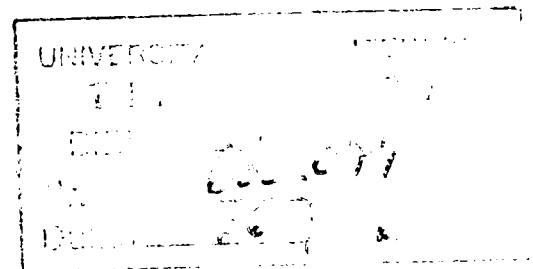


TEZA DE DOCTORAT

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. ING. ALFA XENIA LUPEA



ING. KLEIN LADISLAU

2001

**CONTRIBUȚII LA STUDIUL ȘI SEPARAREA
PROTEINELOR DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE,
SURSĂ POTENȚIAL VALORIFICABILĂ**

CUPRINS

1.	INTRODUCERE	1
	PARTEA I-A. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND POLUANȚII APELOR REZIDUALE DIN INDUSTRIA CĂRNII	
2.	COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ȚESUTULUI MUSCULAR	3
2.1.	Proteinele țesutului muscular	3
2.2.	Componente neproteice ale țesutului muscular	6
2.3.	Compoziția unor organe interne și a altor subproduse	7
2.4.	Transformări post-sacrificare ale cărnii	8
3.	PRELUCRAREA CĂRNII, SURSELE, COMPOZIȚIA ȘI EPURAREA APELOR UZATE DE LA PRELUCRAREA CĂRNII	9
3.1.	Tehnologia de obținere și prelucrare a cărnii	9
3.2.	Apele uzate de la abatoare	10
3.3.	Procedee recuperative moderne de epurare	12
3.4.	Influența structurii și compoziției cărnii și a procedeelelor de prelucrare asupra poluanților din apele uzate	13
4.	PROPRIETĂȚI ALE PROTEINELOR CARE POT STA LA BAZA PROCEDEELOR DE SEPARARE DIN APELE UZATE	15
4.1.	Generalități	15
4.2.	Separarea și fracționarea proteinelor	16
4.3.	Metode de determinare cantitativă a proteinelor	26
4.4.	Determinarea masei moleculare a proteinelor	32
5.	TESTAREA PROTEINELOR SEPARATE DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE CA ADAOS LA FURAJAREA ANIMALELOR	34
5.1.	Aprecierea valorii nutritive a nutrețurilor și rațiilor	34
5.2.	Cerințelor proteice ale animalelor	35
5.3.	Câteva date privind producția și furajarea găinilor ouătoare	38
5.4.	Apele uzate de la abatoare, sursă de proteine pentru adaus de furaje	40
	PARTEA a II-a CONTRIBUȚII PROPRII	
6.	DATE ȘI CONSIDERAȚII PRELIMINARE	41
7.	DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE PROTEINE DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE	44
7.1.	Pregătirea soluțiilor de proteine supuse studiului	44

7.2.	Determinarea conținutului de proteine totale prin metoda Gornall	45
7.3.	Determinarea conținutului de proteine prin metoda Lowry	47
7.4.	Determinarea azotului organic din apă	49
7.5.	Determinarea conținutului de ioni anorganici al apelor uzate supuse studiului	50
7.6.	Rezultate și discuții	52
8.	SEPARAREA ȘI FRAȚIONAREA PROTEINELOR DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE	57
8.1.	Precipitarea proteinelor din apele uzate la punctul izoelectric	57
8.2.	Separarea și fracționarea proteinelor din apele uzate prin salifiere	60
8.3.	Precipitarea proteinelor din apele uzate cu ajutorul solvenților organici	73
9.	FRAȚIONAREA, PURIFICAREA ȘI DETERMINAREA MASEI MOLECULARE A PROTRINELOR DIN APELE UZATE	76
9.1.	Fracționarea prin cromatografie pe gel permeabil	76
9.2.	Separarea ionului amoniu prin gelcromatografie	89
9.3.	Determinarea masei moleculare a proteinelor precipitate din apele uzate	94
10.	TESTAREA PROTEINELOR SEPARATE PRIN SALIFIERE DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE CA ADAOS LA FURAJAREA GĂINILOR OUĂTOARE	110
10.1.	Pregătirea probelor de proteine	110
10.2.	Testarea proteinelor separate din apele uzate de la abatoare ca adaos la furajarea animalelor	114
11.	CONSIDERAȚII PRIVIND INFLUENȚA SEPARĂRII PRIN SALIFIERE A PROTEINELOR ASUPRA CALITĂȚII APELOR UZATE EVACUATE	126
12.	CONCLUZII	128
	BIBLIOGRAFIE	134

1. INTRODUCERE

Una din caracteristicile majore ale lumii contemporane o constituie căutarea de noi soluții în toate domeniile de activitate printre care producția de bunuri alimentare și asigurarea unei alimentații echilibrate a populației ocupă un loc important. Necesitatea noilor soluții se impune, pe de o parte datorită degradării avansate a mediului ambiant ca urmare a aplicării unor metode necorespunzătoare de exploatare a naturii și de dirijare a proceselor de producție și pe de altă parte, datorită epuizării unor resurse de materii prime și de energie pe care omenirea le-a considerat până la un moment dat ca fiind inepuizabile. După ce dezvoltarea științifică și tehnică din ultimele două secole a creat condițiile ridicării calității vieții materiale a oamenilor, lumea contemporană se confruntă cu noi probleme majore legate de gospodărirea resurselor și de protecția mediului.

Presiunea asupra factorilor de mediu și în același timp asupra resurselor, în condițiile unei dezvoltări durabile, se poate reduce prin reutilizarea unora din materialele care în prezent se evacuează în mediu ca poluanți [1].

Industria alimentară este o industrie care prelucrează o însemnată cantitate și o mare varietate de compuși organici naturali și de existența și modul ei de funcționare depind în mare măsură bunăstarea și starea de alimentație a populației.

Resursele folosite de industria alimentară sunt în general regenerabile [2].

Chiar deșeurile rezultate în cursul obținerii industriale a alimentelor sunt în bună parte reutilizabile sau cel puțin reintegrabile în mediul natural. Reintegrarea, însă, cere adesea un efort tehnologic și financiar substanțial.

Un loc însemnat între ramurile industriei alimentare îl ocupă industria cărnii, atât în ceea ce privește volumul producției și importanța pentru nutriția populației, cât și în ceea ce privește volumul deșeurilor și în special al apelor uzate rezultate.

Amploarea producției de carne și importanța ei în România este ilustrată de datele redate în tab. 1.1. [3]

Tab. 1.1. Producția de carne și produse din carne în România

mii tone

	1980	1985	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Carne	993	986	699	947	855	623	626	601	604	607	496
Preparate din carne	279	279	279	365	260	184	168	175	179	152	125
Conserve din carne	77	53	37	48	42	25	25	20	20	18	14

Industria cărnii este de fapt o industrie de prelucrare a materiilor proteice și a lipidelor de origine animală și se bazează pe cunoașterea proprietăților acestora.

Apele uzate de la abatoare și de la alte unități de prelucrare a cărnii sunt încărcate cu substanțe organice și evacuarea lor ca atare în ape naturale sau în

canalizări orășenești ar duce la răsturnarea unor echilibre naturale. Din această cauză, aceste ape uzate se epurează înainte de evacuare prin metode mecanice, chimice și biologice. Epurarea biologică avansată are drept rezultat degradarea poluanților organici până la mineralizare, azotul legat organic fiind adus până la stadiul de azot nitric sau amoniacal, iar carbonul organic la stadiul de CO₂ sau CH₄, funcție de procedeul aplicat.

Procedeele de epurare avansată se bazează pe degradarea substanțelor organice foarte complexe, construite cu un însemnat consum de energie în toate etapele lanțului trofic de către organismele vii care constituie acest lanț. Epurarea este tot un proces care consumă o mare cantitate de energie și este urmată de reintroducerea produselor minerale ale degradării la începutul lanțului trofic.

În ideea reducerii presiunilor asupra factorilor de mediu și de protejare a resurselor, căutarea unor procedee care să scurteze reintegrarea într-un circuit util a componentelor organice a apelor uzate nu poate fi decât benefică.

Recuperarea unor componente valoroase din apele uzate poate avea avantaje economice și nutriționale deosebite. Un exemplu în acest sens îl constituie recuperarea proteinelor din sânge, subprodus al abatorizării pentru care au fost puse la punct tehnologii adecvate. Recuperarea în totalitate a sângelui din abatoare ar permite obținerea a peste 12 mii tone proteine pe an, echivalentul a peste 60 mii tone de carne [4].

Găsirea unor modalități de utilizare mai rațională a componentelor organice ale apelor uzate este condiționată de cunoașterea acestor componente.

Lucrarea de față își propune studiul componentelor de natură proteică din apele uzate de la abatoare pentru a găsi modalități de separare și de reintegrare a lor în circuitul economic. În acest scop lucrarea cuprinde următoarele:

- stabilirea unei metode de determinare cantitativă a proteinelor din apele uzate de la abatoare și pentru urmărirea proceselor de separare;
- studiul conținutului total de proteine din apele uzate de la abatoare și stabilirea fazelor procesului tehnologic de la care apele se pretează pentru separarea de proteine;
- studiul și alegerea metodei adecvate pentru separarea proteinelor din apele uzate;
- caracterizarea proteinelor separate în funcție de masa lor moleculară;
- testarea posibilităților de utilizare a proteinelor separate ca adaos la furajarea animalelor.

PARTEA I-A. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND POLUANȚII APELOR REZIDUALE DIN INDUSTRIA CĂRNII

2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ȚESUTULUI MUSCULAR

În tehnologia de prelucrare, prin carne se înțelege musculatura striată a carcasei împreună cu toate țesuturile cu care vine în legătură naturală, adică împreună cu țesutul conjunctiv, țesutul gras, țesutul osos, vasele de sânge și nervii care se găsesc în musculatura striată [5]. Proporția acestor țesuturi în carne este diferită în funcție de specia, rasa, vârsta, sexul, starea de îngrășare a animalului sacrificat și de regiunea anatomică considerată. Prezența sau absența unora din aceste țesuturi și proporția lor definesc diferitele categorii și calitatea cărnii.

Pe lângă carnea definită ca mai sus, își găsesc utilitatea în alimentație și industria de prelucrare și alte părți anatomiche ca țesuturi grase, organele interne, sângele.

Compoziția chimică a țesutului muscular provenit de la un animal normal, adult este în general constantă și este următoarea:

apă	72 ÷ 75 %
substanțe proteice	18 ÷ 22 %
lipide	0,5 ÷ 3,5 %
substanțe extractive azotate și neazotate	0,8 ÷ 3,0 %
substanțe minerale	0,8 ÷ 1,0 %

Țesutul muscular mai conține și vitamine, în special din grupa vitaminelor B și enzime care cantitativ nu au o pondere semnificativă dar au o mare importanță fiziologică.

2.1. Proteinele țesutului muscular

Cei mai importanți constituenți ai cărnii sunt proteinele iar dintre ele cea mai valoroasă este miozina care predomină în țesutul muscular [6]. Proteinele din compoziția țesutului muscular fac parte din următoarele trei clase principale:

a) Proteinele miofibrilare care se găsesc în compoziția aparatului contractil: miozina, actina, tropomiozina, troponina etc. Ele reprezintă 52-60% din totalul proteinelor țesutului muscular și se pot extrage din miofibrile cu soluții saline cu tăria ionică $\mu > 3$. Odată extrase proteinele miofibrilare sunt solubile în apă.

b) Proteinele sarcoplasmice: mioglobina, enzimele etc. Ele reprezintă aproximativ 30% din totalul proteinelor țesutului muscular și se pot extrage cu apă sau cu soluții saline diluate, cu tărie ionică $\mu < 0,1$, la pH neutru. Proteinele sarcoplasmice sunt proteine solubile.

c) Proteinele insolubile sau proteinele stromale care se găsesc în țesuturile conjunctive și în organite și reprezintă aproximativ 10% din totalul proteinelor musculare. Colagenul și elastina constituie 40-60% și respectiv 10-20% din proteinele stromale, tot în această categorie fiind cuprinse și lipoproteinele și

mucoproteinele.

2.1.1. Proteinele miofibrilare

Proteinele miofibrilare au solubilitatea între aceea a proteinelor sarcoplasmatică și cea a proteinelor stomacale: sunt solubile în soluții saline diluate ceea ce corespunde definiției globulinelor și sunt solubile în apă după ce au fost extrase din miofibrile. Se cunosc aproximativ 20 de proteine miofibrilare diferite, dar miozina și actina sunt predominante, cu un procent de 65-70% din total.

a) **Miozina** se extrage din țesutul muscular cu o soluție cu tăria ionică $\mu > 0,3$, de regulă soluție KCl 0,6M, urmată de precipitarea prin dializă ori prin diluare sau cu soluție tampon de 6,5 cu conținut de 0,3 mol/l KCl și 0,1 mol/l fosfat [7].

Miozina are o moleculă foarte alungită care constă din două lanțuri polipeptidice cu masa moleculară totală de aproximativ 500000. Miozina poate fi scindată enzimatic cu tripsină, cu formare de L- și H-meromiozină (ușoară și grea), cu mase moleculare cuprinse între 150000 și 340000.

