio lizocimo kiekio intensyviau išsiskiria išrūgos. Optinio tankio tyrimai parodė, kad gautos išrūgos iš bandinių su lizocimo priedu yra skaidresnės. Taip pat buvo ištirtas pieno rūgšties bakterijų vystymasis rauginimo metu. Gauta, kad lizocimas pieno rūgšties bakterijų vystymuisi turi labai nežymią įtaką. Jis 1–1,5 val. prailgina kazeino komplekso dispersiškumo didėjimo laiką, šiek tiek sumažina rūgštinės struktūros klampą ir rūgštingumą. Gauti rezultatai įrodo, kad dėl lizocimo priedo įtakos pieno rūgštinė struktūra susiformuoja iš smulkesnių baltyminių dalelių.

Tačiau, sprendžiant pagal gautus tyrimo rezultatus, lizocimas labai nežymiai veikia tiek rauginimo procesą, tiek susidariusios struktūros kokybę.

Raktažodžiai: lizocimas, baktericidinė fazė, fermentinė struktūra, optinis tankis, kazeino dalelės, pieno rūgšties bakterijos, rūgštinė struktūra, rūgštingumas

IVADAS

Pastaruoju metu maisto produktų kokybė ir sauga tampa vis aktualesne mokslo ir visuomenės problema. Viena vertus, tai siejasi su tuo, kad naujų metodų bei instrumentinės aparatūros sukūrimas įgalina nustatyti naujus toksiškus cheminius junginius (akrilamidas, biogeniniai aminai ir kt.) bei aptikti vis mažesnes jų koncentracijas. Kita vertus, įvairių pramonės šakų bei technologijų plėtra pastoviai didina aplinkos (oro, vandens, dirvos) taršą. Neišvengiamai tai siejasi su įvairių maisto produktų užterštumu. Taigi teršalai per maisto produktus, vandenį bei orą patenka į žmogaus organizmą, o tai sudaro didelį pavojų žmogaus sveikatai ir gyvenimo trukmei.

Sociologiniai tyrimai bei jų analizė leido padaryti išvadą, kad daugiausiai teršalų (70%) į žmogaus organizmą patenka per maistą, per orą – 20%, o per vandenį – 10% [33]. Onkologinių ligų gausėjimas taip pat siejamas su teršalais, patenkančiais į žmogaus organizmą su maistu.

Maisto produktų teršalai yra labai įvairūs. Tai mikotoksinai, nitratai, nitritai, pesticidai ir kt. Didelį pavojų kelia biogeninių aminorūgščių susidarymas žuvies bei mėsos produktuose [2, 7].

Dabar vieni labiausiai maisto produktuose paplitusių teršalų yra nitratai ir nitritai [26].

Šie teršalai į žmogaus organizmą patenka per geriamąjį vandenį ir augalinės bei gyvulinės kilmės maisto produktus. Jau žinoma, kad ir nitritai, patekę į žmogaus virškinamąjį traktą, jungiasi su aminorūgštimis (baltymų skilimo galutiniais produktais) ir sudaro nitrozoamidus ir nitrozoaminus, kurie yra kancerogeniniai junginiai. Į nitratus ir nitritus, iš pirmo žvilgsnio nepavojingus junginius, ilgą laiką nebuvo kreipiama pakankamai dėmesio. Klaidinga nuomonė susidarė dar ir dėl to, kad įvairiose šalyse, pagal naudojamas technologijas, gaminant mėsos gaminius bei fermentinius sūrius nitratinų ar nitritinių druskų buvo dedama pagal nurodytus technologinius reglamentus. Šių kancerogeninių junginių pirmtakų, nitratų ir nitritų, naudojimas turėjo ir turi tam tikros teigiamos įtakos gamybos

technologijoms. Pvz., nitratinės druskos priedas mėsos produktams suteikia pirkėjams įprastą raudoną spalvą, pikantišką skonį bei aromatą [20]. Fermentinių sūrių gamyboje pridėtos nitratinės druskos (KNO_3 , NaNO_3) apsaugo sūrius nuo išsipūtimo. Tai itin nepageidautina yda, kuri atsiranda besivystant sviesto rūgšties bakterijoms sūrių nokinimo metu [5, 15].

Nors nitrātų ir nitrītų kiekiai maisto produktuose yra reglamentuojami [11], tačiau siekiant gerinti maisto produktų kokybę, ypač didinti jų saugą, svarbu, kad šių teršalų kiekiai maisto produktuose būtų kuo mažesni.

Todėl siekiama tobulinti technologijas, kuriose nitrātų ar nitrītų priedai nebūtų naudojami.

Fermentinių sūrių gamyboje yra susidomėta natūraliu (piene esančiu) fermentu – lizocimu. Šis fermentas plačiai paplitęs tarp gyvūnų, augalų ir mikroorganizmų. Tačiau iki šiol pagrindinis lizocimo šaltinis yra vištų kiaušinio baltymas, jo kiekis sudaro 0,5% kiaušinio albumino svorio. Šio fermento priedas (apie 2,5 g/100 l pieno) gali pakeisti nitratinės druskas, nes trukdo vystytis sviesto rūgšties bakterijoms sūriams nokstant. Be to, lizocimas pasižymi unikaliomis biologinėmis ir baktericidinėmis savybėmis. Literatūroje pateikti tyrimai rodo, kad lizocimas pasireiškia priešūždegiminėmis, imunoregulatorinėmis, antitoksinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis [3, 16, 21].

Lizocimo bakteriologinis veikimas pasireiškia bakterijų, ypač gramteigiamų, ištirpinimu [10, 13, 30]. Todėl jis kaip natūralus konservantas naudojamas maisto produktų gamyboje [6]. Nustatyta, kad lizocimas neigiamai veikia tokių bakterijų, kaip *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ir kt., augimą [9, 17, 18]. Tyrimais įrodyta, kad lizocimas trukdo vystytis *Clostridium botulinum* [8, 13]. Pieno ir jo produktuose lizocimas trukdo vystytis *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ir *Clostridium tyrobutyricum* [4, 12, 19]. Ypač svarbu, kad lizocimas neigiamai veikia šių bakterijų sporų vystymąsi [1, 4, 9]. Todėl lizocimas gali būti naudojamas kaip konservantas fermentinių sūrių gamyboje [1, 23].

