

Poglavlje 19

LIZOZIM IZ BJELANJKA JAJETA I NJEGOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Marta Ostojčić*, Marija Stjepanović, Mirna Brekalo, Ivica Strelec, Sandra Budžaki,
Drago Šubarić

*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Hrvatska, *marta.ostojcic@ptfos.hr*

SAŽETAK

Ljuska kokošjih jaja nastaje kao otpad industrije, restorana i kućanstava; s jedne strane predstavlja opterećenje okoliša, a s druge strane ogroman potencijal za daljnje korištenje. Među ostalim prednostima, prijanjajući sloj bjelanjka čini 10 – 15 % mase otpadne ljuske jajeta, a s obzirom na to da sadrži oko 11 % proteina koristi se kao sirovina za proizvodnju pročišćenih proteina, između kojih i lizozima, čiji prosječni udio u ukupnim proteinima bjelanjka jajeta iznosi oko 3,5 %. Lizozim je enzim iz podskupine glikozidaza koji hidrolizira β -vezu između *N*-acetilmuraminske kiseline i *N*-acetilglukozamina peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterija i na taj način sprječava njihovo razmnožavanje. Upravo zbog toga Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i mnoge zemlje dopuštaju upotrebu lizozima u određenim prehrambenim proizvodima u obliku aditiva (E1105) s osnovnim tehnološko-funkcionalnim djelovanjem konzervansa. Najvažnija upotreba lizozima u prehrambenoj industriji u proizvodnji je vina i piva gdje ograničava proliferaciju bakterija mliječne kiseline te za inhibiciju rasta bakterija razreda *Clostridia* tijekom sazrijevanja sira, dok se još može koristiti i za kontroliranje pojave toksina, ali i za povećanje dugotrajnosti proizvoda. Ako se u obzir uzme da je najvažniji izvor lizozima kao aditiva za industrijsku upotrebu upravo bjelanjak jajeta te da su kokošja jaja mogući izvor alergena za određenu populaciju ljudi, sve su veće potrebe za njegovom kontrolom i isticanjem na deklaraciji proizvoda. Cilj ovog poglavlja jest dati pregled izolacije lizozima iz (prijanjujućeg sloja) bjelanjka otpadne ljuske kokošjih jaja, opisati njegovu primjenu u prehrambenoj industriji, kao i moguću problematiku, uz metode detekcije i kvantifikacije.

Ključne riječi: ljuska jajeta, proteini bjelanjka jajeta, lizozim

UVOD

Trenutna prosječna proizvodnja kokošnjih jaja iznosi oko 79 milijuna tona godišnje (Statista, 2023), dok će, prema procjenama, taj broj porasti i na 90 milijuna tona do 2030. godine (Budžaki i sur., 2022.; Strelec i sur., 2023.) Ako se u obzir uzme da ljuska jajeta iznosi 10 – 11 % ukupne mase jajeta, jasno je da toliki postotak spomenute količine predstavlja otpad koji je potrebno odgovarajuće zbrinuti. Otpad ljuske jajeta sadrži kalcificirani matriks – ljusku (70 – 80 %), organski omotač – membranu (10 – 15 %) te prijanjajući sloj bjelanjka (10 – 15 %) (Strelec, Ostojčić i Budžaki, 2021.). Bjelanjak jajeta, uz vodu (88 %), ugljikohidrate, pepeo i lipide (1 %), sadrži velik broj funkcionalno važnih proteina (11 %) među kojima su najzastupljeniji i industrijski najbitniji ovalbumin (54 %), ovotransferin (12 %), ovomukoid (11 %), ovomucin (3,5 %) i lizozim (3,5 %) (Abeyrathe i sur., 2013.).

Pojam „lizozim“ prvi put pojavio se 1922. kada je Alexandar Fleming dokazao njegovu antibakterijsku ulogu prilikom ispitivanja sekreta iz nosa prehladenog pacijenta na krvnom agaru, pri čemu u prvim trima danima nije porasla nijedna bakterijska kolonija (Fleming, 1922). To je enzim sveprisutan u prirodi, a proizvode ga virusi, bakterije, fagi, gljive, biljke i životinje, uključujući tkiva i tekućine ptica, sisavaca i insekata (Aminlari, Hashemi i Aminlari, 2014). Lizozim svojim djelovanjem uzrokuje lizu bakterija zbog čega se naziva „vlastitim antibiotikom tijela“.

Zbog svojih bakteriostatskih, baktericidnih i antivirusnih svojstava lizozim iz bjelanjka kokošnjih jaja trenutno se koristi kao aktivni farmaceutski sastojak u medicini i veterini, ali i u prehrambenoj industriji (Silvetti i sur., 2017). Također, je važno napomenuti da je Europska komisija odobrila upotrebu hidrolizata lizozima iz bjelanjka jajeta kao novu hranu u dodacima prehrani i drugim prehrambenim kategorijama kao što su sastojci za fortifikaciju. Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu (FAO-u) i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO-u) te njihovom zajedničkom Stručnom odboru za prehrambene aditive (JECFA-u), lizozim je enzim koji nije toksičan za ljude, a Administracija za hranu i lijekove deklarira ga kao „općenito priznat kao siguran“.