Din cauza preponderenței acizilor monoaminocarboxilici în compoziția miozinei, aceasta are un caracter pronunțat acid, cu punctul izoelectric la pH=5,4.

Soluțiile de miozină sunt opalescente, foarte vâscoase. Miozina este solubilă până la o concentrație de 3% în soluții de tărie ionică mare, dar în soluții diluate este insolubilă. Prin depozitarea la rece miozina își pierde treptat solubilitatea prin denaturare urmată de formarea de agregat. Soluția devine tulbure.

Reacțiile de agregare sunt influențate de temperatură, pH și tăria ionică a soluției. Denaturarea este mai accentuată la pH=7 și la peste 8,5 și la concentrații saline mai mari. Dacă miozina din soluție este mai concentrată, prin denaturarea și degradarea ei se formează un gel.

b) **Actina** este o proteină globulară formată dintr-un singur lanț polipeptidic, cu masa moleculară 46000. În lipsă de săruri, actina se găsește în stare globulară (G-actină), cu punctul izoelectric la pH=4,7. La adăugarea de săruri neutre G-actina se polimerizează reversibil cu formarea de actină F cu structura filiformă, formată din săruri gigantice cu masa moleculară de $1,5 \times 10^6$.

Actina se poate asocia cu miozina, cu formarea complexului actinomiozinic cu masa moleculară de $1,6-3,9 \times 10^6$.

Actina se izolează din reziduu rămas după îndepărtarea miozinei prin extracție la pH neutru sau ușor alcalin când rezultă actina globulară. Actina, împreună cu miozina sunt principalele proteine ale mușchiului, constituind până la 25% din masa musculară [8].

c) **Alte proteine miofibrilare** sunt tropomiozina cu masa moleculară 70000 și molecula formată din două lanțuri polipeptidice înfășurate, posibil de extras cu soluții KCl 1M și troponina I și C, proteine globulare și troponina T de formă liniară, primele cu masa moleculară (împreună) 42000 și cea de a treia 38000. Conectina este o proteină din scheletul celular, insolubilă cu masa moleculară 700000-1000000.

2.1.2. Proteinele sarcoplasmatică

Proteinele sarcoplasmatică, cu excepția mioglobinei, sunt sisteme heterogene cu funcții enzimatică și aparțin clasei albuminelor, au punctul izoelectric între 6 și 7

și masa moleculară 30000-100000.

Compoziția în proteine sarcoplasmice a extractelor realizate cu soluții saline cu $\mu < 0,1$ depinde de viteza și durata omogenizării cu soluția de extracție, pH-ul cărnii și a soluției de extracție, forța centrifugă folosită la separare.

a) **Mioglobina** este o cromoproteină de culoare roșie purpurie cu masa moleculară 16000-17000 cu un singur hem. În medie țesutul muscular conține 1% mioglobină raportat la substanța uscată. Conținutul de mioglobină determină împărțirea țesuturilor musculare în albe și roșii.

Mioglobina este solubilă în apă și poate fi precipitată cu o soluție saturată de sulfat de amoniu. Molecula ei este o catenă polipeptidică de forma unui ghem.

b) **Miogenul** se poate extrage din mușchi cu apă sau soluție NaCl 0,9% și se precipită din extract cu sulfat de amoniu. Prin precipitarea cu sulfat de amoniu se pot separa trei componente cristalizate: miogen A cu masa moleculară 150000 cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la 60% saturare, miogen B cu masa moleculară 81000 la saturație de 80% a sulfatului și miogen C la saturație de 96% a sulfatului. Miogenul A reprezintă 20% din total, miogenul B 80%, iar miogenul C este prezent în cantitate nesemnificativă.

Punctul izoelectric al miogenului este la $\text{pH}=6,00-6,57$ și el coagulează la $55-60^\circ\text{C}$.

c) **Alte proteine sarcoplasmice** sunt *mioalbumina* cu punct izoelectric la $\text{pH}=3-3,5$ și temperatura de coagulare la $45-47^\circ\text{C}$ și care precipită din extractul apos cu sulfat de amoniu la saturație sau cu acetonă, *globulina X*, un sistem heterogen de proteine cu punct izoelectric la $\text{pH} = 5,2$, masa moleculară 160000 și coagulat în soluție la 50°C și care se poate extrage cu apă și se precipită cu alcool metilic sau cu sulfat de amoniu la semisaturație și *enzimele* din sarcoplasmă, în primul rând enzime glicolitice, componentele procentuale cele mai bogate din sarcoplasmă.

2.1.3. Proteinele insolubile

Cantitatea cea mai mare de proteine insolubile în apă sau în soluții saline se găsește în țesuturile conjunctive, dar ele se găsesc și în componența membranelor și în aparatul contractil al musculaturii. Proteinele insolubile cele mai importante sunt *colagenul*, *elastina* și *reticulina*.

a) **Colagenul** constituie aproximativ 5% din cantitatea totală de proteine din musculatura mamiferelor și este constituit din trei lanțuri polipeptidice identice sau diferite care formează împreună un triplu helix.

Colagenul nu este solubil dar se poate gonfla prin hidratare în soluții de acizi sau de săruri și poate fi hidrolizat enzimatic cu formare de tripeptide.

La încălzire are loc o scurtare a firelor de colagen la $1/3-1/4$ din lungimea inițială, însoțită de umflarea lor. Procesul are loc la $60-65^\circ\text{C}$, iar la încălzirea colagenului peste această temperatură are loc ruperea helixului triplu cu formare de gelatină solubilă.

Gelatinizarea se datorează formării unor compuși cu masa moleculară mică și anume *glutine* cu masa moleculară 100000, în proporție de 70-80 % și *gelatoze* cu masa moleculară 10000.

Punctul izoelectric al gelatinei este la $\text{pH} = 8-9$ pentru gelatina obținută prin

procedeul acid și la pH = 4,75-5,20 pentru cea obținută prin procedeul alcalin.

b) *Alte proteine insolubile* sunt *elastina*, foarte rezistentă, cu proprietăți asemănătoare cauciucului, rezistentă la fierbere și *reticulina*, o proteină cu conținut mai mare de sulf decât colagenul, cu conținut de aproximativ 10% lipide, ceea ce îi conferă rezistență la fierbere în apă și la hidroliza acidă.

2.2. Componente neproteice ale țesutului muscular

Substanțele extractive, lipidele, vitaminele și compușii minerali sunt componentele neproteice ale țesutului muscular.

2.2.1. Substanțele extractive

a) Substanțele extractive azotate conțin azotul neproteic din țesut, aproximativ 10-11% din total și sunt următoarele: nucleotide și derivații lor, glutationalul – un tripeptid format din glicină, cisteină și acid glutamic, dipeptidele carnozină și anserină (metilcarnozină), guanidine, aminoacizi liberi, amine alifactice, combinații cuaternare de amoniu, azot amoniacal.

b) Substanțe extractive neazotate și anume acizi organici, în primul rând acidul lactic, hidrați de carbon cu deosebire glicogenul, inozitolul (hexahidroxiciclohexanul).

2.2.2. Lipidele țesutului muscular

Lipidele reprezintă 3-3,5 % din masa țesutului muscular și sunt formate din grăsimi simple, fosfolipide și steroide. Cea mai mare parte din lipidele fibrei musculare sunt legate de proteine, de aceea extracția lor separată este mult îngreunată.

2.2.3. Vitamine și compuși minerali

Țesutul muscular conține un mare număr de vitamine solubile în apă. Astfel, de exemplu, conținutul de vitamine al cărnii de vită, exprimat în mg/kg țesut este tiamină 0,6-1,6, riboflavină 1,0-3,0, amida acidului nicotinic 40,0-120,0, piridoxină, piridoxal și piridoxamină 1,0-4,0, acid pantotenic 4,0-10,0, acid folic 0,1-0,3, biotină 0,05, cobalamină 0,01-0,02.

Conținutul procentual în săruri minerale al mușchiului de vită este: K 0,25-0,40 %; Na 0,07-0,20 %; Mg 0,015-0,035%; Ca 0,005-0,025 %; Fe 0,001- 0,005 %; Zn 0,001-0,008 %; P (ca P₂O₅) 0,30-0,55 %; Cl 0,04-0,10 % [7].

2.2.4. Apa

Apa conținută de țesutul muscular este distribuită între miofibrile (65-70 %), sarcoplasmă (20 %) și spațiul interstițial (20 %) și se găsește fie în stare combinată ca apă de hidratare și apă legată prin forțe dipol-dipol, fie liberă, imobilizată mecanic de rețelele de membrane și filamente din proteine și care se elimină chiar la o presare

2.3. Compoziția unor organe interne și a altor subproduse

În această categorie se iau în considerare limba, inima, ficatul, rinichii, splina, intestinele și stomacul, faringele, creierul, plămânii precum și sângele. Compoziția chimică a unora din ele este redată în tab. 2.1. [7]

Tab. 2.1. Compoziția unor organe interne și a sângelui

Organul	Apă	Proteine	Grăsimi	Hidrați de carbon
Inimă				
Vită	75,5	16,8	6,0	0,56
Porc	76,8	19,9	4,8	0,40
Rinichi				
Vită	76,1	16,6	5,1	
Porc	76,3	16,5	5,2	0,80
Ficat				
Vită	69,9	19,7	3,1	5,90
Porc	71,8	20,1	5,7	1,14
Sânge				
Vită	80,5	17,8	0,13	0,065
Porc	79,2	18,5	0,11	0,06

g/100 g

Sângele reprezintă în medie 5% din greutatea animalului viu (3,3% în cazul porcilor) și se folosește, recoltat fiind de la anumite animale cum este porcul, drept aliment, în special prelucrat în produse de carmangerie.

Plasma sanguină, în care sunt suspendate eritrocitele, leucocitele și trombocitele, conține 7-8 % proteine – albumină, globuline și fibrinogen precum și molecule mici cu conținut de azot – uree, aminoacizi, creatină și creatinină. Serul sanguin care rămâne în urma coagulării conține albumine și globuline.

2.4. Transformări post-sacrificare ale cărnii [7]

După sacrificarea animalului și întreruperea circulației sanguine, structurile vii ale mușchiului continuă să funcționeze un timp, dar după mecanisme modificate.

La întreruperea alimentării cu oxigen, locul fosforilării oxidative a glicogenului este luat de degradarea anaerobă cu formare de acid lactic și ioni de hidrogen.

Se disting trei stadii ale mușchiului post-sacrificare: prerigiditatea, rigiditatea și maturarea. În primul stadiu, imediat după sacrificare, carnea este flexibilă, moale, relaxată, cu capacitate ridicată de reținere a apei care, însă, scade rapid ajungând la o valoare minimă în 24-48 ore.

În timpul rigidității (Rigor mortis) are loc degradarea anaerobă a glicogenului cu scăderea pH-ului de la 7,0-7,1 la 5,6-5,8, producerea de amoniac, formarea complexului actomiozinic și migrarea ionilor de calciu.

În faza de maturare, carnea își îmbunătățește calitățile senzoriale. Maturarea este consecința activității enzimelor proteolitice proprii țesutului muscular și durata ei depinde de temperatură: 12 ore la 25°C, 7 zile la 6°C. În timpul maturării are loc o creștere a conținutului de azot neproteic până la 20-25% din total, ca urmare a proteolizei proteinelor sarcoplasmice.

În timpul maturării se modifică gradul de extractibilitate al proteinelor. Se constată o creștere a cantității de actomiozină extrasă în raport cu minimul care se înregistrează la 24 ore post-sacrificare. Are loc și o micșorare a extractibilității proteinelor sarcoplasmice, pusă pe seama denaturării și agregării lor sub influența pH-ului.

3. PRELUCRAREA CĂRNII, SURSELE, COMPOZIȚIA ȘI EPURAREA APELOR UZATE DE LA PRELUCRAREA CĂRNII

Funcție de tehnologia aplicată, apele uzate rezultă în cantități mai mici sau mai mari și au o compoziție care depinde și de natura materiei prime prelucrate. De aceea, pentru a înțelege modul în care se formează apele uzate, pentru a stabili locurile unde proteinele apar și pentru a stabili punctele de prelevare a apelor uzate este necesară cunoașterea tehnologiei de obținere și prelucrare a cărnii.

3.1. Tehnologia de obținere și prelucrare a cărnii

Obținerea și prelucrarea cărnii, deși diferă funcție de natura animalului prelucrat, are elementele principale comune, de aceea în continuare se prezintă pe scurt obținerea și prelucrarea cărnii de porc, principiile fiind asemănătoare și pentru celelalte tipuri de materie primă [9].

Similar se pune problema și în industrii înrudite cum este de exemplu prelucrarea produselor pescuitului marin [10].

3.1.1. Sacrificarea

Procesul de sacrificare cuprinde ca principale faze spălarea, asomarea electrică adică scoaterea din funcțiune a centrilor nervoși de relație ai animalului, înjunghierea cu recoltarea sângelui în scop alimentar sau farmaceutic, opărirea în bazine cu apă de 60-65 °C, jupuirea, eviscerarea, despizarea carcaselor, spălarea organelor și a carcaselor, tranșarea, dezosatul și alegerea cărnii pe calitate, prelucrarea intestinului subțire și a celui gros.

După tranșare, carnea este trecută la conservarea prin frig.