Tačiau, kita vertus, labai svarbu, kad lizocimas netrukdytų vystytis pieno rūgšties bakterijoms. Priešingu atveju, sūrių nokinimo metu gali nevykti normalūs, pieno rūgšties bakterijų vystymosi procesai, o galutinis rezultatas – sūryje gali susidaryti skonio, kvapo bei konsistencijos ydų.

Yra žinoma, kad lakto ir bifido bakterijos atsparios lizocimui [26], tačiau jeigu piene lizocimo yra didesni kiekiai, apie 40–80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tai jie neigiamai veikia pieno rūgšties bakterijų vystymosi procesą. Tokiu atveju, rauginimas gali pailgėti 1–3 valandomis. Todėl gaminant raugintus produktus svarbu pasirinkti tokias pienarūgščio rūgimo bakterijų kultūras, kurios atsparios lizocimo poveikiui [22, 31]. Žinant, kad lizocimas yra inaktivuojamas esant aukštesnei kaip 60°C temperatūrai [32], tai jo įtaka biotechnologinių procesų eigai neturėtų pasireikšti.

Tačiau literatūroje labai pasigendama žinių apie lizocimo įtaką technologinėms pieno savybėms bei šių

savybių pokyčių priklausomybei nuo lizocimo kiekio piene. Lietuvoje pridėto į pieną lizocimo įtaka jo technologinėms savybėms nėra tirta. Todėl, kol kas, lizocimas nėra naudojamas vietoje nitratinėms druskų fermentinių sūrių gamyboje, nors jo priedas labai pagerintų sūrių kokybę.

Šio darbo tikslas buvo ištirti pridėto lizocimo įtaką technologinėms pieno savybėms, kurios yra svarbios fermentinių sūrių bei raugintų produktų gamyboje. Buvo svarbu nustatyti, kaip pakinta pieno savybės, kaip lizocimas veikia fermentinės ir rūgštinės struktūrų susidarymo procesus bei jų savybes.

TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

Tyrimams buvo naudojamas šviežias pienas, gautas iš Lietuvos žemės ūkio universiteto (LŽŪU) bandomojo ūkio karvių fermos. Kiaušinio baltymo lizocimas (EC 3.2.1.17) – „Delvozyme G“, granuliuotas lizocimo chloridas, apie 95% švarumo, gautas iš Novo-Nordish (Danija). Lizociminis aktyvumas 20000 Shugar vienetų / mg preparato (lizocimo aktyvumo vienetu laikomas *Micrococcus lysodeikticus* substrato suspensijos optinio tankio (ΔA) sumažėjimas 0,001 per minutę esant pH 6,24 ir temperatūrai 25°C. Matavimas atliekamas esant bangos ilgiui 450 nm su kiuvete, kurios plotis 1 cm.

Technologinės pieno savybės buvo nustatomos tiriant fermentinės bei rūgštinės struktūrų susiformavimą bei jų savybes. Tam tikslui buvo naudojamas mikrobinės kilmės (*Rhizomucor miehei*) fermentas Fromazė bei raugas ABT-2, susidedantis iš *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* ir *Bifidobacteria* kultūrų.

Į pieną buvo dedami skirtingi lizocimo kiekiai: 0,02; 0,03 ir 0,04 g/l. Siekiant apibūdinti lizocimo įtaką pieno savybėms buvo tiriamas pieno rūgšties kiekis [24]; fermentinis rūgimo bandinys ir rūgimo bandinys [24]; fermentinės bei rūgštinės struktūros susiformavimo laikas; sinerezės procesas; rūgštinės struktūros klampumas; pieno baltymų stabilumas etilo alkoholiui – titruojant 2 ml pieno su 95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Kazeino dalelių vidutinio dydžio nustatymas buvo atliekamas šviesos išbarstymo metodu Helios Epsilon spektrofotometru [28].

Rūgštinės struktūros klampa buvo nustatoma VNKMI (Sajunginis pieno tyrimo institutas) prietaisu, kuriuo išmatuojamas ištekėjimo greitis (s) iš talpos, kurios tūris 250 ml.

Kiekvieno rodiklio analizės kartotinumai 3–5.

Tyrimų rezultatams apdoroti panaudota regresinė analizė.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Pirmoje bandymų dalyje buvo nustatyta lizocimo įtaka pieno savybėms. Technologinių pieno savybių pokyčiai pirmaisiai buvo įvertinti analizuojant rūgimo bei fermentinius rūgimo bandinius. Šių tyrimų rezultatai (lentelė) apibūdina pieno tinkamumą fermentinių sūrių gamybai.

Lentelė. Rūgimo ir fermentinių rūgimo bandinių kokybės charakteristikos

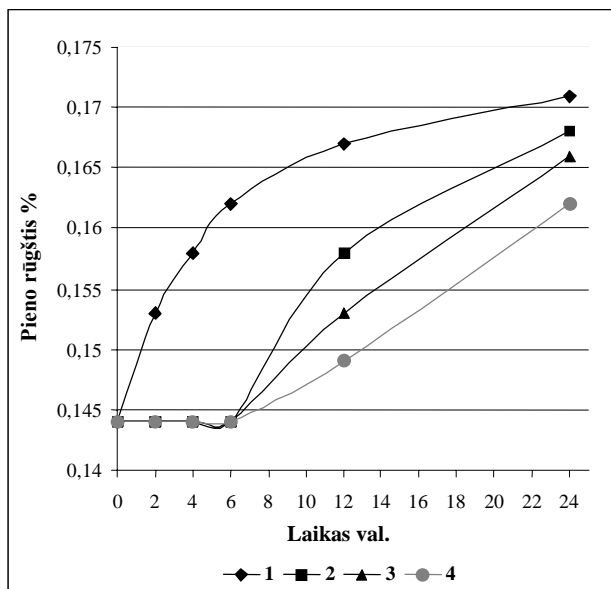
Bandiniai su lizocimo priedu g/l	Struktūros kokybės charakteristika	
	Rūgimo bandinys	Fermentinis rūgimo bandinys
Kontrolinis	III klasė. Susidariusi struktūra bloga. Struktūra su dujų burbuliukais, nėra vientisumo, išrūgos balkšvos	III klasė. Susidariusi struktūra bloga. Struktūra minkšta, sutrūkinėjusi.
0,02	II klasė. Struktūra patenkinama, joje matomos juostelės bei tuštumos.	I klasė. Struktūra gera, lygiu paviršiumi, standi.
0,03	I klasė. Struktūra gera, vienalytė be išrūgų ir dujų burbuliukų.	I klasė. Struktūra gera, standi, išilginiame pjūvyje be akučių.
0,04	I klasė. Struktūra gera, vienalytė be išrūgų ir dujų burbuliukų.	I klasė. Struktūra gera, standi, išilginiame pjūvyje be akučių.