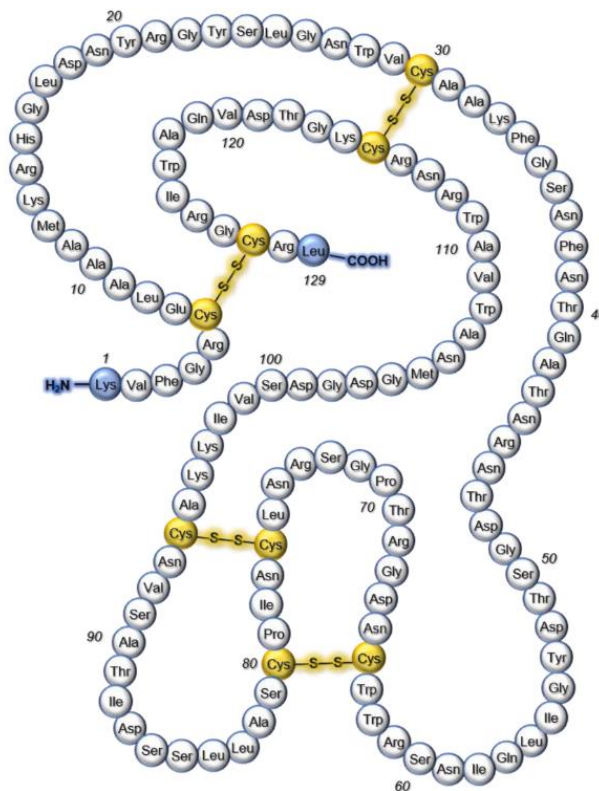
S obzirom na činjenicu da se lizozim najčešće izolira iz bjelanjka kokošnjih jaja, a imajući u vidu da su ona jedan od najčešćih alergena, deklariranje lizozima na prehrambenim proizvodima, ali i lijekovima, prijeko je potrebno da bi se zaštitili najosjetljiviji potrošači (Schneider, Becker i Pischetsrieder, 2010; Liburdi, Benucci i Esti, 2014). U tu svrhu postoje određene tehnike za detekciju i kvantifikaciju lizozima, od kojih se najčešće koriste poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE), enzimski spregnut imunosorpcijski test (ELISA) te reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (RP-HPLC). Prema rezultatima Strelec i sur. (2023) iz 100 g otpadne ljuske jajeta može se dobiti $1,61 \pm 0,34$ g proteina koji sadrže 485,821 U aktivnosti lizozima. Zbog

svega navedenog, ljuska jajeta (posebice prijavljujući sloj bjelanjka otpadne ljuske kokošjih jaja, za koji je dokazano da je bogat lizozimom) predstavlja itekako vrijedan nusproizvod prehrambene industrije koji je još uvijek relativno neistražen.

LIZOZIM IZ BJELANJKA JAJETA

Lizozim (EC 3.2.1.17) hidrolitički je enzim koji cijepa β -1,4-glikozidne veze između *N*-acetilmuramske kiseline i *N*-acetilglukozamin peptidoglikana stanične stijenke bakterija i na taj način sprječava njihovo razmnožavanje (Callewaert i Michiels, 2010; Abeyrathne i sur., 2013; Silvetti i sur., 2017; Wu i sur., 2019). Upravo zbog toga lizozim pokazuje baktericidna i bakteriostatska svojstva posebno protiv Gram-pozitivnih bakterija koje oko sebe imaju debelu peptidoglikansku staničnu stijenku. Kod Gram-negativnih bakterija u staničnoj stijenci prevladavaju lipopolisaharidi, lipoproteini i fosfolipidi, a peptidoglikanski sloj tanji je i nalazi se između unutarnje i vanjske membrane pa je djelovanje lizozima otežano, stoga se kaže da ima djelomičan ili ograničen učinak. Međutim, dodatak etilendiamintetraoctene kiseline ili nekih masnih kiselina, poput palmitinske, miristinske ili stearinske, može povećati njegovu antimikrobnu aktivnost protiv nekih Gram-negativnih bakterija (Benelhadj i sur., 2016). Antimikrobno djelovanje lizozima može se opisati pomoću dvaju različitih mehanizama. Prvi, kao što je već navedeno, podrazumijeva hidrolizu glikozidnih veza peptidoglikana stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija što dovodi do smrti bakterijskih stanica uslijed osmotskog šoka te je taj mehanizam ujedno i općeprihvaćen. Drugi mehanizam antimikrobnog djelovanja lizozima, posebice ljudskog i mišjeg, podrazumijeva njegovo uklapanje u membrane bakterijskih stanica pri čemu dolazi do uništenja ravnoteže membranskog transporta uslijed nastanka neselektivno propusnih kanala te posljedično i smrti bakterijskih stanica (Ragland i Criss, 2017). Ukupni antimikrobni mehanizam djelovanja lizozima predstavlja kombinaciju obaju gore navedenih mehanizama.

U životinjskom svijetu pronađena su tri tipa lizozima, *c*-tip (kokošji, konvencionalni), *g*-tip (guščji) te *i*-tip (beskičmenjačni), koji se razlikuju po broju i vrsti aminokiselina (129, 185 ili 123 aminokiseline), molekularnoj težini (13,5 – 20,5 kDa) i enzimskim svojstvima (Callewaert i Michiels, 2010). Taj protein može se pronaći u mnogim tjelesnim tekućinama i tkivima brojnih živih organizama, i to u slini, sluzi, suzama, krvnom serumu, mlijeku, leukocitima, noktima i bjelanjku jajeta. Dok je najveća zastupljenost lizozima u suzama (3000-5000 $\mu\text{g/ml}$), a tek nešto niža u bjelanjku jajeta (2500 – 3500 $\mu\text{g/mL}$) (Lesnierowski i Kijowski, 2007; Syngai i Ahmed, 2019), nedvojbeno je jasno da se kao glavni izvor lizozima koristi upravo bjelanjak jajeta. Međutim, ljudski lizozim pokazuje gotovo trostruko veću antibakterijsku aktivnost zbog razlika u kationskim ostacima i trodimenzionalnim strukturama te je terapijski učinkovitiji u sprječavanju različitih ljudskih bolesti (Syngai i Ahmed, 2019).



Slika 1 Shematski prikaz primarne strukture lizozima (preuzeto od Melinte i sur., 2021)

Među glavne proteine bjelanjka jajeta, koji predstavljaju potencijal za daljnju upotrebu, pripada lizozim, koji je ujedno i prvi izoliran za industrijsku svrhu (Abeyrathne i sur., 2013). Lizozim iz bjelanjka jajeta pripada c-tipu (Slika 1), sastoji se od 129 aminokiselina umreženih s četirima disulfidnim mostovima, ima molekularnu težinu 14,3 – 14,4 kDa i pokazuje najveću topivost i stabilnost od svih vrsta lizozima (Abeyrathne i sur., 2013; Brasca i sur., 2013; Wu i sur., 2019). Procesi izolacije lizozima iz bjelanjka jajeta od velike su važnosti s obzirom na to da lizozim, uslijed široke primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, mora biti u skladu sa zakonima i propisima o sigurnosti hrane. Shodno tomu, razvijeno je nekoliko najučestalijih pristupa izolacije, koji uključuju (Lesnierowski i Kijowski, 2007; Shahmohammadi, 2018):