3.1.2. Fabricarea preparatelor din carne

Sortimentele foarte variate de preparate din carne se pot clasifica în două mari grupe și anume:

- preparate din carne netocată sărate și afumate ori pasteurizate;
- preparate a căror compoziție este tocătură care pot fi pasteurizate, afumate, afumate la cald și pasteurizate; afumate la cald, pasteurizate și afumate la rece; afumate la cald, pasteurizate, afumate la rece, uscate.

Semifabricatele pentru mezeluri sunt pasta obținută prin tocarea mecanică fină a cărnii (brat) și șrotul care se obține prin mărunțirea cărnii la dimensiunea corespunzătoare fiecărui sortiment care urmează să se producă. Batoanele rezultate prin introducerea în membrană a amestecului de semifabricate se afumă și/sau se fierb.

3.1.3. Prelucrarea produselor secundare de abator

Produsele secundare de abator comestibile sunt limba, creierul, ficatul, inima, rinichii, burta, picioarele etc. și prelucrarea lor constă în spălare, curățire și verificare urmată de transformarea în proaspături sau de refrigerare sau congelare. Porțiunile de musculatură netedă, capete etc se prelucrează prin fierbere și transformare în produse proaspete.

Sângele este un subprodus deosebit, cu valoare nutritivă ridicată și multiple utilizări în scopuri alimentare, medicamentoase, tehnice și furajere, de aceea recoltarea lui integrală în condiții igienice se impune. Pentru prelucrarea sângelui există tehnologii puse la punct, constând în principiu din separarea prin centrifugare a plasmei de concentratul eritocitar. La abatoarele mari colectarea sângelui în vederea prelucrării este rezolvată și nu ajung cantități însemnate de sânge în apele uzate.

Aceste faze au produs apele uzate cele mai încărcate cu proteine, cele mai ușor de recoltat în stare proaspătă și fără posibilități de infectare cu germeni patogeni.

3.2. Apele uzate de la abatoare [11,12]

În cursul prelucrării, carnea vine în contact cu apa care antrenează mecanic componente ale ei. Contactul intim al apei cu țesuturile cărnii face ca și procesele de extracție să fie importante, ele fiind favorizate în majoritatea cazurilor de temperatura ridicată, de tăria ionică ridicată și de agitarea puternică.

Apele uzate de la abatoare sunt opalescente datorită materiilor conținute și au tendința de a intra repede în fermentație anaerobă.

Câteva din caracteristicile de calitate importante ale apelor uzate de la abatoare, care se urmăresc curent, folosind metode analitice standardizate, sunt următoarele:

- **pH-ul** - este în general neutru, cu valori între 6,5÷8,0, cu creșteri de până la 12 în perioadele de igienizare cu soluții puternic alcaline.
- **conținutul de materii în suspensie, grosiere, fine și coloidale** - este mare, în jur de 800 mg/l în efluentul general cu modificări sensibile de la abator la abator. Materiile în suspensie sunt de natură organică.
- **Conținutul de substanțe organice** - este caracterizat prin consumul chimic de oxigen determinat cu permanganat (CCO-Mn) sau cu bicromat (CCO-Cr) care are valori mari, în cazul CCO-Cr de aproximativ 2000 mg/l în efluentul general și prin indicatorul consum biochimic de oxigen (CBO₅) care are de asemenea o valoare ridicată, în jur de 900 mg/l, ceea ce indică încărcarea cu substanțe organice ușor degradabile.
- **Conținutul de cloruri** - mult peste nivelul din apa de alimentare se datorește sării folosite în tehnologie și ajunge la aproximativ 300 mg/l în efluentul general, dar în apele de la preparate poate ajunge la 7000 mg/l. Concentrația mare de cloruri are, prin creșterea tăriei ionice, un rol în extracția și prezența proteinelor în apele uzate.

- **Azotul** - este prezent în concentrații mari fiind un indiciu al prezenței proteinelor în apă. Valoarea medie a concentrației azotului este de aproximativ 100 mg/l, dar vârfurile de concentrație și concentrațiile în evacuările unor secții sunt mult mai mari.

- **Grăsimile** - sunt prezente în concentrații care depind de măsura în care se face recuperarea produselor secundare. Concentrația medie în efluentul general este de 350 mg/l, cu valorile maxime înregistrate la secțiile de fierbere și topitorie.

În tab. 3.1. sunt redate câteva valori ale indicatorilor de calitate ai apelor uzate de la abatoare, citate în literatură, iar în tab. 3.2. se găsesc câteva caracteristici ale apelor rezultate în diferite faze de fabricație de la un combinat de prelucrare a cărnii.

Tab. 3.1. Caracteristici de calitate ale apelor uzate brute de la abatoare [11]

INDICATORUL	U.M.	VALOAREA	INDICATORUL	U.M.	VALOAREA
pH		7-7.1	Azot	mg/l	70-2.200
Materii în suspensie	mg/l	500-12.000	Fosfor	mg/l	6-45
CCO-Cr	mg/l	1.200-3.200	Grăsimi	mg/l	300-1.000
CBO ₅	mg/l	500-5.000	Cloruri	mg/l	260-420

Indicatorii specifici, raportați la unitatea de produs (tonă de carne prelucrată) sunt: debitul mediu specific de ape uzate 18 m³/t, cu variații între 9-40 m³/t, încărcarea organică medie 21 kg/t pentru CBO₅ și 41 kg/t pentru CCO-Cr și încărcarea cu suspensii 18 kg/t.

Tab. 3.2. Caracteristici de calitate ai apelor uzate de la faze de fabricație la un combinat de fabricare a conservelor de carne [11]

SURSE DE APĂ UZATĂ	MATERII ÎN SUSPENSIE mg/l	CBO ₅ mg/l	AZOT ORGANIC mg/l
Platforma de sacrificare	320	825	134
Sânge și apă din bazine	3.690	32.000	5.400
Vas de opărire	8.360	4.600	1.290
Tăierea cărnii	610	530	33
Spălarea intestinelor	15.120	13.200	643
Secția mezeluri	560	800	136
Secția slănină untură	180	180	84
Produse secundare	1.380	2.200	186
Spălătorie	4.120	1.300	56

Pentru a se preîntâmpina efectele negative ale evacuării directe în receptorii naturali sau în canalizările orășenești a unor ape cu asemenea încărcări de poluanți, efecte care constau în consumarea rapidă a oxigenului dizolvat, răspândirea unor mirosuri neplăcute, depunerea unor grăsimi pe conducte, apele uzate de la abatoare se supun unor operații de epurare.

O primă etapă a epurării o constituie reținerea preferabil selectivă la ieșirea

apelor din secție a materiilor grosiere și separarea grăsimilor care se și pot valorifica (preepurarea) [13].

Procedeele de epurare aplicate pentru apele de la abatoare sunt principial identice cu cele aplicate pentru majoritatea apelor din industria alimentară [14,15,16].

Epurarea clasică decurge, de obicei, în două trepte și anume, una mecanică de sedimentare gravitațională și una biologică de descompunere aerobă a substanțelor organice cu ajutorul microorganismelor existente în apă. În variante mai noi se epurează ape uzate foarte încărcate într-o treaptă biologică anaerobă [17] care poate fi și sursă de energie [18], epurarea aerobă este combinată cu cea anaerobă [19] și/sau stația de epurare este completată cu treapta de eliminare a azotului rezultat în fazele anterioare [20].

Deși realizat în multe variante, procedeul clasic de epurare nu realizează recuperarea componentelor organice din apele uzate.

3.3. Procedee recuperative moderne de epurare

În ultimii ani au apărut procedee de epurare care recuperează compuși valoroși din apele uzate fără a-i degrada la molecule simple.

Tehnologiile de membrană cum sunt microfiltrarea, ultrafiltrarea, dializa, electro-dializa și osmoza inversă asigură separarea compușilor chimici care constituie impurificatori revalorificabili, greu de separat prin metode clasice de epurare.

Elementul comun al acestor procedee este folosirea unei membrane semitransparente solide, lichide sau gazoase care prezintă o rezistență diferențiată față de transferul constituenților conținuți în fluid [21].

Procedeele care folosesc membrane semipermeabile prezintă o serie de avantaje în raport cu procedeele clasice sau cu alte tehnici de epurare: separare la temperatura ambiantă, fără schimbare de fază, nu se produce acumulare de constituenți în membrană și nu sunt necesare faze de regenerare, posibilitatea recuperării solventului, a apei în cazul nostru și a unor poluanți în vederea revalorificării.

Avantajele procedeelelor cu membrană semipermeabilă au făcut ca ele să fie utilizate și la tratarea apei potabile [10] precum și pentru înlăturarea indicatorilor microbieni [22] din apă.

Tehnologia de membrană este recomandată pentru recuperarea unor componenți proteici din industria agroalimentară și anume din industria laptelui, a cărnii și a conservelor. Astfel, teste de laborator au indicat randamente ridicate de recuperare a proteinelor la epurarea zerurilor rezultate la fabricarea brâneturilor ceea ce a asigurat acoperirea costurilor epurării cu valoarea produsului obținut. Rezultate similare s-au obținut și la recuperarea proteinelor din plasmă sanguină de la abatoare [21].

Procedeele de membrană pot fi folosite și cuplate cu alte metode. Astfel, după precipitarea la punctul izoelectric a unor proteine cu punctele izoelectrice apropiate și flocularea cu baze, proteinele rămase în soluție se pot separa prin micro sau ultrafiltrare. Experimental s-au folosit membrane poliuretanică pentru

deproteinizarea unor soluții diluate de proteine din industria laptelui [4].

Este posibilă și cuplarea metodelor de separare cu membrană cu procedeele de epurare biologică. La scară industrială sistemul se aplică la epurarea unor ape dezuleiate [23]. Studiul privind cuplarea epurării biologice cu procedeele de membrană au fost făcute și cu extracte de carne, dar lucrările respective nu dau și randamente acceptabile [24].

Metoda de filtrare cu membrană, în particular procedeul Crossflow-Filtration este propusă pentru epurarea apelor de la igienizarea din industria laptelui [25].

Apele astfel epurate sunt reutilizabile pentru igienizare dar consumul mare de energie face ca procedeul să fie scump.

Deși prezintă avantaje tehnice importante, procedeele moderne recuperative nu s-au putut extinde pe scară largă din cauza dificultății asigurării la scară industrială a membranelor corespunzătoare și din cauza costurilor energetice de multe ori importante.

3.4. Influența structurii și compoziției cărnii și a procedurilor de prelucrare asupra poluanților din apele uzate

Compoziția chimică a cărnii care se prelucrează și cu care apa vine în contact face ca proteinele să constituie principalul component poluant al apelor uzate, în stare solubilizată, sub formă de suspensii sau de emulsii, alături de lipide și substanțe extractive.

Trecerea proteinelor în soluție se face în funcție de condițiile tehnologice în prezența sau în absența unor săruri, în special clorura de sodiu. Din această cauză, se poate presupune că în apele uzate sunt prezente atât proteinele miofibrilare care se extrag cu soluții saline cu tăria ionică mai mare decât 0,3, cât și proteinele sarcoplasmice care se extrag cu apă sau cu soluții saline diluate, cu tărie ionică mai mică decât 0,1.

În unele faze ale procesului tehnologic de prelucrare a cărnii se lucrează la temperatura camerei, iar în altele la temperatură ridicată, chiar la fierbere, astfel că unele proteine vor ajunge în apele uzate în stare nativă, altele în stare denaturată. De asemenea, pot să fie prezente produse de hidroliză ale proteinelor.

Spectrul de mase moleculare al poluanților va fi deosebit de larg, de la molecule mici, ca ionul amoniu, amine și aminoacizi, la macromolecule cu mase moleculare cuprinse între 16000 (mioglobina) și 340000 (meromiozina) sau chiar 1000000 (conectina). În tabelul 3.4. sunt prezentate unele din principalele caracteristici ale proteinelor din carne. Este de așteptat ca aceste proteine să fie prezente în apele uzate în cantitate care depinde de aportul lor în mușchi.

Apa uzată conține și lipoproteine și fosfoproteine, în schimb sângele apare ca poluant de obicei în cantități mai mici fiind prelucrat chiar în tehnologia curentă în majoritatea abatoarelor mari.

Datorită compoziției cărnii, pe lângă proteine și alți componenți cu azot, apele uzate conțin cantități mai mari sau mai mici de lipide, uneori emulsionate în apă, ceea ce poate să complice prelucrarea probelor de apă recoltate.

Tab. 3.4. Caracteristici ale unor proteine din carne

PROTEINA	EXTRACȚIA	MASA MOLECULARĂ	pH izoelectric	APORT ÎN MUȘCHI
MIOZINA	KCl 0.6 M	≈ 500.000	5,4	29%
ACTINA	KCl 0,3 M + fosfați 0,15 M	46.000	4,7	13%
TROPOMIOZINA	Acetona + eter, apoi KCl 1 M	70.000		3,2%
TROPONINA		42.000		3,2%
CONNECTINA		700.000÷1.000.000		3,7%
MIOMEZINA	Apă	165.000		0,4÷2,0%
MIOALBUMINA			3÷3,5	11%
MIOGEN	NaCl 0,9%	81.000÷150.000	6÷6,7	
TROPOCOLAGEN		30.000		5,2%

4. PROPRIETĂȚI ALE PROTEINELOR CARE POT STA LA BAZA PROCEDEELOR DE SEPARARE DIN APELE UZATE

4.1. Generalități [6,8]

Proteinele, substratul material al tuturor fenomenelor vieții sunt compuși organici naturali macromoleculari, care prin hidroliză totală chimică sau enzimatică eliberează α - aminoacizii componenți.