Tyrimų rezultatai parodė, kad lizocimo priedas turi ženkliai įtaką rūgimo bandiniams. Jeigu kontrolinių bandinių be lizocimo priedu susidariusi struktūra buvo įvertinama kaip bloga ir priskiriama III klasei, tai didėjant lizocimo priedui struktūros kokybė gerėjo. Pridėjus 0,02 g/l struktūra buvo II klasės, o su 0,03 ir 0,04 g/l lizocimo jau susidarė gera I klasės struktūra. Tai rodo, kad lizocimas trukdė vystytis pašalinei mikroflorai, neigiamai veikiančiai struktūros susiformavimą ir tyrimo vertinimą.

Fermentinio rūgimo bandinių tyrimai buvo panašūs. Kontrolinių bandinių (be lizocimo priedo) susiformavusios struktūros buvo priskirtos tik III klasei.

Tuo tarpu dėl lizocimo priedo įtakos susidariusios struktūros buvo I klasės. Susiformavę sūreliai standūs, lygiu paviršiumi, neišakiję.

Fermentinis rūgimo bandinys rodo pieno kokybės įtaką fermentinės struktūros susidarymui bei preliminariai ją apibūdina. Taigi jau šie tyrimų rezultatai (lentelė)



1 pav. Lizocimo priedo įtaka pieno rūgštingumui, laikant pienu 18±1°C temperatūroje.

1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

rodo, kad lizocimo priedas teigiamai veikia fermentinės struktūros kokybę.

Pirmoje dalyje taip pat buvo nustatyta lizocimo priedo įtaka pieno baktericidinės fazės trukmei. Pieno bandiniai be lizocimo ir su įvairiais jo priedais buvo laikomi 18±1°C temperatūroje. Baktericidinės fazės trukmė buvo įvertinta nustatant pieno rūgštingumo kitimo pradžią.

Gautų rezultatų (1 pav.) analizė rodo, kad piene su lizocimo priedais rūgštingumo kitimas ir pieno rūgšties bakterijų vystymasis buvo pristabdytas. Bandomuosiuose bandiniuose po lizocimo įdėjimo rūgštingumo kitimas nustatytas tik po 6 val. laikymo, tuo tarpu kontroliniame bandinyje rūgštingumas kito ir pieno rūgštis susidarė nuo pat laikymo pradžios. Taigi lizocimas turi ženkliai įtaką baktericidinės fazės trukmei.

Be to, pieno rūgštingumas bandiniuose su įvairiais lizocimo kiekiais kilo lėčiau negu kontroliniame bandinyje. Rūgštingumo kilimo intensyvumas priklausė nuo lizocimo koncentracijos. Bandiniuose, kuriuose lizocimo buvo daugiau, rūgštingumo kitimo intensyvumas mažėjo.

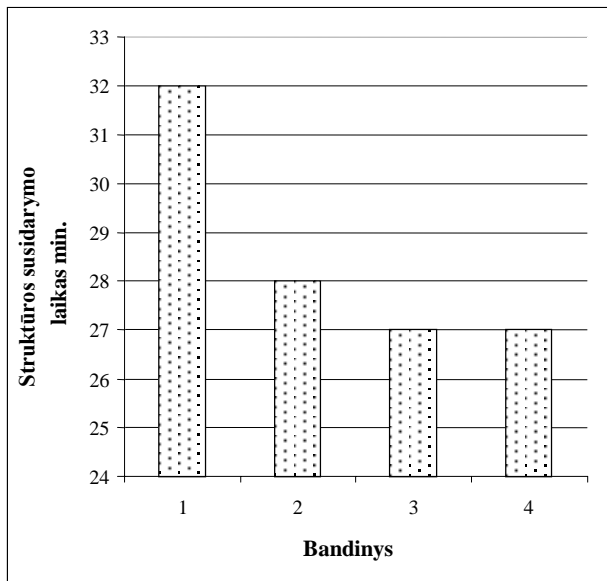
Antra tyrimų dalis buvo paskirta fermentinės struktūros susidarymo bei jos savybių tyrimui.

Pirmiausiai buvo ištirta lizocimo priedo įtaka fermentinės struktūros susidarymo trukmei. Fermentinės struktūros formavimasis buvo tiriama termostatuojant bandinius 32±1°C temperatūroje.

Gauti tyrimų rezultatai (2 pav.) įgalino padaryti išvadą, kad bandiniuose su lizocimu fermentinė struktūra susidarė 12–15% sparčiau, lyginant su kontroliniu bandiniu.

Tai galima paaiškinti atkreipiant dėmesį į fermentinės struktūros susidarymo esmę. Fermentinė struktūra formuojasi skylant α -kazeinui į dvi dalis: para- α -kazeiną ir hidrofilinėmis savybėmis pasireiškiantį glikomakropeptidą. Struktūros formavimosi greitis priklauso nuo α -kazeino skilimo greičio [31]. Matomai lizocimo preparatas šiek tiek veikia α -kazeiną. Tačiau pats lizocimas arba β -N-acetilmuramidazė baltymų peptidino ryšio neskaldo. Jis katalizuoja peptidoglikane β -1,4-glikaninių ryšių tarp N-acetilmuraminės rūgšties ir N-acetilgliukozamino liekanų hidrolizę. Todėl

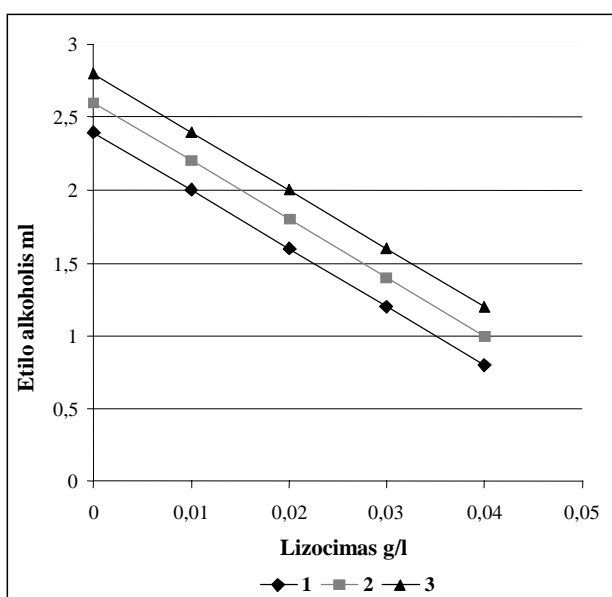
preparato sudėtyje galėjo išlikti peptidazių, kaip lydinčių fermentų, pėdsakų [32], kurie veikia baltymus ir sutrumpina fermentinės struktūros susidarymo laiką. Literatūroje taip pat nepavyko aptikti duomenų apie lizocimo įtaką baltymų stabilumui.