- izolaciju pomoću ionskih izmjenjivača – mehanizam razdvajanja temelji se na različitim afinitetima sastojaka uzorka (proteina bjelanjka) prema ionskoj izmjeni;
- kristalizaciju i taloženje – ta tehnika podrazumijeva proces izdvajanja lizozima iz bjelanjka jajeta izravnom kristalizacijom s 5 %-tnim natrijevim kloridom pri čemu je potrebno provesti nekoliko ponovnih rekristalizacija da bi se dobio protein visoke čistoće koji se zatim istaloži;

- izravnu membransku filtraciju – izolacija lizozima uključuje uporabu membranskih filtera koji selektivno propuštaju molekule lizozima dok zadržavaju ostale komponente bjelanjka jajeta;
- afinitetnu kromatografiju – tehnika koja koristi specifične interakcije između lizozima i odabranih liganda na koloni da bi se lizozim selektivno zadržao i potom eluirao;
- gel-filtraciju – postupak se temelji na veličinskoj separaciji molekula bjelanjka, gdje se lizozim odvaja na temelju njegove veličine i oblika;
- ultrafiltraciju – uključuje korištenje membrana s određenom veličinom pora da bi se lizozim odvojio od ostalih bjelančevinskih komponenata prema njihovim veličinama, no smanjenja je difuzija kroz membranu jer lizozim može elektrostatski vezati ovomucin i druge negativno nabijene proteine bjelanjka.

Svaka od tih metoda ima svoje specifične prednosti i primjene u izolaciji lizozima iz bjelanjka jajeta, ovisno o potrebama i ciljevima istraživanja ili proizvodnje. Kromatografija ionske izmjene smatra se najprikladnijom tehnikom za odvajanje lizozima zbog visoke izoelektrične točke lizozima (10,5 – 11) u odnosu na druge proteine bjelanjka, što olakšava njegovo selektivno vezivanje i eluiranje (Abeyrathne i sur., 2013).

NEKE MOGUĆNOSTI PRIMJENE LIZOZIMA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Zbog sve većeg nepotrebnog bacanja hrane, koje se događa u cijelom lancu opskrbe hranom, ponajviše zbog kontaminacije mikroorganizmima te, posljedično, velikih ekonomskih gubitaka, svakodnevno se radi na razvijanju metodologije za održavanje kvalitete te produljenje roka trajanja hrane. Zbog zabrinutosti potrošača o prisutnosti sintetskih konzervansa u prehrambenim proizvodima sve češće se upotrebljavaju prirodni konzervansi poput biljnih ekstrakata, eteričnih ulja i antimikrobnih enzima (Khorshidian i sur., 2022). Upravo već spomenuta antimikrobna svojstva lizozima pružaju mu široku primjenu u prehrambenoj industriji. Prema Wu i sur. (2019) lizozim kokošjeg bjelanjka jedini je dopušten za upotrebu u prehrambenoj industriji, a trenutno se koristi u siru, kineskim rezancima, sushiju, kiselim krastavcima i u proizvodnji vina i piva (Syngai i Ahmed, 2019).

Mogućnosti primjene lizozima u proizvodnji sira

Budući da je lizozim prirodno prisutan u mlijeku sisavaca, predstavlja prikladan konzervans u mliječnim proizvodima. Stoga ne čudi činjenica da je najpoznatija primjena lizozima u prehrambenoj industriji upravo u proizvodnji sira gdje je zamjena za nitrate i kontrolira rast mikroorganizama koji uzrokuju fermentaciju maslaca (Silveti i sur., 2017). Početkom

1980-ih Francuska je bila prva zemlja koja je dopustila industrijsku upotrebu lizozima u proizvodnji sira, dok je petnaestak godina kasnije Europska unija odobrila njegovu upotrebu, no bez ograničenja o doziranju. Danas je dopuštena uporaba lizozima kao konzervansa (E1105) u zrelih sirevima, sukladno važećoj EU legislativi i Codex Alimentarius-u (Brasca i sur., 2013). Procijenjeni sadržaj lizozima u siru različit je prema dostupnoj literaturi, ali kreće se okvirno između 50 i 400 mg po kilogramu (Schneider, Becker i Pischetsrieder, 2010; Brasca i sur., 2013; Silveti i sur., 2017; Syngai i Ahmed, 2019). Do kontaminacije sira može doći pri proizvodnji, posebice kada se tradicionalno proizvodi od sirovog mlijeka ili njegova pasterizacija nije pravilno kontrolirana ili tijekom zrenja ili skladištenja sira. Među najvažnijim patogenima, pronađenim u kontaminiranom siru, izdvajaju se *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (Khorshidian i sur., 2022). Dok *Bacillus cereus* u siru razvija neugodan miris i zgrušavanje, nadimanje tijekom zrenja odvija se zbog prisutnosti *Clostridium tyrobutyricum* koja pospješuje fermentaciju laktata pri čemu, između ostalog, nastaju maslačna kiselina, ugljikov dioksid i vodik. Nastali plinovi najčešće dovode do neželjenog bubrenja sira gdje dolazi do stvaranja pritiska i, posljedično, pucanja sira, dok maslačna kiselina i drugi proizvodi fermentacije mogu uzrokovati nepoželjan neugodni okus. Lizozim, osim što sprječava djelovanje navedenih patogena, ne inhibira kulture potrebne za proces zrenja, već dodatno pridonosi ubrzanju zrenja sira (Silveti i sur., 2017).

Mogućnosti primjene lizozima u proizvodnji vina

Druga najveća upotreba lizozima u proizvodnji je vina gdje se koristi za kontrolu malolaktičke fermentacije kao prirodni dodatak ili zamjena za sumporov dioksid u sprječavanju stvaranja hlapljive kiselosti u vinima, za sprječavanje promjene boje crnih vina i povećanje razine biogenih amina (Weber i sur., 2009; Liburdi, Benucci i Esti, 2014; Silveti i sur., 2017). Prema Lopez i sur. (2009) lizozim se koristi u različitim fazama proizvodnje vina, od preventivne uporabe u moštovima prije taloženja i početka alkoholne fermentacije, za odgađanje rasta bakterija odgovornih za malolaktičku fermentaciju nakon što ona završi do procesa stabilizacije i konzerviranja. Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino krajem 1990-ih godina službeno je dopustila upotrebu lizozima kao zamjene ili dodatka za sumporov dioksid koji se koristi za kontrolu malolaktičke fermentacije, a može uzrokovati zdravstvene probleme kod astmatičara koji su osjetljivi na sulfite. No, iako se lizozim pokazao učinkovitim u kontroli kvasaca (*Brettanomyces*) i octenih bakterija (*Acetobacter*), koji uzrokuju hlapljivu kiselost u gaziranim vinima, gotovo nikada u potpunosti ne zamjenjuje sumporov dioksid, već se češće koristi kao dodatak, ponajviše zbog antioksidativnih svojstava sumporovog dioksida, kao i njegovog antimikrobnog djelovanja prema Gram-negativnim bakterijama i kvascima, ali i poboljšanja okusa vina (Liburdi, Benucci i Esti, 2014; Silveti i sur., 2017). Pri kontroli alkoholne i