Proteinele insolubile (scleroproteinele) organismului animal au rolul de a conferi rezistență mecanică. Proteinele solubile apar în celule în stare dizolvată sau sub formă de geluri hidratate. Dintre ele, albuminele sunt solubile în apă și în soluții diluate de electroliți iar globulinele numai în electroliți. Toate proteinele cu însușiri fiziologice specifice – enzimele, hormonii proteici, toxinele, anticorpii, proteinele din serul sanguin, fac parte din clasa globulinelor.

Principalele proprietăți ale proteinelor care intervin și în procesul de separare din apele uzate sunt următoarele:

a) Precipitarea proteinelor poate fi reversibilă sau ireversibilă. Precipitarea reversibilă cu soluții concentrate de electroliți (salifiere) se datorește tendinței puternice a ionilor electrolitului de a se hidrata, apa necesară fiind preluată din sfera de hidratare care înconjoară grupările polare ale proteinei care astfel precipită. Dacă electrolitul se îndepărtează de exemplu prin dializă, proteina se redizolvă. Concentrația salină la care se produce precipitarea variază de la o proteină la alta, ceea ce permite fracționarea cu săruri a unor preparate proteice.

b) Din cauza caracterului lor puternic polar, proteinele nu sunt solubile în solvenți organici. Și această proprietate stă la baza unor metode de izolare și purificare a proteinelor. Solvenți organici utilizabili pentru precipitare sunt de exemplu alcoolul și acetona.

c) Solubilitatea proteinelor este minimă la punctul izoelectric, proprietate care se poate folosi pentru izolarea și purificarea lor.

d) Proteinele pot suferi procesul complex, caracteristic, de denaturare care se manifestă prin modificarea conformației proteinei native, schimbarea activității optice, pierderea activității fiziologice, micșorarea solubilității și modificarea proprietăților fizico-chimice. Agenții care produc denaturarea sunt foarte diferiți:

- energia termică prin atacul asupra legăturilor de hidrogen care determină structura secundară și terțiară a macromoleculei.
- modificarea pH-ului care atacă legăturile ionice.
- potențialul de oxido-reducere care influențează formarea sau scindarea punților disulfurice S-S.
- sărurile metalelor grele (Hg, Ag, Cu, etc) care formează în concentrații mici, în mod ireversibil, complecși greu dissociabili cu proteinele.

- substanțe organice ca ureea, salicilatul de sodiu, detergenții, alcoolul etilic care în soluții concentrate provoacă solvatarea unor grupe funcționale, concomitent cu desfacerea unor legături de hidrogen.
- radiațiile X, radiațiile ultraviolete și lumina vizibilă.

4.2. Separarea și fracționarea proteinelor[26,27,28,29,30,31,32]

Metodele de separare a proteinelor se bazează pe diferențele de dimensiune ale moleculelor, pe diferențele de sarcină electrică, de solubilitate, de absorbție pe diferite suporturi cromatografice ori pe proprietățile chimice sau biologice ale moleculelor studiate. Ca și în cazul altor materiale de origine biologică și în cazul proteinelor se impune adesea ca în procesul de separare și de investigare moleculele să fie afectate în cât mai mică măsură astfel încât proprietățile lor să nu sufere modificări semnificative.

Separarea proteinelor insolubile de compușii care le însoțesc în organismele animale se poate realiza relativ ușor, dar purificarea lor este dificilă deoarece este legată de dizolvare.

La separarea proteinelor solubile trebuie să se țină cont de marea lor sensibilitate la agenții care produc denaturarea. Pentru evitarea denaturării, operațiile de izolare și purificare se efectuează de regulă la temperatură cât mai scăzută, într-un timp cât mai scurt. În cazul proteinelor din apele uzate de la abatoare aceasta este o problemă mai puțin acută pentru că proteinele rezultă din tehnologie în bună parte în stare denaturată prin fierbere.

Cele mai folosite metode de separare și fracționare a proteinelor sunt redate în continuare.

4.2.1. Dializa[32]

Dializa, separarea moleculelor mari de cele mici cu ajutorul unei membrane semipermeabile care permite trecerea doar a moleculelor cu masă moleculară mică, este o metodă care se poate utiliza pentru a îndepărta moleculele mici neproteice dintr-un extract proteic. Procedul se aplică numai sistemelor care conțin un singur component proteic sau două componente legate strâns una de cealaltă.

Aplicarea dializei la un preparat care conține și o parte prostetică, de exemplu coenzimă în cazul unei enzime, poate duce la dezafectarea compusului prin dializarea în mediul exterior a cofactorului legat de proteină.

Moleculele mici trec prin membrana semipermeabilă în lichidul exterior până la atingerea echilibrului. Dacă dializa se face față de un fluid curgător sau dacă solventul se schimbă repetat, este posibilă îndepărtarea totală a moleculelor mici din moleculă.

Cel mai utilizat material semipermeabil pentru dializă este celofanul.

Membranele de celofan sunt permeabile pentru moleculele cu masa sub 30.000, dar această limită variază în funcție de modul în care membranele au fost pretratate. Pretratarea se face pentru îndepărtarea din membrană a urmelor de sulf, de ioni metalici și chiar de enzime și se poate realiza prin tratarea la fierbere pe baie de

apă cu o soluție alcalină de EDTA timp de 30 de minute.

Viteza procesului de dializă crește cu temperatura dar, din motive de protecție a activității biologice separarea prin dializă se realizează adesea la 4°C.

Viteza de dializă depinde și de solvent, cea mai mică viteză de dializă înregistrându-se față de apa distilată. Pentru stabilizarea moleculelor este însă necesar să se lucreze cu soluții apoase cu pH-ul și tăria ionică definite.

Un fenomen de care trebuie să se țină cont este acela că în timpul dializei, datorită proceselor de osmoză, apa intră în sacul de dializă. Pentru a nu se provoca diluarea excesivă a conținutului sacului, acesta trebuie umplut suficient de la început.

În cursul separării unei soluții proteice de o soluție salină prin dializă, moleculele mari de proteină purtătoare de sarcină electrică nu pot trece prin membrană iar ionii care trec prin membrană se distribuie inegal pe cele două părți ale barierei, ducând la apariția unei diferențe de potențial între cele două fețe ale membranei. Astfel, dacă dializa este realizată față de apă distilată apar modificări de pH. Pentru a evita acest dezavantaj, dializa se poate efectua față de soluții saline mai concentrate decât 0,1M.

4.2.2. Precipitarea

Proteinele pot precipita reversibil sau ireversibil sub acțiunea unor agenți chimici cum sunt acizii, sărurile, solvenții organici sau agenții fizici cum este căldura.

a) Precipitarea la pH izoelectric [32]

Precipitarea la pH izoelectric se bazează pe comportarea acido-bazică a proteinelor și anume pe faptul că la pH izoelectric sarcina electrică globală a moleculei de proteină este nulă, solubilitatea minimă și deci ea precipită din soluție.

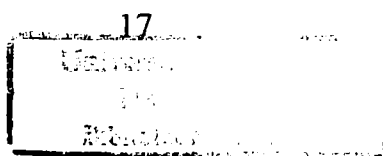
pH-ul izoelectric este o valoare caracteristică pentru proteină și este determinat de numărul de grupări ionizabile din moleculă și de valoarea exponentului de aciditate pentru fiecare din ele. Proteinele globulare, de exemplu, au în soluție grupări ionizabile orientate spre exterior care formează o suprafață polară hidrofilă. Aceasta conține un număr diferit de grupări ionizabile și o distribuție diferită de la o proteină la alta a sarcinilor electrice pe suprafața globului proteic, ceea ce se manifestă ca un anumit pH izoelectric.

Deoarece diferitele proteine dintr-un amestec au puncte izoelectrice diferite, ele pot fi separate unele de altele prin aducerea pH-ului amestecului la punctul izoelectric al proteinei de separat.

Curbele de titrare și pH-ul izoelectric se pot modifica substanțial în prezența sărurilor neutre care influențează gradul de ionizare al diferitelor grupări ale catenelor laterale.

b) Precipitarea cu solvenți organici [32]

Precipitarea proteinelor de către solvenții organici se explică prin înlocuirea apei cu constanta dielectrică mare care face ca sarcinile opuse ale moleculelor de



633.074.
369B

proteine să aibă un efect mic de atracție reciprocă cu solvenții cu constante dielectrice mici, ceea ce determină ca forțele de atracție dintre moleculele de proteine să crească și ele să formeze un precipitat.

Acțiunea precipitantă a solvenților se explică și prin efectul deshidratant asupra moleculelor proteice. Moleculele de apă care hidratează macromoleculele proteice prin interacții ion-dipol interacționează și sunt atrase de moleculele solventului organic introdus în amestec. Din cauză că interacțiunea moleculelor solventului cu apa este exotermă, precipitarea se efectuează la temperaturi scăzute, sub 0°C. Precipitarea la temperatură scăzută mai prezintă avantajul că astfel scade solubilitatea proteinei ceea ce permite utilizarea unei cantități mai mici de solvent. De asemenea, scade acțiunea denaturantă a solvenților asupra majorității proteinelor.

Pentru a fi folosiți la precipitarea proteinelor, solvenții trebuie să aibă constanta dielectrică D mică, o bună miscibilitate cu apa și o acțiune denaturantă cât mai scăzută. Aceste condiții sunt îndeplinite cel mai bine de etanol ($D = 25,0$), metanol ($D = 32,0$), eter ($D = 4,1$), dar se mai folosesc și acetona ($D = 20,7$), benzenul ($D = 2,3$), hexanul ($D = 1,9$).

Într-un amestec de proteine care au distribuția sarcinilor electrice la suprafața moleculelor diferită, forța de atracție limită care produce precipitarea este atinsă la diferite concentrații ale solventului, ceea ce permite precipitarea fracționată. Prin creșterea concentrației unui anumit solvent are loc precipitarea succesivă a proteinelor din amestec, fiind astfel posibilă separarea lor.

c) Precipitarea cu ajutorul unor electroliți [26,27,32]

Solubilitatea unei proteine crește cu creșterea concentrației unei sări neutre prezente în mediu (fenomenul numit "salting-in"), atinge o valoare maximă, după care scade treptat până când, la concentrații saline mari, precipită din soluție prin fenomenul numit salifiere (sau "salting-out" ori precipitare salină). Fiecare proteină, în funcție de structura ei, precipită la o anumită concentrație a unei sări, ceea ce face teoretic posibilă precipitarea fracționată și separarea pe această cale a proteinelor dintr-un amestec.

Precipitarea proteinelor prin salifiere se datorează neutralizării sarcinilor electrice ale particulelor de proteină de către ionii electrolitului adăugat în soluție și deshidratării proteinelor de către ionii puternic hidratați ai electrolitului adăugat în exces.

Precipitatul format prin salifiere se redizolvă prin diluare cu apă. Procesul este reversibil, semn că structura terțiară a moleculei nu a fost alterată.

Între solubilitatea S a unei proteine și tăria ionică a unei soluții saline concentrate prezente în mediu există relația:

$$\log S = \beta - K_S \mu \quad (4.1)$$

unde:

- S este solubilitatea proteinei în prezența electrolitului
- μ este tăria ionică a electrolitului
- K_S este constanta de salifiere
- β este ordonata la origine a dreptei care reprezintă ecuația.

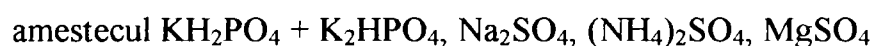
Dacă relația 4.1 este reprezentată grafic, pentru aceeași proteină și aceeași sare, la pH-uri și temperaturi diferite, se obține o familie de drepte paralele. Din această cauză, în timpul precipitării fracționate pH-ul și temperatura trebuie menținute constante.

Dependența solubilității proteinei supuse precipitării prin salifiere de temperatură și pH are consecințe practice. Astfel, la o tărie constantă a electrolitului, solubilitatea proteinei este minimă la pH-ul izoelectric. În soluții saline diluate proteinele sunt mai solubile la 20-30°C decât la 0°C, dar în soluții concentrate fenomenul este inversat.

Electrolizii folosiți la salifiere trebuie să îndeplinească o serie de condiții și anume:

- să aibă o mare solubilitate care să permită obținerea unei game mari de concentrații.
- dizolvarea electrolitului în apă să nu producă modificarea pH-ului amestecului.
- dizolvarea să nu ducă la procese exoterme.
- să nu reacționeze chimic cu proteina de separat.
- să fie ușor de îndepărtat din precipitatul proteic.

Aceste condiții sunt îndeplinite de sărurile cuprinse în seria Hofmeister care permite alegerea electrolitului potrivit pentru salifiere:



Ordinea în seria Hofmeister este aceea descrescătoare a valorilor parametrului K_S din formula 4.1 care descrie procesul de salifiere.