2 pav. Fermentinės struktūros susidarymo laikas min. 1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

Nustatytas baltymų stabilumo sumažėjimas taip pat siejasi su fermentinės struktūros susidarymo trumpesniu laiku.

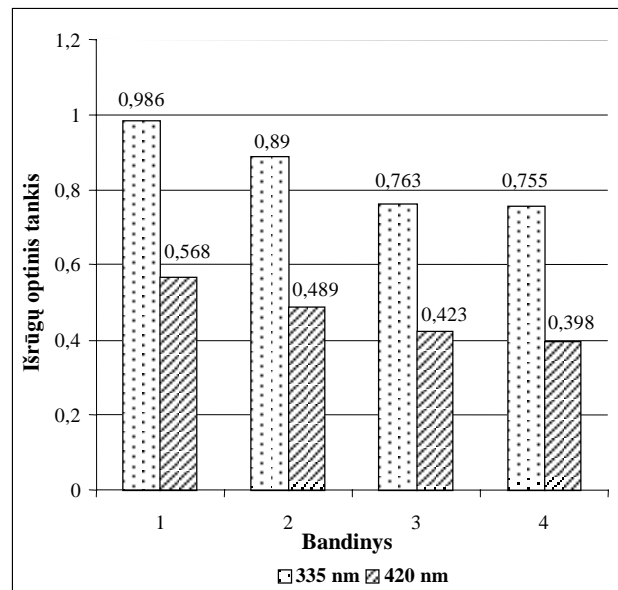
Nustatant lizocimo įtaką baltymų stabilumui iš gautų rezultatų (3 pav.) matyti, kad didėjant lizocimo kiekiui bandiniuose, baltymų stabilumas mažėja.



3 pav. Lizocimo kiekio įtaka baltymų stabilumui. 1, 2, 3 – bandiniai laikyti 28, 32 ir 36°C temperatūrose

Literatūroje nepavyko aptikti duomenų apie lizocimo įtaką baltymų stabilumui. Galima manyti, kad lizocimas veikia baltymų – kazeino daleles panašiai kaip kiti fermentai (šliužo fermentas, fromazė, pepsinas) ir šiek tiek skaldo α -kazeiną. Jeigu taip, tai atskilęs glikomakropeptidas sumažina kazeino stabilumą.

Siekiant išsamiau apibūdinti lizocimo įtaką fermentinės struktūros kokybei buvo atlikti išrūgų tyrimai. Jų metu buvo tirtas išrūgų optinis tankis (4 pav.), esant 335 ir 420 nm ilgio bangoms.



4 pav. Fermentinės struktūros išrūgų optinis tankis. 1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

4 paveiksle matyti, kad optinis tankis bandiniuose su lizocimu buvo šiek tiek mažesnis, lyginant su kontroliniu bandiniu. Ši tendencija tokia pati esant abiejų ilgių bangoms. Optinio tankio mažesnis dydis leidžia manyti, kad bandinių su lizocimu išrūgos yra skaidresnės, jose mažiau baltyminių dalelių bei kitų tirpių medžiagų. Tai rodo, kad daugiau tirpių medžiagų lieka fermentinėje struktūroje. Kuo daugiau lieka baltyminių dalelių bei kitų tirpių medžiagų fermentinėje struktūroje, tuo galutinis produktas yra didesnės biologinės vertės. Be to, tai teigiamai veikia ir išeigą gaminant fermentinius sūrius.

Fermentinės struktūros kokybei nuodugniau įvertinti buvo ištirtas sinerezės procesas. Tyrimų rezultatai (5 pav.) parodė, kad bandiniuose su lizocimu išrūgos išsiskyrė greičiau negu kontroliniame bandinyje.

Be to, išrūgų išsiskyrimo greitis priklausė nuo pridėto lizocimo kiekio. Dėl didesnio lizocimo kiekio intensyviau išsiskyrė išrūgos.

Matematinis statistinis rezultatų apdorojimas įgalino sinerezės procesą apibūdinti lygtimis. Nustatyta, kad sinerezės procesas, t. y. išrūgų išsiskyrimas (q)

priklausomai nuo laiko (t), vyksta pagal tokias priklausomybes:

- 1) kontrolinis bandinys be lizocimo;
 $q_1 = -0,0006 \cdot t^2 + 0,1695 \cdot t + 0,5604, R^2 = 0,9950;$
- 2) kai lizocimo priedas yra 0,02 g/l,
 $q_2 = -0,001 \cdot t^2 + 0,2469 \cdot t + 1,3626, R^2 = 0,9862;$
- 3) kai lizocimo priedas yra 0,03 g/l,
 $q_3 = -0,0016 \cdot t^2 + 0,3500 \cdot t + 2,1593, R^2 = 0,9798;$
- 4) kai lizocimo priedas yra 0,04 g/l,
 $q_4 = -0,0018 \cdot t^2 + 0,3755 \cdot t + 3,0824, R^2 = 0,9613.$

Išrūgų išsiskyrimo greitis v_1 kontroliniame (be lizocimo) ir bandomuosiuose bandiniuose bet kuriuo laiko momentu surandamas pagal lygtis:

$$v_1 = \frac{dq_1}{dt} = -0,0012 \cdot t + 0,1695;$$

$$v_2 = \frac{dq_2}{dt} = -0,0020 \cdot t + 0,2469;$$

$$v_3 = \frac{dq_3}{dt} = -0,0032 \cdot t + 0,3500;$$

$$v_4 = \frac{dq_4}{dt} = -0,0036 \cdot t + 0,3755.$$

Pasinaudojus gautomis lygtimis galima apskaičiuoti išrūgų išsiskyrimo greitį po bet kurio laiko (t). Išsiskyrimo greitį prilyginę 0, galėsime surasti proceso trukmes ($\tau_1; \tau_2; \tau_3; \tau_4$).