malolaktičke fermentacije lizozim ograničava proliferaciju neželjenih bakterija mliječne kiseline, uglavnom *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* i *Leuconostoc mesenteroides*. S druge strane, kod nekih vrsta bijelih vina lizozim se koristi za ograničavanje malolaktičke fermentacije ako se želi dobiti voćni ili cvjetni okus, a izbjeći kiselost (Wu i sur., 2019). Uredba Komisije (2006) odredila je maksimalnu količinu dodatka od 500 mg lizozima po litri vina, a prema literaturi procijenjeni sadržaj lizozima u vinima kreće se između 100 i 500 mg/L s obzirom na to da su koncentracije veće od 100 mg/L učinkovite protiv *Oenococcus oeni*, primarne bakterije u završetku malolaktičke fermentacije (Liburdi, Benucci i Esti, 2014; Silvetti i sur., 2017; Syngai i Ahmed, 2019). Prema Liburdi, Benucci i Esti (2014) dodatak lizozima u koncentracijama 100 – 150 mg/L služi preventivnom suzbijanju nastanka malolaktičke fermentacije, 250 – 350 mg/L zaštititi vina tijekom alkoholnog vrenja te stabilizaciji vina nakon malolaktičke fermentacije, dok se s 500 mg/L postiže cjelokupna inhibicija malolaktičke fermentacije.

Mogućnosti primjene lizozima u proizvodnji piva

U proizvodnji piva lizozim učinkovito sprječava rast bakterija mliječne kiseline (Silvetti i sur., 2017) i produljuje rok trajanja nepasteriziranog piva (Liburdi, Benucci i Esti, 2014). Mikroorganizmi odgovorni za kvarenje piva pripadaju kvascima te bakterijama. U Gram-pozitivne bakterije kvarenja piva ubrajaju se bakterije mliječne kiseline koje su ujedno odgovorne za 70-ak posto svih mikrobnih kvarenja piva, a pronalaze se u gotovo svakom koraku proizvodnje slada i piva upravo zbog svoje otpornosti na zrak, promjenu pH vrijednosti kao i visoke razine etanola (Silvetti i sur., 2012). Neke od bakterija mliječne kiseline, poput *Lactobacillus brevis* i *Pediococcus damnosus*, mogu se prilagoditi hmelju te uzrokovati nepoželjan okus i aromu te visoku zamućenost krajnjeg proizvoda (Silvetti i sur., 2017). Prema Uredbi Komisije (2012) primjena lizozima kao konzervansa odobrena je u pasteriziranom ili sterilno filtriranom pivu s obzirom na to da se pokazao učinkovitim u sprječavanju rasta bakterija mliječne kiseline u koncentraciji od 100 mg/L, no bez učinka protiv drugih uzročnika kvarenja. Osim toga, lizozim nema utjecaj na okus piva, već mu može produljiti rok trajanja (Silvetti i sur., 2012; Silvetti i sur., 2017).

Ostale mogućnosti primjene lizozima

Osim već spomenutih značajnijih primjena, lizozim se koristi i za kontrolu pojave toksina prouzročenih *Clostridium botulinum* u ribi, morskim plodovima, piletni i povrću, kao dodatak kiselim krastavcima, sushiju i kineskim rezancima, za prskanje voća i povrća te u pakiranjima hrane za povećanje trajnosti proizvoda poput svježeg ili prerađenog voća i povrća, ribe i ribljih proizvoda te mesa (Leśnierowski i Cegielska-Radziejewska, 2012; Abeyrathne i sur., 2013; Barbioli i sur., 2013; Corradini i sur., 2013; Silvetti i sur., 2017). Zbog svog antibakterijskog djelovanja i sposobnosti kontrole pojave i širenja glavnih

patogena koji se prenose hranom kao što su *Listeria monocytogens*, *Clostridium botulinum* i *Clostridium tyrobutyricum*, lizozim omogućuje dugotrajno skladištenje hrane premazivanjem proizvoda lizozimom ili pripravcima na bazi lizozima (Abeyrathne i sur., 2013; Silveti i sur., 2017; Shahmohammadi, 2018). Osim toga, ta metoda premazivanja površine lizozimom može pomoći pri onemogućavanju gubitka proizvoda na masi uslijed respiracije, kao i sprječavanju oksidacije te stvaranju putrescina u voću (Zimoch-Korzycka i Jarmoluk, 2014; Silveti i sur., 2017). Za premazivanje prehrambenih proizvoda koriste se hidrogelovi ili jestivi filmovi na bazi raznih biomaterijala poput kitozana, pektina, alginata, škroba, karagena ili raznih proteina. Oni se često nanose u dvama slojevima da bi se izbjeglo smanjenje učinkovitosti lizozima zbog nakupljanja mrtvih bakterija (Silveti i sur., 2017). Prema literaturi to se može ubrajati i pod aktivno pakiranje hrane s obzirom na to da, za razliku od običnog pakiranja koje kratkoročno čuva hranu, ima mogućnost dugoročnog produljenja roka trajanja. Antimikrobna ambalaža posebna je vrsta aktivnog pakiranja zbog sposobnosti inhibicije mikroorganizama kontroliranim otpuštanjem antimikrobnog agensa na površinu hrane. Upravo kontroliranim i produljenim otpuštanjem na proizvodu održava se sustavna koncentracija antimikroba dovoljna za inhibiciju tijekom skladištenja hrane. Antimikrobni materijali s lizozimom kao glavnim sredstvom dobiveni su ugradnjom lizozima u polivinil alkohol, filmove na bazi zeina i filmove na bazi celuloze, koji su korišteni pri pakiranju (Corradini i sur., 2013).