Cel mai utilizat agent de precipitare fracționată este sulfatul de amoniu, o sare foarte solubilă (70,6 mg la 100 ml la 0°C), cu efect protector asupra multor proteine, inclusiv asupra enzimelor. Utilizarea sulfatului de amoniu are și dezavantaje și anume că necesită un control de pH fiind sarea unui acid tare cu o bază slabă, că solubilitatea sării este determinată de temperatură și că poate produce interferență în cursul dozărilor cantitative ale proteinelor.

Sulfatul de sodiu are o acțiune de salifiere mai puternică decât sulfatul de amoniu la aceeași tărie ionică, dar prezintă dezavantajul că are o solubilitate mai mică.

Sulfatul poate fi adăugat pentru salifiere fie sub forma unei soluții saturate, fie în stare solidă. Pentru a nu mări volumul preparatelor, se preferă precipitarea fracționată cu sare solidă.

Concentrația în sulfat a soluției de proteină supuse salifierii se exprimă uzual în procente de saturație. Cantitatea de sare solidă necesară pentru realizarea unei anumite saturații se extrage de obicei din tabele sau nomograme (nomogramă Dixon) [32].

Deși o proteină nu precipită practic într-un domeniu îngust, strict limitat al concentrațiilor de sulfat de amoniu, ea regăsindu-se de regulă în mai multe fracții, separarea fracționată este totuși posibilă deoarece o anumită proteină precipită preponderent la o concentrație a sării. Astfel, globulinele, proteine cu molecule mari,

sunt mai ușor precipitate decât albuminele care au molecule mai mici. Globulinele pot fi separate prin salifiere în trei fracțiuni, α , β și γ , care precipită în stare mai mult sau mai puțin unitară când concentrația sulfatului de amoniu în soluție ajunge la 1,34, 1,64 și respectiv 2,05 mol/l. Albuminele precipită când concentrația este de 2,57 mol/l.

Sărurile metalelor grele ca AgNO_3 , CuSO_4 , HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ produc precipitarea ireversibilă a proteinelor prin neutralizarea în mediu alcalin a sarcinilor negative de la suprafața moleculei proteinei de către cationii mari de metale grele.

Precipitatele formate cu săruri de plumb și de cupru se dizolvă în exces de reactiv ca urmare a peptizării precipitatelor gel coloidale de către ionii care sunt absorbiți de particulele care primesc o sarcină pozitivă stabilizantă.

Pe lângă săruri și alți electroliți acționează asupra proteinelor. Dar acizii minerali concentrați și unii acizi organici denaturează ireversibil molecula proteică.

La tratarea soluției apoase a unei proteine cu acizi minerali concentrați cu heteropoliacizi (acid fosfomolibdenic, acid fosfowolframic) sau cu acizi organici (acid acetic, acid tricloracetic), se formează precipitate. Precipitarea se datorește faptului că sarcina pozitivă a proteinei care are structură cationică în mediu acid este neutralizată de anionii voluminoși dar și faptului că are loc denaturarea la valori extrem de acide ale mediului de reacție.

Alcaliile acționează diferit asupra proteinelor. Astfel, alcaliile concentrate la fierbere produc descompunerea proteinei cu degajare de amoniac și cu posibilitatea de punere în evidență în soluție a sulfului conținut inițial de proteină cu ajutorul acetatului de plumb. Reacția nu are rol în separarea și fracționarea proteinelor, dar are aplicații analitice.

d) Termoprecipitarea [27]

Majoritatea proteinelor se denaturează ireversibil la încălzire când se produce precipitarea sub formă de turbureală, flocoane sau cheaguri. Coagularea decurge cel mai ușor în apropierea punctului izoelectric. Adăugarea de săruri anorganice neutre ușurează și accelerează coagularea proteinelor prin fierbere.

În domeniul 0 – 40°C majoritatea proteinelor prezintă o creștere a solubilității cu temperatura, dar la peste 40°C ele devin instabile și încep să se denatureze, precipitând ireversibil din soluție.

Metoda termoprecipitării se aplică pentru izolarea enzimelor termostabile prin precipitarea celorlalte proteine denaturate.

4.2.3. Fraționarea prin tehnici cromatografice [33]

a) Cromatografia de adsorbție [27]

Proteinele pot fi adsorbite pe diverși adsorbanti și apoi eluate prin spălare cu solvenți. Separarea depinde de echilibrul care se stabilește la interfața solid-soluție și de solubilitatea în lichidul de eluție a componentelor de separat.

Drept materiale adsorbante se pot folosi substanțe nepolare cum este cărbunele activ sau substanțe polare cum sunt silicagelul, gelul de fosfat de calciu sau gelul de alumină. Forțele care leagă proteinele de adsorbant sunt predominant forțe Van der Waals în cazul adsorbanților nepolari și atracții ionice și legături de hidrogen în cazul adsorbanților polari.

Masa de solut m adsorbită pe unitatea de masă de adsorbant depinde de concentrația solutului C și este dată de izoterma de adsorbție a lui Langmuir:

$$m = \frac{K_1 K_2 C}{1 + K_2 C} \quad (4.2)$$

unde:

- K_1 este numărul de situri de adsorbție activă pe unitatea de masă a adsorbantului și depinde de natura chimică a acestuia.
- K_2 este măsura afinității solutului pentru adsorbant și este funcție de componentele sistemului.

Adsorbații pot fi utilizați sub forma unor coloane cromatografice sau prin amestecare directă cu proteinele de separat.

Componentele unui amestec adsorbite mai puternic pe colană sunt mai dificil de eluat și apar mai târziu în lichidul de spălare. Pozițiile pe colană a componentelor sunt funcție de energia liberă de adsorbție.

În cazul amestecării directe a adsorbantului cu amestecul de separat, este recomandabil ca soluția proteică să fie diluată până la o concentrație de sub 1% pentru a minimaliza interacțiunile proteină-proteină și a favoriza adsorbția selectivă.

Raportul adsorbant-amestec de separat este de $0,1 \div 2$ funcție de natura proteinei. Fraționarea se realizează prin adsorbția proteinei cercetate, evacuarea celorlalte componente cu supernatantul și eluarea produsului adsorbit cu jet de apă distilată sau soluții tampon, dar există și cazuri inverse când compusul cercetat rămâne neadsorbit iar adsorbantul reține impuritățile și proteinele nedorite.

b) Cromatografia de afinitate [27,33,34]

Cromatografia de afinitate este o metodă în care separarea se realizează prin forțe de interacțiune specifică. Această tehnică este utilizată ca metodă de purificare a macromoleculelor prin legăturile lor biospecifice.

În principiu, metoda constă în atașarea unui ligand printr-o legătură covalentă la o matrice purtătoare, insolubilă în apă și acesta absoarbe dintr-un amestec numai componentii care prezintă o afinitate specifică pentru ligand. Separarea unei proteine din amestec prin cromatografie de afinitate se bazează pe capacitatea ei de a lega specific o moleculă de ligand.

Drept material inert se folosesc agaroză perlată, sticla poroasă, celuloza, poliacrilamida.

Natura chimică a liganzilor depinde de proteina care urmează să fie separată.

Afinitatea pentru stratul cromatografic trebuie să facă posibilă reținerea

selectivă dar trebuie să fie și suficient de slabă pentru a permite eluarea fără procese de denaturare.

Între matricea inertă și ligand se plasează de obicei o grupare de spațiere ("spacer group") cu rolul ca, prin distanțarea celor două părți, să reducă interferențele sterice.

c) Cromatografia prin schimb ionic [33,35]

Separarea unui amestec de proteine este posibilă, datorită caracteristicilor lor acido-bazice, prin legarea la un schimbător de ioni urmată de eluarea treptată. Între sarcinile electrice ale schimbătorilor din coloană și cele de semn contrar ale proteinelor se stabilesc legături electrostatice, dar intervin și interacțiuni de tip polar și Van der Waals. Aceste legături pot fi desfăcute și proteinele pot fi eluate de pe coloană cu ajutorul unor ioni competitivi cu o afinitate mai mare pentru schimbătorul de ioni.

O bună separare se realizează dacă proteinele din amestec au sarcini electrice și distribuția lor pe suprafața moleculei diferite.

Creșterea concentrației ionului competitiv intensifică desfacerea legăturilor electrostatice dintre proteine și schimbător iar modificarea pH-ului poate provoca modificarea numărului și distribuției sarcinilor electrice ale moleculei proteice. În consecință eluția proteinelor adsorbite se poate face în gradient de concentrație sau în gradient de pH.

Pentru separarea proteinelor se pot folosi schimbători de ioni anorganici, aluminosilicați drept cationiți și hidroxizi de Fe, Al, Zn, Th, Ti sau Zn drept anioniți și rășini anorganice de schimbători. Cei mai utilizați pentru studiul proteinelor sunt schimbătorii celulozici care au incorporate în molecula celulozei grupări ionizabile $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_2$, etc. Matricea lor prezintă o slabă densitate de sarcină care permite eluția moleculelor mari de proteine în condiții relativ blânde. Și schimbătorii de ioni pe bază de dextransi și poli(acrilamidă care rezultă prin grefarea de grupări ionizabile pe matricile insolubile ale gelurilor pot fi folosiți pentru fracționarea proteinelor.

Derivați sintetici ai celulozei, folosiți pentru cromatografia proteinelor sunt de exemplu dietilaminoetilceluloza (DEAE-celuloza, schimbător anionic) cu grupări $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ și carboximetilceluloza (CM-celuloza, schimbător cationic) cu grupări $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.

Separarea amestecurilor și eluarea succesivă a componentelor individuale de pe coloana DEAE-celuloză se face prin trecerea peste coloană a unei serii de tamponi de pH descrescător (gradient de pH) sau a unei serii de soluții saline de tărie ionică crescătoare (gradient de concentrație). Compoziția soluției eluate poate să se modifice gradat sau continuu (gradient de eluție).

Pentru eluarea anioniților sunt recomandate tamponii cationici cu pH-ul cu aproximativ o unitate peste punctul izoelectric al proteinei iar pentru eluarea cationiților tamponii anionici fosfat-acetat cu pH-ul cu o unitate de pH sub punctul izoelectric. Tăria ionică și pH-ul soluției tampon cu care se face eluția se aleg astfel încât proteina de izolat să fie inițial puternic sorbită în stratul cromatografic. La alegerea pH-ului tamponului se ține seama de domeniul în care proteina este stabilă

și de pH-ul izoelectric. Fig. 4.1 indică valorile de pH la care o proteină cu $pH_i = 5,2$ se leagă la un cationit sau la un anionit.

PUNCT IZOELECTRIC

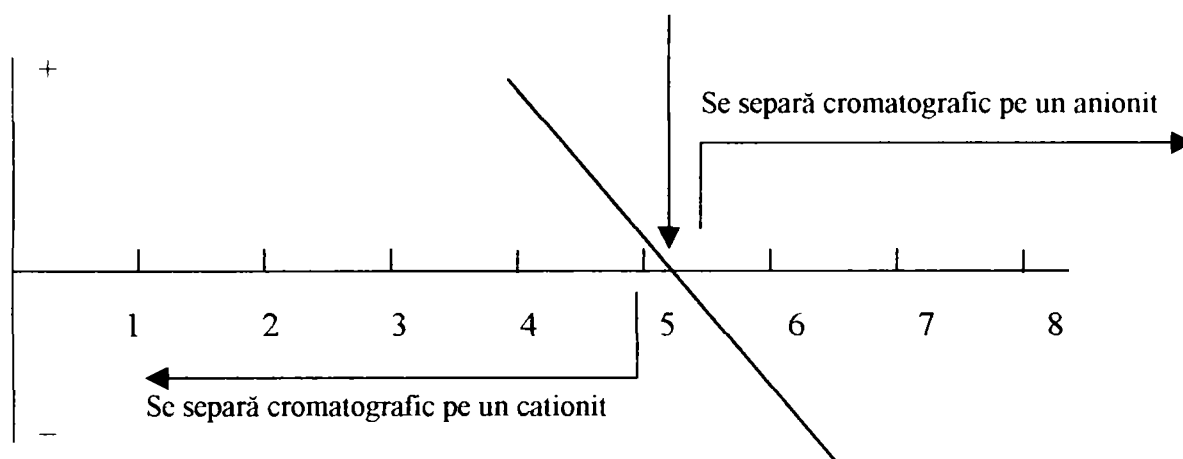


Fig.4.1 Sarcina globală a unei proteine în funcție de pH

Există și metode care combină principiul schimbului ionic cu cel de excludere moleculară. Grupările ionice care se atașează la grupările hidroxil ale resturilor de glucoză din Sephadex G25 și G50 sunt aceleași ca în cazul schimbătorilor celulozici, rezultând anioniți (ca DEAE –Sephadex) și cationiți (ca CM-Sephadex).

d) Fraționarea proteinelor prin cromatografie pe gel permeabil (cromatografie de excludere moleculară) [31,36,37,38,39,40,41]

Gelcromatografia este un tip de cromatografie de partiție în care substanțele din amestecul de separat migrează cu viteze diferite funcție de efectul repartizării lor între faza lichidă și faza staționară printr-un strat cromatografic care constă dintr-un gel cu structură macromoleculară tridimensională insolubilă, îmbibat cu același solvent cu care se efectuează eluarea stratului cromatografic. Coeficientul de partiție între faza gel și faza lichidă depinde exclusiv de efecte sterice: moleculele mici pătrund în ochiurile rețelei tridimensionale a gelului și sunt distribuite între lichidul liber și lichidul care îmbibă gelul, în timp ce moleculele mai mari care au mai puțin acces în spațiul gelului sunt excluse. Ele rămân în volumul de excludere al coloanei, definit ca volumul fazei apoase din afara stratului de gel și prezintă viteze de eluție mai mari, părăsind matricea gelului.