$$\tau_1 = -0,0012 \cdot t + 0,1695 = 0;$$

$$\tau_2 = -0,0020 \cdot t + 0,2469 = 0;$$

$$\tau_3 = -0,0032 \cdot t + 0,3500 = 0;$$

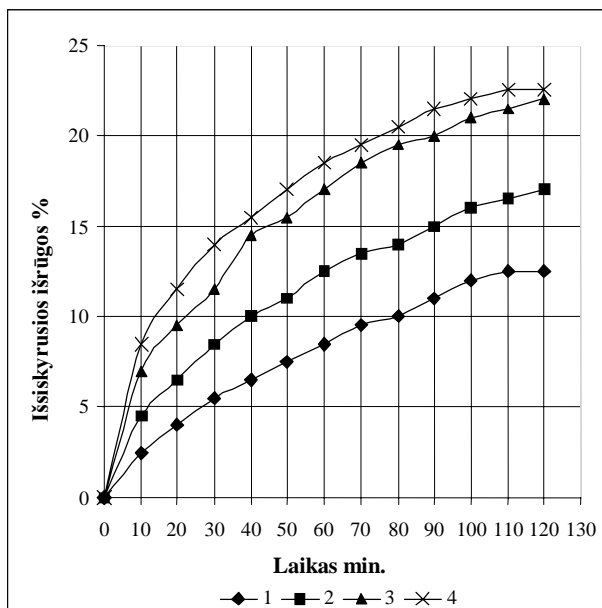
$$\tau_4 = -0,0036 \cdot t + 0,3755 = 0.$$

Gauname, kad sinerezės procesas pasibaigs kontroliniame bandinyje po $\tau_1 = 141,25$ min; kai lizocimo kiekis 0,02 g/l – po $\tau_2 = 123,45$ min; kai lizocimo kiekis 0,03 g/l – po $\tau_3 = 109,37$ min ir esant didžiausiam lizocimo kiekiui – po $\tau_4 = 104,31$ min.

Atlikta matematinė analizė parodė, kad lizocimo priedai turi įtakos sinerezės proceso trukmei. Gauta, kad kuo didesnis lizocimo kiekis, tuo sinerezės procesas yra trumpesnis.

Taigi gauti tyrimų rezultatai rodo, kad lizocimo priedas sumažina kai kurių technologinių procesų (struktūros susidarymo ir sinerezės) trukmę, kurie yra gana svarbūs fermentinių sūrų gamybos metu.

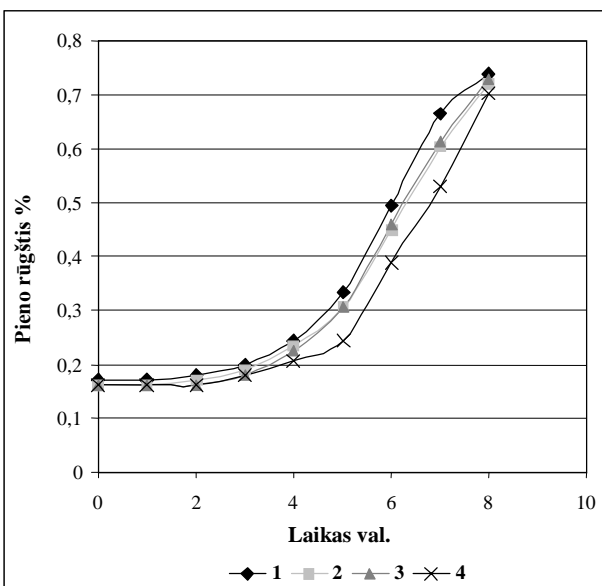
Literatūroje [26] teigiama, kad lizocimo priedas ne trukdo vystytis pieno rūgšties bakterijoms. Šis teiginys yra itin svarbus fermentinių sūrų gamyboje, nes nesivystant ar silpnai vystantis pieno rūgšties bakterijoms sūrų nokinimo metu gali susidaryti sūrų ydos. Sie-



5 pav. Fermentinės struktūros sinerezės procesas. 1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

kiant išsamiau nustatyti lizocimo įtaką pieno rūgšties bakterijų vystymuisi, buvo skirta trečioji tyrimų dalis. Šioje dalyje buvo ištirtas pieno rūgšties bakterijų vystymasis rauginimo proceso metu.

Tuo tikslu bandiniai su lizocimu buvo rauginami $31 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūroje pridėdant 5% raugo. Rauginimo metu buvo stebimas rūgštingumo kitimas, kuris tiesiogiai susijęs su pieno rūgšties bakterijų vystymosi intensyvumu. Taip pat buvo stebimas rūgštinės struktūros formavimosi procesas, kurį apibūdino kazeino dalelių vidutinio dydžio kitimas.



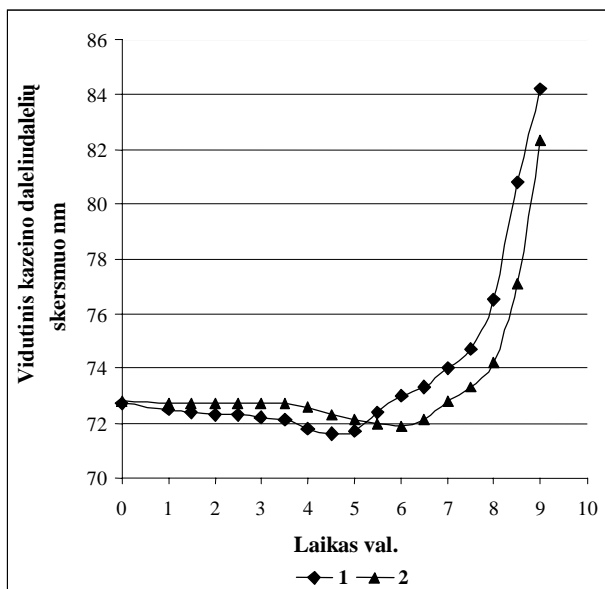
6 pav. Pieno rūgšties kiekio kitimas rauginimo proceso metu. 1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

6 paveiksle kreivės rodo pieno rūgšties susidarymo intensyvumą, netiesiogiai pieno rūgšties bakterijų vystymąsi. Gauti rezultatai rodo, kad lizocimas pieno rūgšties bakterijų vystymuisi turi nedidelę reikšmę. Esant bandiniuose 0,02–0,03 g/l lizocimo, pieno rūgšties susidarymas praktiškai mažai skiriasi nuo kontrolinio bandinio (be lizocimo). Bandinyje, kuriame lizocimo kiekis buvo didžiausias (0,04 g/l), nustatytas lėtesnis pieno rūgšties susidarymas, taigi ir šiek tiek mažiau intensyvus pieno rūgšties bakterijų vystymasis.