Osim primjene kao konzervansa za hranu, prema Nawaz i sur. (2022) lizozim se odnedavno koristi u senzorima metalnih iona zagađivača u izvorima hrane (poput žive) koji uzrokuju oštećenja središnjeg živčanog i endokrinog sustava, mozga, pa čak i bubrega, uz granicu detekcije i pri niskim koncentracijama, što mu uz netoksičnost daje obećavajuće izgleda u kontroli kvalitete hrane.

Budući da se jaja te proizvodi od jaja ubrajaju u osam glavnih skupina koje čine 90 % alergija na hranu te da je zabilježeno sve više alergijskih reakcija zbog prisutnosti lizozima u prehrambenim proizvodima, uporaba lizozima mora se deklarirati prema označavanju alergena na deklaraciji proizvoda, a sve u svrhu zaštite potrošača (Schneider, Becker i Pischetsrieder, 2010; Liburdi, Benucci i Esti, 2014). Prema Brasca i sur. (2013) neke studije prikazuju lizozim kao slab alergen, dok druge imaju suprotne zaključke.

TEHNIKE ZA DETEKCIJU I KVANTIFIKACIJU LIZOZIMA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

Kao što je već navedeno, najvažnija uloga lizozima antibakterijska je aktivnost u ljudskom tijelu. Unatoč tomu, lizozim može potencijalno uzrokovati alergijske reakcije kod osjetljive populacije, čak i kada se nalazi u tragovima. Iz tih razloga njegova detekcija u hrani postala je vrlo važnom. Tradicionalne metode detekcije lizozima skupe su, vremenski zahtjevne i ne mogu biti primijenjene za brzu *in-situ* kvantifikaciju (Vidal, Gautron i Nys,

2005, Melinte i sur., 2021). Elektrokemijski i optički senzori privukli su pozornost zbog svoje svestranosti i sposobnosti smanjivanja nedostataka tradicionalnih metoda. Spajanje površinski poboljšane Raman spektroskopije s biomimetičkim receptorima i kemometrijskom analizom pokazalo je visoku osjetljivost i selektivnost za detekciju lizozima (Wang i sur., 2022). Međutim, te metode nisu dobre za provedbu na licu mjesta. Elektrode modificirane nanomaterijalima ili polimernim filmovima za detekciju proteina nude brzu analizu i visoku osjetljivost te se mogu integrirati u prijenosne uređaje (Singla i sur., 2023). Zhang i sur. (2015) modificirali su elektrodu kompozitom akrilne kiseline i šupljih kuglica TiO_2 u koju su zatim ugrađeni aptameri kao elementi za prepoznavanje. Rezultati spektroskopije elektrokemijske impedancije (*electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) pokazali su da aptasenzori mogu mjeriti lizozime s limitom detekcije od 1,04 pM i dinamičkim dometom između 0,05 i 100 µg/L (Melinte i sur., 2021). Aptasenzori su obećavajuća tehnologija za detekciju alergena u hrani, no, unatoč tomu, nedostatak im je ograničena stabilnost i specifičnost u kompleksnim matriksima. S druge strane, molekularno utisnuti polimeri (*molecularly imprinted polymers*, MIP) porozni su materijali koji sadržavaju visoko afinitetne strane vezivanja analita od interesa, mogu parirati prirodnim elementima za prepoznavanje u smislu afiniteta, ali posjeduju vrhunsku toplinsku i kemijsku stabilnost (Lowdon, 2020).

Danas se za detekciju i kvantifikaciju lizozima u prehrambenim proizvodima najviše koriste poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE), enzimom spregnuti imunosorpcijski test (ELISA), reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (RP-HPLC) te turbidimetrijski test.

Poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE)

Poliakrilamid gel elektroforeza u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata elektroforetska je metoda razdvajanja proteina oligonukleotida na osnovi molekulske mase. Obično se ta metoda provodi kada je lizozim konjugiran ili reagira s drugim kemikalijama da bi se utvrdilo je li do reakcije došlo i da bi se istražila promjena molekulske težine lizozima pod utjecajem reakcije. U procesu ekstrakcije i pročišćavanja lizozima SDS-PAGE može se koristiti za provjeru čistoće lizozima, gdje samo prisutnost jedne trake na približno 14 kDa može potvrditi da je izolacija lizozima bila učinkovita (Altıntaş & Denizli, 2009). Prema Brasca i sur. (2013) ta metoda pokazuje velik potencijal za detekciju neželjenih alergena bjelanjka jajeta koji se mogu pronaći u komercijalnim aditivima lizozima (E1105) dostupnim na tržištu.

Enzimski spregnut imunosorpcijski test (ELISA)

Enzimski spregnut imunosorpcijski test (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) najčešće je korištena tržišno dostupna metoda za određivanje alergena u hrani (Besler, 2001). Međutim, prema nekim istraživanjima, ta metoda nije prikladna za kvantifikaciju alergena iz bjelanjka jajeta jer se pojavljuje unakrsna reaktivnost (engl. *cross reactivity*) s drugim proteinima (Kerkaert, Mestdagh i De Meulenaer, 2010). No, prema izvješću EFSA-e (2014), ta metoda može poslužiti u detekciji lizozima u vinima, pri čemu je limit detekcije 1 mg/L.

Reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (RP-HPLC)

Reverzno-fazna tekućinska kromatografija analitička je metoda za razdvajanje proteina i drugih biomolekula iz smjese na osnovi njihove polarnosti/hidrofobnosti. Osnovu razdvajanja čini hidrofobna interakcija između hidrofobnih skupina nosača (stacionarne faze) i molekule od interesa, a koja s kolone eluira postupnim povišenjem hidrofobnosti eluenta (mobilne faze). RP-HPLC, prije svega, namijenjena je za detekciju i kvantifikaciju lizozima u mlijeku, sirevima i vinima. Metoda se često koristi jer omogućuje kvantifikaciju lizozima neovisno o aktivnosti enzima koji se nalazi u uzorku (Brasca i sur., 2013).