Stratul cromatografic este caracterizat prin geometria stratului și prin viteza de eluție.

Geometria stratului se referă la înălțimea și diametrul acestuia, dar, din cauza imperfecțiunii coloanelor este recomandabilă și determinarea experimentală a volumului stratului cromatografic V_t . Se mai definește volumul spațiului gol V_0 ca volumul de lichid din spațiul interstițial dintre granulele gelului care se determină experimental prin măsurarea volumului de eluție a unei substanțe care nu este reținută pe materialul stratului cromatografic. Volumul gelului V_x din strat este :

$$V_x = V_t - V_o \quad (4.3)$$

Volumul lichidului din interiorul particulelor de gel, numit volum interior V_i este diferența dintre volumul gelului și volumul parțial al matricei gelului:

$$V_i = V_x - V_g = m_g W_r \quad (4.4)$$

Unde :

- V_g este volumul parțial al matricei gelului
- m_g este masa matricei gelului
- W_r ("water regain") este capacitatea de reținere a apei de către materialul uscat care prin îmbibare dă naștere gelului.

Pentru gelurile pe bază de dextran și pe bază de poliacrilamidă există o strânsă corelare între W_r și proprietățile de fracționare ale acestora. O valoare W_r mică indică un domeniu de fracționare a substanțelor cu mase moleculare mici iar o valoare mare indică posibilitatea separării moleculelor foarte mari.

Eluția stratului cromatografic este caracterizată prin viteza de curgere exprimată uzual în ml eluant/min sau ml eluant/oră. Un parametru utilizat pentru a caracteriza solutul este volumul de eluție V_e care este necesar pentru a transporta moleculele unei anumite substanțe prin coloana cromatografică. Pentru caracterizarea comportării cromatografice a unei substanțe se mai folosesc parametri ca volumul relativ de eluție V_e/V_o și constanta de retenție V_e/V_i .

Între volumul de eluție al unui solut și coeficientul de partiție K între faza staționară și faza mobilă există relația:

$$V_e = V_o + K V_s \quad (4.5)$$

unde V_s este volumul stării staționare.

Coeficientul de partiție se poate exprima în două moduri și anume considerând întreaga fază gel ca fază staționară:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / V_x \quad (4.6)$$

Sau considerând numai lichidul care îmbibă gelul ca fază staționară:

$$K_d = (V_e - V_o) / V_i \quad (4.7)$$

Pentru fiecare tip de gel există un domeniu al maselor moleculare al substanțelor care se pot separa (ca proteine globulare sau polizaharide), corespunzător limitelor coeficientului de partiție:

$$K_{av} = 1 \quad (V_e = V_i) \quad \text{și} \quad K_{av} = 0 \quad (V_e = V_o) \quad (4.8)$$

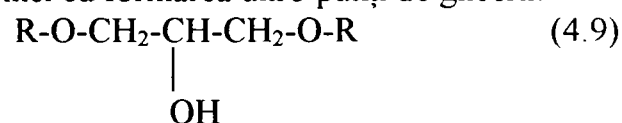
Masa moleculară a substanței eluate cu un volum egal cu volumul spațiului gol al stratului cromatografic reprezintă limita de ecluziune a gelului.

Mărimea particulelor de gel influențează gradul de dispersie a zonelor separate, puterea de rezoluție și vitezele de eluție.

Pentru a fi utilizat în cromatografie, un gel trebuie să îndeplinească un număr de condiții și anume inerția chimică a matricei, stabilitatea fizico-chimică a gelului, conținutul mic de grupări ionice pentru a evita efectele de schimb ionic, posibilitatea obținerii unei game largi de gel cu aceeași constituție chimică pentru a acoperi diferite domenii de fracționare, mărimea particulelor și distribuția lor pe mărimi riguros controlate, rigiditatea granulelor gelului astfel ca stratul cromatografic să nu se compacteze.

Materialele folosite ca straturi gel cromatografice sunt cele pe bază de dextran, de poliacrilamidă și de agar-agaroză.

Dextranul este un polizaharid sintetizat microbiologic din zaharoză cu ajutorul microorganismului *Leuconostoc mesenteroides*. Structura spațială a dextranului este asigurată prin legarea de cele trei grupări hidroxil ale resturilor de glucoză a epichelorhidrinei cu formarea unor punți de gliceril:



unde R reprezintă fragmente ale catenelor polizaharidului.

Dextranul nativ are masa moleculară de până la 10^6 și are în moleculă 90-95% legături α -1,6-glucozidice și 5-10% legături α -1,3-glucozidice. Dextranul este un produs ușor solubil în apă dar compusul înrețelat cu epichelorhidrină, cu structură tridimensională, este insolubil în apă. În soluții apoase rețeaua tridimensională se gonflează reținând lichidul în ochiurile rețelei. Gradul de umflare este determinat de gradul de înrețelare (% epichelorhidrină).

Dextranul nativ se folosește pentru sinteze de geluri cu $W_r = 20$ iar pentru obținerea de geluri cu $W_r = 2 \div 5$ se utilizează un dextran cu masa moleculară 30.000 ÷ 50.000 obținut prin hidroliza parțială a dextranului nativ.

Firma producătoare, Pharmacia Fine Chemicals Uppsala Suedia livrează acest produs sub numele comercial de Sephadex în diferite tipuri, de la G10 la G200, care se deosebesc prin gradul lor de înrețelare și proprietățile de îmbibare.

Gelurile pe bază de acrilamidă Bio-Gel se obțin prin copolimerizarea acrilamidei $\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH}_2$ cu metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH-CH}_2\text{-NH-CO-CH}=\text{CH}_2$

Prin modificarea raportului monomer-comonomer se pot obține geluri cu capacități de îmbibare diferite, livrate de firma Bio-Rad în 10 tipuri simbolizate P2 ÷ P300, cifrele indicând limita de ecluziune pentru peptide și proteine globulare, multiplicată cu 1000.

Bio-Gelul prezintă proprietăți cromatografice și de îmbibare similare cu cele ale Sephadex-ului și matricea sa este extrem de stabilă în domeniul de $\text{pH} = 2 \div 11$.

Agarul este un amestec de polizaharide lineare, obținut din diferite specii de alge marine, compus în principal din D-galactoză și 3,6-anhidro-L-galactoză. Agarul poate fi fracționat în două componente: agarpectina care cuprinde grupările încărcate electric și agaroză, componenta neîncărcată electric. Macromoleculele gelului de agar sunt ținute asamblate prin legături de hidrogen, spațiile libere fiind cuprinse în microcristalite.

Cu ajutorul agarului ca material cromatografic se fracționează molecule cu mase moleculare foarte mari. Un avantaj al acestui gel îl constituie stabilitatea mecanică deosebită dar prezintă dezavantajul că are un număr mare de grupări

încărcate electric, ceea ce conduce la apariția efectelor de schimb ionic. Spre deosebire de Sephadex și Bio-Gel, agarul și agaroză nu pot fi uscate și apoi reîmbibate.

4.3. Metode de determinare cantitativă a proteinelor [42,43]

Analiza conținutului de substanțe organice din ape și a elementelor care rezultă prin degradarea lor (azot, fosfor) are o literatură bogată [44,45,46,47], existând și un număr de analize curente standardizate care dau o imagine asupra încărcării organice a apelor uzate, dar nu și asupra încărcării cu proteine (determinarea indicatorilor consum chimic și consum biochimic de oxigen, determinarea azotului total etc).

Analiza cantitativă a proteinelor se face prin metode chimice și prin metode fizico-chimice, existând tendința, în ultimii ani, de folosire combinată a două sau mai multe tehnici spectroscopice complementare pentru caracterizarea conformațională și structurală a proteinelor și peptidelor cercetate.

4.3.1. Dozarea proteinelor prin mineralizare și determinarea azotului organic [48]

Determinarea constă în mineralizarea probei organice și transformarea ei într-un compus anorganic în care azotul se găsește de obicei sub formă de săruri de amoniu. Mineralizarea se face de regulă cu acid sulfuric în prezența unor catalizatori ioni metalici (Se^{3+} , Cu^{2+} , Hg^+ , etc) și a unor săruri de metale alcaline cu rol de a crește punctul de fierbere al soluției [49,50]. O mineralizare rapidă se poate face cu acid sulfuric și perhidrol [43].

Metoda de mineralizare și determinare a azotului organic se aplică în mai multe variante:

a) Determinarea azotului prin metoda Kjeldahl se bazează pe eliminarea cu ajutorul hidroxidului de sodiu a azotului adus în forma amoniacală așa cum s-a descris mai sus, captarea amoniacului într-o soluție de acid sulfuric sau boric și titrarea excesului de acid cu hidroxid de sodiu.

Dacă metoda se aplică pentru determinarea azotului organic din apă, într-o primă etapă se îndepărtează amoniul prezent în apă prin aducerea pH-ului la 7,1 și fierbere, după care urmează mineralizarea și determinarea amoniului rezultat ca mai sus.

În cazul în care se determină proteinele dintr-un amestec cu substanțe cu azot neproteic, proteinele se pot precipita cu săruri ale unor metale grele cum este sulfatul de cupru în mediu alcalin, se separă prin filtrare și se determină azotul din precipitat prin metoda Kjeldahl.

b) Determinarea azotului prin metoda Parnas-Wagner care se aplică la probe mineralizate cu conținut mic de azot constă dintr-o microdistilare a unei cote din soluție, amoniacul fiind antrenat cu vapori de apă și determinat spectrofotometric sau prin titrare [51].

4.3.2. Determinarea cantitativă a proteinelor prin absorbție caracteristică în UV [43,52]

Soluțiile de proteine prezintă în general un maxim caracteristic de absorbție la 260 și 280nm, datorită resturilor de triptofan și tirozină din moleculă. Determinarea poate fi deranjată de prezența în extractele proteice a unor compuși cum sunt de exemplu acizii nucleici. Influența acizilor nucleici poate fi luată în calcul cu ajutorul unui factor de corecție stabilit în funcție de coeficienții de extincție la cele două lungimi de undă [53].

Metoda de determinare în U.V. a conținutului de proteine este extinsă în domeniul alimentar, al lichidelor organismului viu și în soluții apoase, existând indicații că în aceste cazuri domeniul de lucru general este cuprins între 185-260nm, lucrând la două lungimi de undă [43].

4.3.3. Dozarea proteinelor totale prin metoda Gornall (metoda biuretului) [48]

Metoda Gornall se bazează pe formarea complexului cupru-proteină care prezintă un maxim de absorbție în domeniul vizibil al spectrului, la 540nm, cu intensitatea proporțională cu conținutul de proteină al probei analizate. Complexul cupru-proteină ia naștere la adăugarea unei cantități mici dintr-o soluție diluată de sulfat de cupru la o soluție diluată de proteină sau de peptidă și are o colorație violetă. Reacția este specifică pentru proteine, polipeptide și peptide. Ureea, amoniacul și alți compuși azotați nu interferează [48,53].

Rezultatele obținute prin metoda Gornall sunt reproductibile și în acord cu metoda Kjeldahl. Metoda este aplicată curent la determinarea proteinelor din serul sanguin, într-un domeniu de concentrație de 82-100g/dm³, dar este și o metodă simplă de determinare a conținutului de proteine din alimente [54,55].

Metoda biuretului se folosește și în determinări mult mai fine, cum este determinarea conținutului de proteine în salivă, un domeniu de concentrație de 0,74-65,5mg/dm³, în care metoda s-a dovedit a fi de cea mai mare acuratețe, în concordanță cu determinările de aminoacizi [56,57].

Studii comparative ale metodei micro-biuretului, ale metodei Lowry și ale metodei micro-Kjeldahl în cazul dozării proteinelor din fructe, au arătat că cea mai adecvată metodă în acest caz este aceea a microbiuretului, aplicată după o pretratare a extractelor cu acid tricloracetic. Tratarea cu acid tricloracetic premergător aplicării metodei biuretului este o metodă mai larg recomandată pentru evitarea interferențelor [53, 58].

Metoda Gornall prezintă dezavantajul, din punct de vedere al prezentei lucrări, că prezența sărurilor de amoniu scade sensibilitatea reacției.

4.3.4. Dozarea proteinelor totale prin metoda Lowry

Metoda Lowry se bazează pe reducerea reactivului fosfomolibdenwolframic (reaciv Folin-Ciocalteu) de către tirozina și triptofanul din proteină, în paralel cu formarea complexului cupric al proteinei în soluție alcalină diluată. Densitatea optică

se citește la 660nm [53,59]. Metoda se aplică pentru determinarea proteinelor din apă, din alimente, din băuturi, nu este specifică, toate felurile de proteine producând reacția; pentru aceleași scopuri este posibilă și folosirea metodei biuretului. Un avantaj al metodei Lowry față de metoda biuretului se consideră a fi faptul că factorii de turbiditate cauzati de lipidele serice sunt neglijabili. Însă prezența sulfatului de amoniu produce interferență la determinarea proteinelor prin metoda Lowry [60,61].