Proceso pabaigoje (po 8 val.) susidariusios pieno rūgšties kiekis visuose tirtuose bandiniuose buvo panašus. Kad lizocimo priedai turi nežymią įtaką, rodo ir gautos pieno rūgšties kitimo kreivės – visų bandinių kreivės yra panašios ir priklauso tai pačiai kreivių grupei.

Vidutinio kazeino dalelių dydžio (dispersiškumo) kitimas rauginimo proceso metu pavaizduotas 7 pav. Iš ankstyvesnių darbų [33] žinoma, kad kazeino komplekso kitimą rauginimo proceso metu galima suskirstyti į dvi stadijas. Rauginimo proceso pradžioje per pirmąsias 4–4,5 val. kazeino dalelės sumažėja ir padidėja kazeino komplekso dispersiškumas. Toliau vykstant rauginimo procesui, didėjant rūgštingumui prasideda kazeino kompleksų susidarymas, erdvinės struktūros formavimasis, kurį atspindi kazeino dalelių dydžio kitimas, jų didėjimas.

Pridėtas lizocimo kiekis proceso kitimo charakteristikos nepakeičia. Tačiau matyti (7 pav.), kad lizocimo priedas 1–1,5 val. prailgina kazeino komplekso dispersiškumo didėjimo laiką. Iš gautų rezultatų galima spręsti, kad formuojantis erdvinei rūgštinei struktūrai dalyvauja smulkesni kazeino kompleksai.



7 pav. Vidutinio kazeino dalelių dydžio kitimas rauginimo metu.

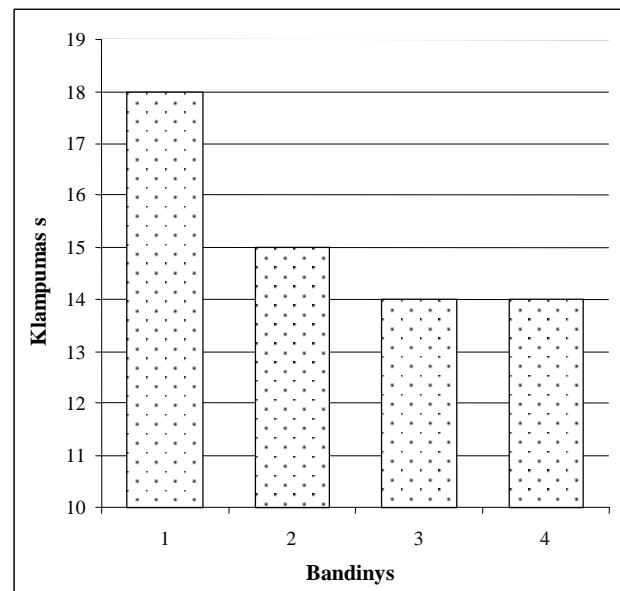
1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

Literatūroje [28] taip pat užsimenama, kad lizocimas įgalina susidaryti smulkiadispersinei baltyminei struktūrai,

tačiau neaptikta, kad šis teiginys būtų pagrįstas tyrimų rezultatais. Baltyminę struktūrą sudarančių elementų dispersiją mūsų tyrimo sąlygomis galima apibūdinti klampos nustatymu.

Todėl tam tikra serija bandymų buvo skirta nustatyti rūgštinės struktūros klampai. Visi bandiniai buvo tiriami po surauginimo ir identiško susidariusios struktūros suardymo. Klampa buvo išreikšta suardytos struktūros ištekėjimo greičiu (s). 8 paveiksle matyti, kad kontroliniai bandiniai pasižymėjo didesne klampa, lyginant su tiriamaisiais bandiniais su lizocimo priedu. Matyti, kad didėjant lizocimo pridėtam kiekiui, rūgštinės struktūros klampa turi tendenciją mažėti, tačiau šie skirtumai nėra itin ryškūs.

Gauti rezultatai parodo, kad lizocimo priedas įgalina susidaryti rūgštinei struktūrai, susiformavusiai iš smulkesnių baltyminių struktūrų.



8 pav. Rūgštinės struktūros klampumas.

1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l lizocimo

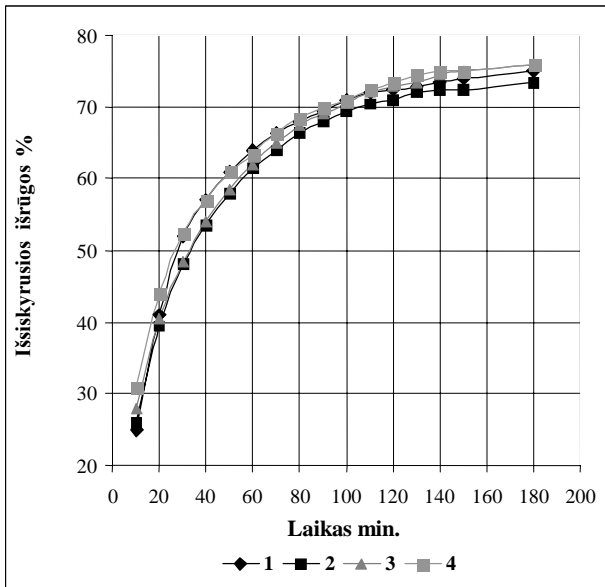
Rauginimo proceso pabaigoje tirtų bandinių rūgštingumas (pagal pieno rūgštį %) skyrėsi. Kontrolinių bandinių rūgštingumas buvo nuo 0,905 iki 0,912%, pridėjus 0,02; 0,03 ir 0,04 g/l lizocimo, rūgštingumai buvo mažesni atitinkamai 0,88–0,89%; 0,87–0,88% ir 0,865–0,87%. Visų bandinių skonis ir aromatas buvo panašūs. Bandinių su didžiausiu (0,04 g/l) lizocimo kiekiu skonis ir aromatas buvo švelnesnis, lyginant su kontroliniu bandiniu.