Turbidimetrijski test

Turbidimetrijski test aktivnosti lizozima temelji se na litičkoj aktivnosti lizozima na bakterijskim stanicama *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*) (Brasca i sur., 2013). Sukladno propisima Europske unije (231/2012) svaki pripravak lizozima koji se stavlja na tržište u obliku aditiva oznake E1105 mora sadržavati najmanje 950 mg/kg na bezvodnoj osnovi. Pritom, ključno je naglasiti da se taj način kvantifikacije lizozima u aditivima još naziva potencijom lizozima.

Od ostalih tehnika za karakterizaciju lizozima značajne su još i infracrvena (IR) spektroskopija, UV-vis spektroskopija, fluorescentna spektroskopija, nuklearna magnetna rezonanca (NMR), spektri kružnog dikroizma (CD) te diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).

Infracrvena (IR) spektroskopija

IR spektroskopija metoda je koja se učestalo koristi za određivanje kemijskih struktura spojeva preko funkcijskih skupina. Lizozim ima tri karakteristične regije: amid I ($1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$), amid II ($1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$) i amid III ($1320 - 1230\text{ cm}^{-1}$). Od tih triju regija vjerovalo se da amid I uključuje sekundarne strukture, a to su različite proteinske strukture pripisane specifičnim rasponima infracrvenog spektra: $1650 - 1658\text{ cm}^{-1}$ za α -uzvojnici,

1620 – 1640 cm^{-1} i 1670 – 1695 cm^{-1} za β -nabranu ploču, 1640 – 1648 cm^{-1} za neuređenu konformaciju i približno 1670, 1683, 1688 i 1694 cm^{-1} za β -zavojnice. Smatra se da amid II nije toliko osjetljiv na konformaciju proteina, što se uglavnom može pripisati N-H savijanju u ravnini i C-N vibracijama istezanja. Međutim, signal amida III uvijek se zanemaruje zbog njegove slabosti (Prosapio, Reverchon i Marco, 2016.).

UV-vis spektroskopija

UV-vis spektroskopija temeljni je alat za istraživanje strukturnih promjena i praćenje formiranja kompleksa između liganda i proteina utvrđivanjem promjena valne duljine. U UV-vis spektru lizozima postoji jak apsorpcijski vrh blizu 200 nm koji odražava konformaciju okvira, kao i relativno slabiji vrh blizu 280 nm zbog prisutnosti ostataka aromatskih aminokiselina lizozima (triptofan i tirozin) (Shanmugaraj, Anandakumar i Ilanchelian, 2015).

Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentna spektroskopija vrlo je osjetljiva metoda za vizualizaciju tercijarnih strukturalnih svojstava proteina koja se može koristiti za savijanje/odvijanje proteina. Fluorescencija lizozima pripisuje se ostacima triptofana lociranim na 62. i 108. mjestu sekvencije aminokiseline. Valna duljina maksimalne emisije (λ_{max}) za lizozim otprilike je 340 nm (Antonov i sur., 2017).

Nuklearna magnetska rezonanca (NMR)

Nuklearna magnetska rezonanca (NMR) mogla bi se koristiti za određivanje visoko rezolutne 3D strukture, interakcije liganda i dinamičnosti proteina, a aplikacija te tehnologije ovisi o opservaciji nukleusa NMR-a kao što su ^1H , ^{13}C i ^{15}N . Obično je količina izotopa ^{13}C i ^{15}N ograničena te bi se one trebale inkorporirati u proteine (Wu i sur., 2019).

Spektar kružnog dikroizma (CD)

Spektar kružnog dikroizma (CD) intenzivno se primjenjuje za karakterizaciju lizozima. CD je jednostavna i brza metoda za razjašnjavanje sekundarne i tercijarne strukture proteina (Liang i sur., 2013). CD, u kombinaciji s fluorescentnom spektroskopijom, učinkovito je korišten za razjašnjenje mehanizma savijanja lizozima iz psećeg mlijeka, čime se razjasnilo stanje rastaljene globule lizozima – intermedijara savijanja proteina koji je bio stabilniji i sličniji prirodnoj strukturi od ostalih lizozima (Wu i sur., 2019).

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) koristi se za razumijevanje stabilnosti proteina i energetskog profila. Kod proučavanja lizozima DSC koristi se za razumijevanje rane faze kristalizacije, indicirajući prisutnost ili odsutnost agregata, za ispitivanje iona i pH vrijednosti na termodinamičku stabilnost tijekom termičke denaturacije lizozima, za procjenu vezivanja drugih molekula na lizozim koji utječe na promjene u enzimskoj aktivnosti ili konformaciju, služi kao modelna molekula za procjenu interakcije između lijeka i proteina i za određivanje termodinamike proteina, načina savijanja i mehanizama razmatavanja (Wu i sur., 2019).

Na kraju, bitno je naglasiti da zajednički FAO/WHO stručni odbor za prehrambene aditive ipak savjetuje provođenje turbidimetrijske analize da bi se odredila aktivnost lizozima, a Brasca i sur. (2013) u svojem radu navode da su rezultati dobiveni HPLC metodom značajno povezani s onima dobivenim turbidimetrijskim testom.

ZAKONODAVSTVO O PREHRAMBENIM ENZIMIMA

Enzimi su u prošlosti smatrani netoksičnima i bezopasnim za potrošače s obzirom na to da su prirodno prisutni u sastojcima za pripremu hrane. Kao takvi, do 2008. godine, prehrambeni enzimi, osim onih koji su se koristili kao prehrambeni aditivi (primjerice E1103 invertaza i E1105 lizozim), nisu bili regulirani na razini EU-a ili su bili regulirani nacionalnim zakonodavstvima pojedinačnih država članica. Samo su Francuska i Danska zahtijevale procjenu sigurnosti prehrambenih enzima za proizvodnju hrane (FSAI).