Pentru aplicații specifice, metoda lowry a fost modificată față de procedeul original. Astfel, pentru accelerarea formării compusului colorat s-au introdus faze de incubare [62], pentru mărirea vitezei și sensibilității s-a introdus un reducător [63] ori proba s-a tratat cu acid citric în prezență de EDTA [56]; pentru determinarea proteinelor din grâu proba s-a efectuat în prezență de tartrat de sodiu și potasiu [64].

Studii comparative ale metodei Lowry cu determinarea în U.V. și determinarea cu colorantul Coomassie brilliant blue a proteinelor totale din ser uman, cu metoda biuretului drept referință au arătat că rezultatele tuturor acestor metode au fost acceptabile pentru albumină dar pentru globulină au fost supraestimate prin metoda Lowry [65]. Pentru determinarea proteinelor din țesuturile animale, metoda Lowry nu s-a dovedit a fi cea mai rapidă, mai ușor de realizat și mai ieftină, dar pentru analize fine, din probe mici cum este determinarea proteinelor din lacrimi umane, metoda Lowry este adecvată și produce rezultate bine corelate cu alte metode [66, 67].

4.3.5. Alte metode spectrofotometrice și colorimetrice de dozare a proteinelor

a) Dozarea proteinelor cu p-benzochinonă se bazează pe reacția acesteia cu proteina rezultând un produs care absoarbe la 350nm și se folosește ca un procedeu simplu, rapid, ieftin și de rutină pentru determinarea cazeinei din laptele praf, a amestecurilor de proteine și aminoacizi (cu citire la 350nm și respectiv 480nm) și a aminoacizilor [68,69,70,71].

b) Dozarea proteinelor cu acid bicinconic este o alternativă a metodei Lowry, mai puțin susceptibilă la interferență, aplicabilă la concentrații mici; se realizează cu o soluție apoasă de acid bicinconic, cu carbonat, bicarbonat, hidroxid și tartrat de sodiu la pH puternic alcalin, cu sulfat de cupru și citire la 562nm. Variante ale metodei urmăresc creșterea vitezei prin realizarea unui flux continuu ori dozarea proteinelor solide prin aducerea suspensiei lor direct în reactiv [43,72,73,74].

c) Metodele colorimetrice se bazează pe capacitatea unor coloranți acizi de a se combina cu proteinele încărcate opus din punct de vedere electric, determinând precipitarea și reducerea densității optice a soluției de determinat care se măsoară..

Drept colorant se folosesc Orange G sau Amidoblack 10B. Metoda se folosește pentru alimente cu conținut scăzut de proteine [49].

Albumina serică se poate doza cu bromcrezol-purpur prin absorbția la 605nm a complexului format prin legarea albuminei de colorantul cationic, mai puternică decât a colorantului singur, diferența fiind proporțională cu cantitatea de albumină din probă[53].

Unii poluanți proteici și peptidici se pot pune în evidență și pot fi vizualizați cu coloranți, de exemplu Comassie blue și cartati pe suprafață la 580nm cu un

spectrofotometru de reflexie [43,75].

d) Metode spectrometrice în IR pentru determinarea proteinelor [43]

Spectrometria de reflexie în IR este citată în literatură ca o metodă de determinare a proteinelor în soluție diluată, de exemplu în lapte, cu rezultate comparabile cu rezultatele obținute prin metoda Kjeldahl. Spectroscopia în infraroșul apropiat s-a propus cu rezultate promițătoare pentru cunoașterea compoziției chimice a mușchilor animalelor.

A fost pusă la punct o metodă de corecție a împrăștierii la analize individuale multiple ("piecewise multiplicative scatter correction PMSC"), folosită la analiza cu transmitanță difuză în IR apropiat (near IR diffuse transmittance NIT) a conținutului de proteine, grăsimi și apă ale unor probe de carne și produse de carne. Folosirea metodei PMSC a dus la micșorarea semnificativă a erorilor în raport cu datele necorectate.

Astfel a fost determinată, de exemplu, compoziția chimică a mușchilor unor specii de vite prin spectroscopie în IR-apropiat, obținându-se rezultate foarte precise pentru umiditate și grăsimi și ceva mai puțin precise pentru proteine.

Determinările spectrometrice în IR au fost testate și aplicate pentru analiza și a altor produse folosite în alimentație. A fost constatată o foarte bună reproductibilitate și repetabilitate la determinarea proteinelor odată cu alți indicatori precum substanța uscată și grăsimile din soia, cu o bună corelare cu rezultatele obținute prin metoda Kjeldahl.

Proteinele din carne se pot determina rapid prin spectrometria IR cu transformată Fourier (FT-IR), folosind banda de absorbție caracteristică de $1548,6\text{cm}^{-1}$, procedeul oferind și un mijloc rapid de determinare a structurii secundare a proteinelor.

Modificările structurale în timpul prelucrării sunt legate de proprietățile funcționale iar FT-IR oferă o posibilitate rapidă de măsurare a structurilor secundare ale proteinelor.

Corelația dintre rezultatele obținute prin FT-IR și metodele chimice este foarte bună. Metoda FT-IR se aplică pentru determinări cantitative in-line și anume a conținutului de grăsimi, proteine și lactoză.

4.3.6. Determinarea fluorometrică a proteinelor [76]

Separarea și determinarea fluorometrică a proteinelor și peptidelor se bazează pe diferența de sarcină, de hidrofobicitate, masă, cuplare cu liganzi sau diferențe conformaționale.

Determinarea fluorometrică a proteinelor în soluție diluată, de exemplu în lapte, se realizează prin iradiere cu un fascicul laser de 337,1nm în prezența albastrului de bromfenol și măsurarea fluorescenței la 540nm[43].

4.3.7. Electroforeza în analiza proteinelor [33,43,77,78]

Electroforeza, metodă de separare care se bazează pe migrarea diferențială a speciilor de ioni sub acțiunea câmpului electric, fără ca aceștia să sufere reacții la electrozi, a permis separarea serului proteic în patru componente majori-albumină

serică, α , β și γ globuline [33] și se folosește pe scară largă de exemplu în analiza clinică.

Migrarea ionilor spre electrozi este influențată de forța de atracție electroforetică dată de intensitatea câmpului și sarcina ionului și de forța de frecare care depinde de vâscozitate, viteza și raza particulei. Astfel, diferențele de sarcină în condiții date de pH și cele de dimensiune a moleculelor permit separarea proteinelor prin electroforeză.

Pentru separarea proteinelor se folosește electroforeza de joasă tensiune (400V) într-un lichid fixat în mediu poros pe suport membrană de celuloză. Ca mediu poros se folosesc cel mai adesea gelul de poliacrilamidă și gelul de agar. Fixarea în gel a componentelor separate se poate face cu acid tricloracetic inclus în amestecul de colorare. Colorarea în vederea punerii în evidență a zonelor cu substanța de analizat s-a făcut pentru prima dată cu Amido black 10B(albastru-negru de naftol) care se mai folosește și azi, alături și de alți coloranți. Decolorarea porțiunilor de fond se face prin imersarea gelului într-un solvent adecvat, acid acetic în cazul Amido black 10B.

Pentru determinări cantitative se aplică densitometria fie direct prin scanarea gelurilor colorate și necolorate, fie indirect prin scanarea negativelor fotografiilor gelurilor.

Electroforeza poate fi cuplată și cu alte metode, de exemplu cu cromatografia plană rezultând tehnica "fingerprint" cu migrare bidimensională folosită pentru separarea unor amestecuri complexe, sau cu imunodifuziunea rezultând imuno-electroforeza.

O altă variantă o constituie electroforeza cu focalizare izoelectrică, migrarea electroforetică într-un gradient de pH până în zona în care se atinge punctul izoelectric, metodă de separare cu înaltă rezoluție a proteinelor.

Diferite variante ale electroforezei se aplică la studiul și analiza proteinelor din alimente [78] și pentru recunoașterea speciilor din care alimentul provine[79,80,81]. Se poate detecta pe această cale adăugarea a 5% carne de porc la carnea de vită pe baza diferenței de compoziție proteică, ori separarea și dozarea cărnii de diferite specii din amestec [82].

Determinări cu focalizare izoelectrică în domeniul de pH cuprins între 4,4 și 6,2 și punere în evidență cu Comassie Brilliant Blue G-250, au permis determinarea conținutului de proteine solubile în domeniu acid al cărnii diferitelor specii.

Concentrații mai mici de proteine cum sunt cele din lapte se determină prin electroforeză bidimensională cu gradient de pH sau electroforeză în capilară.

Electroforeza preparativă electroendosmotică s-a folosit pentru purificarea proteinelor din bere după ce au fost precipitate cu sulfat de amoniu.

4.3.8. Lichid cromatografia pe coloană de înaltă performanță (HPLC) folosită în dozarea proteinelor [42,43,84,85]

Lichid cromatografia pe coloană de înaltă performanță se utilizează pentru separarea proteinelor și peptidelor cu menținerea integrității și activității biologice a moleculei și pentru realizarea unor rezoluții înalte la separarea amestecurilor complexe de proteine. Astfel, HPLC cu excluziune sterică (SE) este o metodă rapidă

de separare cantitativă a proteinelor din extracte de făinuri de soia. De asemenea, se aplică cu succes pentru analiza aminoacizilor folosind coloane schimbătoare de ioni și detectori de fluorescență și detectori electrochimici.

Efectele condițiilor cromatografice (compoziția fazei mobile, viteza de eluare, compoziția fazei staționare) asupra structurii secundare a proteinelor în cursul HPLC se pot pune în evidență printr-o interfață LC/FT-IR cu care se poate pune în evidență că modificările de structură sunt reversibile [86].

4.3.9. Spectrometria de masă aplicată la analiza proteinelor [43,87,88,89,90,91]

Spectrometria de masă (MS), ca urmare a progreselor în domeniul ionizării cu fascicul de electroni și al ionizării chimice la presiune atmosferică, poate fi cuplată cu lichid cromatografia (LC) sau cu gazcromatografia (GC). Prin metodele LC/MS și GC/MS se pot analiza compuși polari cu mase moleculare în jur de 100000, analizele cuprinzând determinări de mase moleculare, cartări de masă a peptidelor din produsul de degradare și analize de secvențe de aminoacizi [88].

Determinările de masă moleculară a proteinelor prin spectrometrie de masă cu ionizare cu jet de electroni sau prin desorbție cu laser necesită probe de fracțiuni de picomoli de substanță.

Pentru determinarea masei moleculare a proteinelor este frecvent utilizată ionizarea cu laser (MALDI-Matrix assisted laser desorption ionization) cu analiza de masă prin determinarea timpului de trecere (TOF-Time of flight mass analysis). Variantele noi ale procedurii permit, prin observarea reacțiilor de fragmentare, determinarea structurii și secvențelor de aminoacizi ale proteinelor și peptidelor. Procedul MALDI-TOF a fost experimentat și pentru analiza proteinelor și peptidelor reținute pe membrane de nylon și a celor recuperate din geluri de acrilamidă [42,89]. Cartarea de masă a peptidelor presupune măsurarea masei moleculare a peptidelor formate prin degradarea chimică sau enzimatică a proteinelor și furnizează date privind componentele lor.

Cercetarea secvenței de aminoacizi reprezintă o examinare detaliată a structurii proteinei în care spectrometria de masă produce informații fără a fi necesară purificarea riguroasă impusă de alte metode. Analiza secvențelor este cel mai frecvent realizată într-un tandem format din descompunerea indusă de coliziune a speciilor de peptide (CID-collision induced decomposition) și din spectrometria de masă [92,93].

4.3.10. Alte metode folosite pentru analiza cantitativă a proteinelor

a). Structura primară a unei proteine poate fi cunoscută prin hidroliză și determinarea secvenței de aminoacizi. Metoda clasică este hidroliza acidă cu acid clorhidric [7,94]. Pentru cantități mici evaporarea cu microunde și hidroliza în stare de vapori este o

soluție de reducere a timpului necesar operației[95].

Hidroliza este urmată de determinarea aminoacizilor prin metode adecvate de exemplu prin cromatografie de schimb ionic și punere în evidență cu ninhidrină în analizoare de aminoacizi automatizate[7,96].

b). Pentru proteinele cu activitate biologică se poate folosi cromatografia de imunoafinitate[97].

c). Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară este o tehnică ce câștigă teren în analiza structurală a proteinelor pe măsură ce se îmbunătățește corelarea structură-rezonanță[42,98,99].

4.4. Determinarea masei moleculare a proteinelor [8]

Determinarea masei moleculare a proteinelor se poate realiza prin mai multe metode și anume:

- din date analitice, dacă se cunoaște conținutul procentual de aminoacizi sau de metal în cazul metaloproteinelor.
- prin microscopie electronică, prin corelarea dimensiunii imaginii cu măsurătorile realizate de sistemele optice ale microscopului.
- cu măsurători de presiune osmotică, procedeu aplicabil numai proteinelor pure, cu mase moleculare foarte mari, de câteva sute de mii.
- prin ultracentrifugare, viteza de sedimentare depinzând de masa și forma particulei.
- prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă, după denaturarea și acoperirea moleculelor de proteină cu dodecil sulfat.
- prin cromatografie pe gel permeabil, metodă care prezintă avantajul timpului scurt al determinării și că nu este necesar ca proteina să fie foarte pură, metoda putând fi realizată și în extracte proteice totale.