Kita tyrimų serija, skirta rūgštinės struktūros kokybei nustatyti, buvo sinerezės procesų analizė. Iš 9 pav. pavaizduotų kreivių matyti, kad visuose bandiniuose sinerezės procesas vyko labai panašiai. Aproximavus gautus rezultatus, kreivės itin panašios.

Išrūgų išsiskyrimas q (%) priklausomai nuo laiko t (min.) kinta pagal šias priklausomybes:

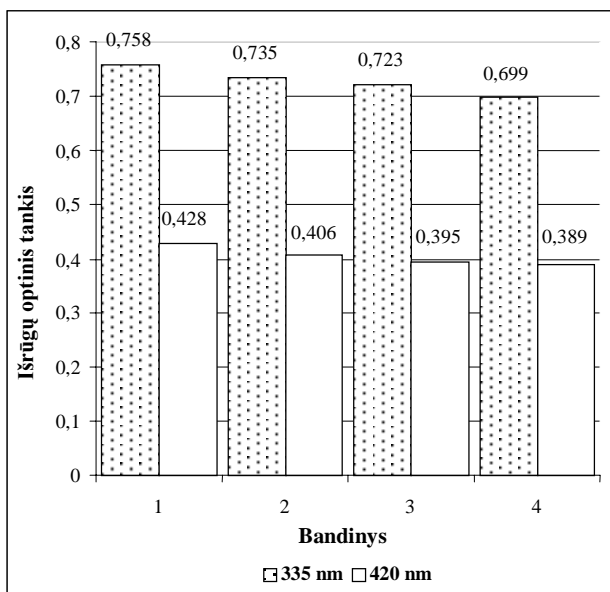
1. $q_1 = -0,0027 t^2 + 0,7141 t + 27,918$, $R^2 = 0,9218$;
2. $q_2 = -0,0025 t^2 + 0,6968 t + 26,418$, $R^2 = 0,9561$;
3. $q_3 = -0,0024 t^2 + 0,6816 t + 27,693$, $R^2 = 0,9668$;
4. $q_4 = -0,0023 t^2 + 0,6339 t + 31,990$, $R^2 = 0,9535$.

Susidariusios struktūros kokybę iš dalies gali būti apibūdinta išrūgų tyrimais, pirmiausia juose likusių baltyminių dalelių kiekiu. Netiesiogiai likusių baltymų



9 pav. Rūgštinės struktūros sinerezės procesas.

1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l ko lizocimo



10 pav. Rūgštinės struktūros išrūgų optinis tankis.

1 – kontrolinis bandinys; 2 – bandinys su 0,02 g/l lizocimo; 3 – bandinys su 0,03 g/l lizocimo; 4 – bandinys su 0,04 g/l ko lizocimo

kiekis gali būti apibūdinamas palyginant išrūgų optinius tankius. Šių tyrimų rezultatai matyti 10 pav.

Atlikti optinio tankio matavimai esant 335 ir 420 nm ilgių bangoms kontroliniuose bandiniuose ir bandiniuose su lizocimu skyrėsi labai nežymiai. Optiniai tankiai bandiniuose su lizocimu buvo šiek tiek mažesni, lyginant su kontroliniu bandiniu. Šie tyrimų rezultatai rodo, kad lizocimo priedai nepadidina baltyminių dalelių kiekio išrūgose. Taigi lizocimas labai nežymiai veikia tiek rauginimo procesą, tiek susidariusios struktūros kokybę.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad lizocimo priedas turi įtakos žaliao pieno savybėms:

a) trukdo vystytis pieno rūgšties bakterijoms laikant pieną $18 \pm 1^\circ\text{C}$ temperatūroje, tokiu būdu sustiprina baktericidinės fazės veikimą, prailgina jos veikimo laiką;

b) pagerina rūgimo bei fermentinių rūgimo bandinių kokybę, dalyvaujant lizocimui susiformuoja I klasės rūgštinės ir fermentinės struktūros;

c) sumažina baltymų stabilumą.

2. Nustatyta, kad lizocimo priedai 12–15% pagreitina fermentinės struktūros susidarymo trukmę bei sinerezės procesą.

3. Gauta, kad lizocimo priedas praktiškai neturi įtakos pieno rūgšties bakterijų vystymuisi. Ištyrus rauginimo procesą bei rūgštinės struktūros savybes gauta, kad lizocimas nepadidina baltyminių dalelių kiekio išrūgose, nepablogina susidariusios struktūros kokybės.

Gauta 2006 02 20

Literatūra

1. Bachman H. P. Butyric acid fermentation in cheese: a literature review. *AgrarForschung*. 1995. 2, 11/12. P. 523–526.
2. Baltušnikienė A., Šalaševičienė A., Garmienė G. Bendrųjų lakiųjų azoto bazių ir trimetilamino koncentracijų tyrimai žuvyse // *Maisto chemija ir technologija*. 2004. T. 38. Nr. 1. P. 9–14.
3. Dick W. Klinische Bedeutung des Lysozims in Säuglinge und Kleinkinderalter Therapiewoche. 1981. Bd. 31. N 11. P. 1740–1745.
4. Fuglsang C. C., Johansen C., Christgau S., Adler Nissen J. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry // *Trends in Food Science and Technology*. 1995. N 6(12). P. 390–396.
5. Glaeser H. Use nitrate in cheese production *Dairy Industry*. 1989. N 64(11). P. 19–23.
6. Holzapfel W. H., Geisen R., Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes // *International Journal of Food Microbiology*. 1995. Vol. 24. N 3. P. 343–362.
7. Jasutienė J., Garmienė G., Kulikauskienė M. Aflatoksino M_1 stabilumas jogurto gamybos metu: nustatymas