Godine 2008. uvedena je Uredba (EU-a) br. 1332/2008 u svrhu određivanja pravila o prehrambenim enzimima koji se koriste u hrani uključujući enzime koji se koriste kao pomoćna sredstva u procesu s ciljem usklađivanja nacionalnih odredbi koje se odnose na upotrebu enzima u hrani. Uredba (EU-a) br. 1332/2008 (OJ L 354, str. 7, 31. 12. 2008.) Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehrambenim enzimima obuhvaća samo enzime koji se dodaju hrani sa svrhom obavljanja tehnoloških funkcija u proizvodnji, preradi, pripremi, obradi, pakiranju, prijevozu ili skladištenju takve hrane uključujući enzime koji se koriste kao pomoćna sredstva u procesu. Također, obuhvaća „prehrambene enzimske pripravke“ koji se definiraju kao formulacija koja se sastoji od jednog ili više prehrambenih enzima u koje su ugrađene tvari kao što su dodaci hrani i/ili drugi sastojci hrane da bi se olakšalo njihovo skladištenje, prodaja, standardizacija, razrjeđivanje ili otapanje. Međutim, označavanje lizozima u pakiranim prehrambenim proizvodima kao alergena iz jaja može dovesti u zabludu i njegovo prepoznavanje u proizvodima može biti otežano jer se pojavljuje kao aditiv „E1105 (lizozim)“, „konzervans (lizozim)“ ili „lizozim (iz bjelancevine jajeta)“. Lizozim je također prisutan u brojnim lijekovima, uključujući antiseptike i sprejeve za nos. Stoga pacijenti alergični na jaja mogu često nesvjesno biti izloženi malim količinama lizozima u raznim industrijskim prehrambenim proizvodima,

uključujući sir, pesto umake, gotova jela kao što su pizza, ravioli ili salate, ili u lijekovima te, bez velike izloženosti, razviti alergijske reakcije (Elbany i sur., 2021.). Provedbenom uredbom (EU 218/991 od 12. srpnja 2018.) Europska komisija odobrila je upotrebu hidrolizata lizozima iz bjelanjka jajeta kao novu hranu u dodacima prehrani i drugim prehranbenim kategorijama kao što su sastojci za fortifikaciju. Europska komisija složila se s maksimalno dozvoljenom koncentracijom od 1000 mg/dan.

ZAKLJUČAK

Posljednjih godina sve je veći naglasak na održivom gospodarenju otpadom iz poljoprivredne i prehrambene industrije te dobivanju visokovrijednih bioprodukata tih industrija. Ljuska jajeta pruža brojne mogućnosti za dobivanje raznih funkcionalnih proizvoda, posebice lizina, no za njihovu učinkovitu i što povoljniju ekstrakciju potrebno je provesti dodatna znanstvena istraživanja sa svrhom optimiziranja procesa. Lizozim iz kokošnjih jaja jedini je lizozim koji se koristi u prehrambenoj industriji. Taj enzim učinkovit je protiv Gram-pozitivnih bakterija, no njegovo djelovanje može se proširiti i na Gram-negativne bakterije putem denaturacije, kemijske modifikacije ili kombinacijom s drugim konzervansima. Zbog svoje sigurnosti i tehnološke stabilnosti, lizozim je idealan konzervans u prehrambenoj industriji, ali ga se u Europskoj uniji mora deklarirati kao potencijalni alergen.

LITERATURA

- Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU (2013) Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents – A review. *Poultry Science*, **92**(12):3292-3299.
- Altıntaş EB, Denizli A (2009) Monosize magnetic hydrophobic beads for lysozyme purification under magnetic field. *Materials Science & Engineering C*, **29**:1627-1634.
- Aminlari L, Hashemi MM, Aminlari M (2014) Modified lysozymes as novel broad spectrum natural antimicrobial agents in food. *Journal of Food Science*, **79**:1077-1090.
- Antonov YA, Zhuravleva IL, Cardinaels R, Moldenaers P (2017) Macromolecular complexes of lysozyme with kappa carrageenan. *Food Hydrocolloids*, **74**:227-23.
- Barbioli A, Bonomi F, Capretti G, Iametti S, Manzoni M, Piergovanni L, Rollini M (2013) Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, **26**:387-392.
- Benelhadj S, Fejji N, Degraeve P, Attia H, Ghorbel D, Gharsallaoui A (2016) Properties of lysozyme/*Arthrospira platensis* (Spirulina) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. *Algal Research*, **15**:43-49.

Besler M (2001) Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, **20**:662–672.

Brasca M, Morandi S, Silvetti T, Rosi V, Cattaneo S, Pellegrino L (2013) Different Analytical Approaches in Assessing Antibacterial Activity and the Purity of Commercial Lysozyme Preparations for Dairy Application. *Molecules*, **18**:6008-6020.

Budžaki S, Velić N, Ostojčić M, Stjepanović M, Bilić Rajs B, Šereš Z, Maravić N, Stanojev J, Hessel V, Strelec I (2022) Waste Management in the Agri-Food Industry: The Conversion of Eggshells, Spent Coffee Grounds, and Brown Onion Skins into Carriers for Lipase Immobilization. *Foods*, **11**(3):409.

Callewaert L, Michiels CW (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, **35**(1):127-160.

Commission Regulation, 2006. Commission regulation (EU) No. 643/2006 of 27 April 2006 amending regulation (EC) No. 1622/2000 laying down certain detailed rules for implementing regulation (EC) No. 1493/1999 on the common organisation of the market in wine and establishing a community code of oenological practices and processes, and regulation (EC) No. 884/2001 laying down detailed rules of application concerning the documents accompanying the carriage of wine products and the records to be kept in the wine sector. Off. J. Eur. Union L115, 6–9.

Commission Regulation, 2012. Commission regulation (EU) No. 471/2012 of 4 June 2012 amending annex II to regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council as regards the use of lysozyme (E 1105) in beer. Off. J. Eur. Union L144, 19–21.

Corradini C, Alfieri I, Cavazza A, Lantano C, Lorenzi A, Zucchetto N, Montenero A (2013) Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol–gel technique. *Journal of Food Engineering*, **119**:580–587.

EFSA, European Food Safety Authority (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. EFSA, Parma.

Elbany C, De Boissieu D, MD, Karila C, Alyanakian MA, Ponvert C, Lageix F, Lezmi G (2021) Unusual Lysozyme-induced anaphylaxis in an egg-allergic child. *Authorea*. DOI: 10.22541/au.163664664.49008784/v1

EZ, Službeni list Europske Unije. Uredba (EZ) br. 1332/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o prehrambenim enzimima i o izmjeni Direktive Vijeća 83/417/EEZ, Uredbe Vijeća (EZ) 1493/1999, Direktive 2000/13/EZ, Direktive Vijeća 2001/112/EZ i Uredbe (EZ) br. 258/97.

EU, Europska Unija: Uredba komisije (EU) br. 231/2012 o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008. Službeni list Europske unije, L 83/1.