- imunoafininės ir skysčių chromatografijos metodu // Maisto chemija ir technologija. 2003. T. 37. Nr. 3. P. 34–40.
8. Johnson E. A., Dell' Acqua E. Composition active against botulism. United States Patent. US 5393545. 1995.
 9. Labbe R. G., Chang C. A. Recovery of heat injured spores of *Clostridium perfringens* types B, C and D by lysozyme and an initiation protein // Letters in Applied Microbiology. 1995. N 21(5). P. 302–306.
 10. Lesniewski G., Kijowski J. Lysozyme activity and use as a food preservative. *Przemysł Spożywczy*. 1995. Vol. 49. N 4. P. 116–119.
 11. Lietuvos higienos norma HN 53 – 2003. Leidžiami vartoti maisto priedai.
 12. Payne K. D., Oliver S. P., Davidson P. M. Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria // *Journal of Food Protection*. 1994. N 57(1). P. 62–65.
 13. Peck M. W., Fernandez P. S. Effect of lysozyme concentration, heating at 90 degree, and then incubation at chilled temperatures on growth from spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* // *Letters in Applied Microbiology*. 1995. N 21(1). P. 50–54.
 14. Pellegrini A. et al. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character // *Journal of Applied Bacteriology*. 1992. N 72. P. 180–187.
 15. Pluta A. et al. The influence of nitrates addition to milk on chosen properties of cheese // *Acta Alimentaria Polonica*. 1989. Vol. 15(1). P. 35–44.
 16. Pollock I. I. et al. *In vitro* and *in vivo* Studies of cellular lysis of oral bacteria by a lysozyme – protease – inorganic monovalent anion antibacterial system // *Journal of Infections Immunology*. 1984. Vol. 46. N 3. P. 876–878.
 17. San Lang Wang, Chi Sun Pai, Sun Tung Shieh. Production of lytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 // *Proceedings of the National Science Council, Republic of China, Part B: Life Sciences*. 1995. N 19(4). P. 216–224.
 18. San Lang Wang, Sun Tung Shieh, Chyi Sheng Pai. Production, purification and characterization of two proteinaceous hen-egg-white lysozyme inhibitors from *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 // *Proceedings of the National Science Council, Republic of China, Part B: Life Sciences*. 1995. N 19(3). P. 166–175.
 19. Scherer S. Biological control of pathogens in foods: option or fiction? // *DMZ Lebens-mittelindustrie und Milchwissenschaft*. 1995. N 116(10). P. 432–439, 442.
 20. Sibel E., Hotchkiss J. Nitrite effects on formation of volatile oxidation products from triolein // *Journal of Food Science*. 1995. Vol. 60. N 5. P. 945–948.
 21. Stelzner A. et al. Lysozym. 2. Mitteilung: Biologische Funktion. *Deutsche Gesundheits – Wesen*. 1982. Bd. 87. N 48. S. 2033–2038.
 22. Swaisgood H. E. Characteristics of Milk // *Fennema O. K. Food Chemistry*. New York, 1996. 1064 p.
 23. Toppino P. M., Contarini G., Degano L. Estimation of formaldehyde, benzoic acid and lysozyme in Provolone cheese // *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*. 1987. N 38(6). P. 534–546.
 24. Urbienė S. A. Naujų biologiškai vertingų raugintų pieno produktų kūrimo moksliniai pagrindai ir praktinis pritaikymas. Habilitacinio darbo santrauka. Kaunas: Technologija, 1995. 58 p.
 25. Urbienė S. Pieno ir jo produktų cheminės analizės metodai. Kaunas, 1999. 247 p.
 26. Urbienė S., Rumpis M. Nitratai ir nitritai pieno produktuose // *Visuomenės sveikata*. 2004. Nr. 2. P. 64–69.
 27. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. Москва: Легкая и пищевая промышленность. 1984. 344 с.
 28. Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. Москва: Пищевая промышленность. 1971. 424 с.
 29. Кислухина О. В., Калунянц К. А., Аленова Д. Ж. Ферментативный лизис микроорганизмов. Алма-Ата Рауан, 1990. С. 30–37.
 30. Кузнецова Т. А., Кислухина О. В., Авиженис В. Ю. Лизис микроорганизмов ферментными препаратами // *Ферментная и спиртовая промышленность*. 1985. № 6. С. 38–39.
 31. Пузенко И. В. и др. Чувствительность ацидофильных бактерий к лизоциму // *Молочная промышленность*. 1983. № 12. С. 18–20.
 32. Щербакова Э. Г. и др. Детские молочные продукты, обогащенные лизоцимом. Москва: Агропромиздат, 1986. 40 с.
 33. Эйлер Е. Яды в нашей пище. Москва: Мир, 1986. 202 с.

Sigita Urbienė, Vytautas Avizienis, Jelena Šapošnikova

INFLUENCE OF LYSOZYME ON TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MILK

Summary

The study presents an analysis of lysozyme influence on the technological properties of milk. The results show that lysozyme prevents the development of undesirable microorganisms and positively influences the quality of fermented milks. Addition of lysozyme prolongs the duration of the bactericidal phase. The clotting of milk in samples with lysozyme 12–15% faster than in the control sample without lysozyme. Besides, addition of lysozyme intensifies the process of whey removal. In samples with lysozyme, whey was distinguished at a smaller optical density than in control samples. The development of lactic bacteria during the fermentation process was examined, too. The influence of lysozyme on this process was very insignificant. Addition of lysozyme insignificantly reduced the viscosity and acidity of fermented milk gels.

Key words: lysozyme, renneting time, ferment milk gel, optical density, casein particle, lactic acid bacteria, acidity

Сигита Урбене, Витаутас Авиженис,
Елена Шапошникова

ВЛИЯНИЕ ЛИЗОЦИМА НА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛОКА

Резюме

В статье представлен анализ влияния лизоцима на технологические свойства молока.

Установлено, что лизоцим мешает развитию посторонней микрофлоре и положительно влияет на качество пробы сырого молока, на брожение молока и сычужно-бродильной пробы. Выявлено, что добавка лизоцима продлевает длительность бактерицидной фазы. Исследования образования сычужного свертывания показали, что в образцах с лизоцимом ферментативная структура образовалась на 12–15% быстрее по сравнению с контрольным образцом без лизоцима. Кроме того, выявлено, что добавка лизоцима интенсифицирует процесс выделения сыворотки. Установлено,

что в сыворотке, из образцов с лизоцимом, отличается меньшей оптической плотностью по сравнению с контрольным. Также было исследовано развитие молочнокислых бактерий в процессе сквашивания. Установлено, что лизоцим на этот процесс имеет очень незначительное влияние. Получено, что добавка лизоцима на 1–1,5 ч продлевает фазу дисперсионного увеличения казеинового комплекса молока, немного снижает вязкость и кислотность сквашенной структуры.

Полученные результаты позволяют полагать, что добавка лизоцима положительно влияет на образование кислотной структуры, сформированной из более мелких белковых структур. Кроме того, лизоцим незначительно влияет на процесс сквашивания и на качество образовавшейся структуры.

Ключевые слова: лизоцим, бактерицидная фаза, ферментативная структура, оптическая плотность, комплекс казеина, молочнокислые бактерии, сквашенная структура, кислотность