EU, Europska Unija, Uredba komisije (EU) br. 2018/991 o odobrenju stavljanja na tržište hidrolizata lizozima iz bjelanjka kokošnjeg jaja kao nove hrane u skladu s Uredbom (EU) 2015/2283 Europskog parlamenta i Vijeća i o izmjeni Provedbene uredbe Komisije (EU) 2017/2470.

Fleming A (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society B*, **93**(653):306-317.

FSAI, Food Safety Authority of Ireland. EU legislation on Food Enzymes. <https://www.fsai.ie/enforcement-and-legislation/legislation/food-legislation/food-enzymes/regulating-food-enzymes-in-the-eu>. (19. 9. 2023.)

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.

Khorshidian N, Khanniri E, Koushki MR, Sohrabvandi S, Yousefi M (2022) An Overview of Antimicrobial Activity of Lysozyme and Its Functionality in Cheese. *Frontiers in Nutrition*, **9**: 833618.

Leśniewski G, Cegielska-Radziejewska R (2012) Potential possibilities of production, modification and practical application of lysozyme. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **11**(3):223-230.

Lesniewski G, Kijowski J (2007) Lysozyme. U: Bioactive Egg Compounds (Huopalahti R, López-Fandino R, Anton M, Schade R, ur.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Njemačka, Str. 33-42.

Liang M, Liu R, Qi W, Su R, Yu Y, Wang L, He Z (2013) Interaction between lysozyme and procyanidin: multilevel structural nature and effect of carbohydrates *Food Chemistry*, **138**:1596-1603.

Liburdi K, Benucci I, Esti M (2014) Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**(5):1062-1073.

Lopez I, Santamaria P, Tenorio C, Garijo P, Gutierrez AR, Lopez R (2009) Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**(9):1005–1012.

Lowdon JW, Diliën H, Singla P, Peeters M, Cleij TJ, van Grinsven B, Eersels K (2020) MIPs for commercial application low-cost sensors and assays – an overview of the current status quo. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **325**:128973.

- Melinte G, Selvolini G, Cristea C, Marrazza G (2021) Aptasensors for lysozyme detection: Recent advances. *Talanta*, **226**:122169.
- Nawaz N, Wen S, Wang F, Nawaz S, Raza J, Iftikhar M, Usman M (2022) Lysozyme and Its Application as Antibacterial Agent in Food Industry. *Molecules*, **27(19)**:6305.
- Pellegrino L, Tirelli A (2000) A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products. *International Dairy Journal*, **10**:435–442.
- Prosapio V, Reverchon E, Marco ID (2016) Production of lysozyme microparticles to be used in functional foods, using an expanded liquid antisolvent process. *Journal of Supercritical Fluids*, **107**:106-113.
- Ragland SA, Criss AK (2017) From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*, **13(9)**:e1006512.
- Schneider N, Becker C-M, Pischetsrieder M (2010) Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **878**:201-206.
- Shahmohammadi A (2018) Lysozyme separation from chicken egg white: a review. *European Food Research and Technology*, **244**:577-593.
- Shanmugaraj K, Anandakumar S, Ilanchelian M (2015) Probing the binding interaction of thionine with lysozyme: a spectroscopic and molecular docking investigation. *Dyes and Pigments*, **112**:210-219
- Silvetti T, Brasca M, Lodi R, Vanoni L, Chiolerio F, Groot MD, Bravi A (2012) Effects of lysozyme on the microbiological stability and organoleptic properties of unpasteurized beer. *Journal of the Institute of Brewing*, **116**:33-40.
- Silvetti T, Morandi S, Hintersteiner M, Brasca M (2017) Use of hen egg white lysozyme in the food industry. *U: Egg Innovations and Strategies for Improvements* (Hester PY, ur.) . Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, Str. 233-242.
- Singla P, Kaur S, Jamieson O, Dann A, Garg S, Mahon C, Crapnell RD, Banks CE, Kaur I, Peeters M (2023) Electrochemical and thermal detection of allergenic substance lysozyme with molecularly imprinted nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **415**:4467–4478.
- Syngai GG, Ahmed G (2019) Lysozyme: A natural antimicrobial enzyme of interest in food applications. *U: Enzymes in food biotechnology Production, Applications and Future Prospects* (Mohammed Kuddus, ur.). Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, Str. 169-179.
- Statista (2023) Global egg production from 1990 to 2021. <https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/> (20. 9. 2023.)

Strelec I, Ostojčić M, Brekalo M, Hajra S, Kim H-J, Stanojev J, Maravić N, Budžaki S (2023) Transformation of eggshell waste to egg white protein solution, calcium chloride dihydrate, and eggshell membrane powder. *Green Processing and Synthesis*, **12(1)**:20228151.

Strelec I, Ostojčić M, Budžaki S (2021) Transformacija ljuske kokošnjih jaja u proizvode dodane vrijednosti. U: Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije - Knjiga 3 (Šubarić D, Miličević B, ur.). Prehrambeno tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; Velečilište u Požegi, Str. 303-327.

Vidal M-L, Gautron J, Nys Y (2005) Development of an ELISA for quantifying lysozyme in hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(7)**:2379-2385.

Wang L, Wang H, Tang X, Zhao L (2022) Molecularly imprinted polymers-based novel optical biosensor for the detection of cancer marker lysozyme. *Sensors and Actuators A: Physical*, **334**:113324.

Weber P, Kratzin H, Brockow K, Ring J, Steinhart H, Paschke A (2009) Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53(11)**:1469-1477.

Wu T, Jiang Q, Wu D, Hu Y, Chen S, Ding T, Ye X, Liu D, Chen J (2019) What is new in lysozyme research and its application in food industry? - A review. *Food Chemistry*, **274**:698-709.

Zhang Z, Zhang S, He L, Peng D, Yan F, Wang M, Zhao J, Zhang H, Fang S (2015) Feasible electrochemical biosensor based on plasma polymerization-assisted composite of polyacrylic acid and hollow TiO₂ spheres for sensitively detecting lysozyme. *Biosensors and Bioelectronics*, **74**:384-390.

Zimoch-Korzycka A, Jarmoluk A (2014) The use of chitosan, lysozyme, and the nano-silver as antimicrobial ingredients of edible protective hydrosols applied into the surface of meat. *Journal of Food Science and Technology*, **52(9)**:5996-6002.