4.4.1. Determinarea masei moleculare a proteinelor prin cromatografie pe gel permeabil [100,101,102]

Principial, metoda se bazează pe corelația care există între masele moleculare ale proteinelor și volumele lor de eluție.

Există o relație liniară între logaritmul masei moleculare a proteinelor și raportul dintre volumul de eluție și volumul spațiului gol al coloanei cromatografice V_e/V_0 . Spațiul gol se determină experimental cu ajutorul unei substanțe care nu este reținută de materialul stratului cromatografic (Blue Dextran 2000), prin măsurarea volumului de eluție.

Raportul V_e/V_0 , numit și volumul relativ de eluție pare să fie independent de concentrația proteinei aplicate pe coloană și de dimensiunile coloanei, dar variază cu temperatura. Determinarea masei moleculare constă dintr-o etalonare a coloanei cromatografice prin determinarea volumelor de eluție a unor proteine a căror masă moleculară este cunoscută, urmată de determinarea volumului de eluție pentru proteina studiată și citirea masei moleculare cu ajutorul curbei etalon.

Dependența dintre volumele de eluție și logaritmul maselor moleculare ale

proteinelor a fost pusă în evidență sub forma unor curbe sigmoide. Determinările citate în literatură au fost efectuate cu Sephadex G75, G100 și G200 și cu proteine cu mase moleculare cuprinse între 10^4 și 10^6 . Partea centrală a curbei V_e -log(masă moleculară) este liniară, lungimea acestei părți fiind funcție de tratamentul anterior la care a fost supus gelul. Precizia determinării este de 93%.

5. TESTAREA PROTEINELOR SEPARATE DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE CA ADAOS LA FURAJAREA ANIMALELOR

Conținutul de proteine al apelor uzate de la abatoare, posibilitățile de separare a lor și în special compoziția complexă în proteine sugerează posibilitatea de utilizare a materialelor separate ca adaus la nutrețurile folosite pentru furajarea animalelor

5.1. Aprecierea valorii nutritive a nutrețurilor și rațiilor [103]

Valoarea nutritivă a nutrețurilor și rațiilor este determinată de interacțiunea dintre nutreț și organism, adică de măsura în care proprietățile principale ale nutrețurilor (compoziția chimică și forma de prezentare a componentelor lor) corespund particularităților biologice ale animalului, precum și de modul cum ele pot satisface cerințele de energie și de substanțe nutritive ale organismului, influențând starea fiziologică, producția, reproducția, creșterea și sănătatea lui.

Principalele componente ale nutrețurilor sunt:

- substanțe minerale caracterizate prin indicatorul “cenușă” (Ca, PO_4^{3-} , Mg, Na, Cl, K, microelementele);
- substanțe organice (proteine, glucide, lipide, vitamine, acizi organici)
- apa, în procente variabile funcție de natura furajului (de la 12-15% în semințe furajere la 90-95% în unele reziduuri industriale).

În ceea ce privește prezența apei în furaje trebuie remarcat efectul ei pozitiv, în primul rând ca solvent în organism dar și efectul negativ de favorizare a dezvoltării mușcăiurilor și a bacteriilor de putrefacție.

În ceea ce privește conținutul de săruri minerale, din punct de vedere al utilizării proteinelor din apele uzate, este important rolul NaCl. Prezența sării în anumite limite în furaj este necesară, de exemplu dacă păsărilor li se administrează hrană exclusiv vegetală. Evident că excesul este dăunător determinând sete, slăbire musculară și edeme. Intoxicarea cu NaCl este frecventă la păsări crescute intensiv.

Cantitatea normală de sare pentru păsări este de 0,5-1% din substanța uscată a rației.

Și alte substanțe minerale pot fi importante la furajare. Astfel, la însilozarea nutrețurilor din diferite plante, pentru furajarea, de exemplu a vitelor, se adaugă uree și sulfat de amoniu în soluție apoasă, în proporție de 0,5-0,6% uree și 0,2-0,3% sulfat de amoniu față de cantitatea însilozată. În acest caz sulfatul are rol de aport de sulf și de neutralizare parțială a alcalinității ureei. Această utilizare poate fi importantă în cazul nostru pentru proteinele separate prin salifiere, îndepărtarea sulfatului nemaifiind necesară cu exigență foarte mare.

Drept nutrețuri sau materii prime pentru nutrețuri se folosesc materiale vegetale, materiale animale și minerale. Între materialele de origine animală se folosesc și subproduse ale industriei cărnii ca făină de carne, făina de carne și oase, făina de sânge, făina de pește, jumările de abator, grăsimea de uz furajer, făina de pene, făina de resturi colagene, făina din deșeuri de piele, conținutul ruminal și stomacal, dejecții animaliere.

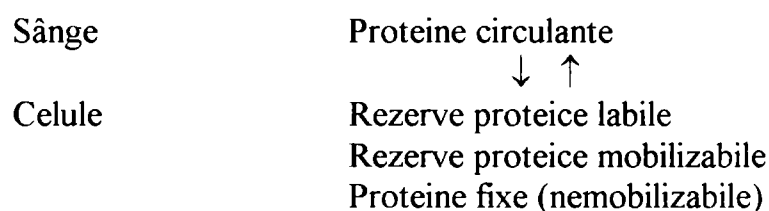
În literatura consultată nu am găsit indicii privind utilizarea proteinelor din apele uzate.

5.2. Cerințele proteice ale animalelor

5.2.1. Proteinele pentru asigurarea funcțiilor vitale

Majoritatea proteinelor tisulare din organismul animal sunt supuse unui proces permanent de degradare și unui proces de reînnoire, cele două procese trebuind să fie într-un permanent echilibru dinamic. Acest echilibru se realizează pe seama protidelor ingerate sau dacă acestea sunt insuficiente (până la un anumit nivel) pe baza rezervelor proteice labile și mobilizate existente în celule și țesuturi.

Mecanismul acestui proces este redat de următoarea schemă:



Cerințele proteice pentru asigurarea funcțiilor vitale sunt cantitățile de proteine necesare pentru reînnoirea țesuturilor uzate și pentru sinteza enzimelor și hormonilor și se determină experimental în condiții de inaniție proteică sau cu ajutorul tehnicilor moderne prin ecuații de regresie. Cantitatea de proteină tisulară necesară, determinată în astfel de condiții este cunoscută sub denumirea de “coeficient de uzură” [104].

Valorile medii ale coeficienților de uzură sunt corelate cu consumul energetic pentru asigurarea metabolismului bazal și pentru majoritatea speciilor de animale se apreciază la 12,5 mg proteină/kcal bazală sau 3 g/100 kg corp (deși în sistemul internațional SI de unități de măsură, aplicat legal și în România, unitatea de măsură pentru energie este joul-ul, în practica curentă se folosește în domeniu kcal)[105].

Pornind de la aceste date, ținând cont de valorile coeficienților de utilizare a azotului digestibil în organism și de rezultatele verificării rezultatelor în condiții de producție s-au stabilit cantitățile de proteină care asigură menținerea animalelor în echilibru azotat pe o perioadă mai îndelungată de timp.

Limitele de variație sunt determinate de:

- echilibrul energo-proteic al hranei;
- aportul vitaminic și mineral precum și influențele hormonale implicate în metabolismul proteic;
- aportul de aminoacizi esențiali implicați în asigurarea funcțiilor vitale;

Neasigurarea cantităților minime de proteine prin hrană determină perturbări grave ale echilibrului biologic care se poate încheia cu moartea animalelor [106].

Normele proteice totale se exprimă global cu normele proteice pentru producție.

5.2.2. Necesarul de proteine pentru producție

În cazul găinilor ouătoare pentru obținerea unei performanțe de ouat maxime, aportul furajer de proteine trebuie să fie suficient în toate stadiile fiziologice. În perioada de ouat carența în proteină este legată de carența de aminoacizi indispensabili, în special aminoacizii cu conținut de sulf și de lizină.

Pentru găina luată individual, cerințele de aminoacizi, exprimate în mg/zi, depind de greutatea vie a păsării și de nivelul performanțelor, grame de ouă produse pe zi. Se cumulează deci cerințele de întreținere cu cele de producție.

Ecuatiile care stabilesc cerințele de aminoacizi comportă doi coeficienți, unul pentru producție de ouă (a) și altul pentru întreținere (b):

$$y = a E + b P \quad (5.1.)$$

unde y este cerința de aminoacizi în mg/zi;

a este coeficientul care exprimă cerința de producție;

b este coeficientul care exprimă cerința de întreținere;

E este cantitatea de ouă produsă în grame pe zi;

P este greutatea vie în kg.

Coeficienții a și b sunt variabili în funcție de aminoacidul luat în considerare.

Tab. 5.1. Cerința pentru câțiva aminoacizi indispensabili producției de ouă [106]

Aminoacidul	Eficacitatea metabolică a proteinei (%)	Conținutul oului (mg/g)	Cerințe (mg/g de ou)
Lizina	79	7,90	10,00
Metionina	74	3,51	4,77
Izoleucina	76	6,00	7,97
Triptofan	74	1,94	2,62
Treonina	83	5,70	6,90

Pentru ca astfel de ecuații să fie aplicabile trebuie să se țină cont de eficacitatea utilizării aminoacizilor (digestibilitatea lor) care diferă de la un aminoacid la altul și depinde de originea genetică a păsărilor și de starea lor fiziologică. Valorile eficacității utilizării aminoacizilor variază între 0,70-0,92.

În practică găinile sunt crescute nu individual ci în colectivități formate din indivizi care nu au riguros aceeași greutate și nu au aceleași performanțe. În acest caz la stabilirea cerinței dintr-un aminoacid esențial trebuie să se țină cont de omogenitatea efectivului astfel încât rația zilnică să satisfacă păsările cele mai

exigente, în condiții de rentabilitate economică.

Modelul Reading [107], care ia în considerare nu numai greutatea vie și producția dar și variația acestor parametri precum și raportul dintre costul unui mg suplimentar de aminoacid și beneficiul realizat de 1 mg de produs în plus, permite calculul cerinței optime dintr-un aminoacid esențial pentru colectivitate.

$$A_{opt} = a \cdot E_{max} + b \cdot W + x \cdot (a^2 \cdot S_{E_{max}}^2 + b^2 \cdot S_W^2 + 2 \cdot a \cdot b \cdot r \cdot E_N \cdot S_{E_{max}} \cdot S_W)^{1/2} \quad (5.2.)$$

unde:

- A_{opt} = cerința optimă de aminoacid esențial în mg/zi;
- a = cerința de producție în mg/g de ou produs;
- E_{max} = producția zilnică maximă de ouă în g/zi;
- b = cerința de întreținere în mg/kg de greutate vie;
- W = greutatea vie medie în kg;
- x = $a \cdot K$ unde K este costul unui mg aminoacid raportat la beneficiul pe 1 g de ou
- S^2 = variația diferiților parametri;
- r = corelația dintre producția maximă și greutatea ouălor.

Deși modelul Reading prezintă avantaje ca acela de a include și aspecte de conjunctură economică, este dificil de a prevedea consumul zilnic al păsărilor înainte de a se fixa nivelul de aminoacizi al furajului.

Cerința în aminoacizi depinde adesea de nivelul proteic al furajului. La găinile ouătoare de ouă cu coaja brună, rația trebuie să aducă cca 750 mg aminoacizi cu sulf din care 50% sub formă de metionină, la o producție de ouă de 53 g/zi [108].

Prin comparație, cerințele în aminoacizi ale găinii Leghorn pot fi de 510-540 mg/zi la o producție de 40,6 g ou. De fapt, găinile ouătoare din tipurile Leghorn și Rhode Island par să aibă aceeași cerință de producție dar cerința de întreținere este mai scăzută la Leghorn care are o greutate vie mult mai mică decât găinile Rhode Island [109].

În cazul lizinei datele bibliografice sunt destul de diferite, la aceasta contribuind și ameliorarea continuă în cursul ultimilor 20 de ani a performanțelor de ouat. Valorile propuse au fost între 520-900 mg/zi la găinile de tipul Leghorn, iar pentru găinile ouătoare de ouă brune s-a arătat că intensitatea ouatului și greutatea medie a ouălor sunt optime la ingestia zilnică de lizină de 790 mg la un consum de 17,7 g de proteină [110].

Raționamente identice pot fi făcute și pentru ceilalți aminoacizi indispensabili, luând în considerare și faptul că există o corelație între cerința dintr-un aminoacid indispensabil și aportul în alți aminoacizi și că un nivel proteic dat corespunde unei cerințe care permite un nivel dat de performanță.

Pentru o concentrație energetică cuprinsă între 2700-2900 kcal E.M/kg un aport de 15% proteine brute ar părea suficient cu condiția echilibrării furajului în aminoacizi cu sulf și lizină. Pentru alți aminoacizi, în special triptofanul 0,16% este

un nivel minim ușor de atins când furajul conține șrot de soia.

5.2.3. Aportul energetic

În general masa de ou produsă pe zi nu este afectată de nivelul energetic al furajului. Gradul de supraconsum depinde de originea genetică a păsărilor. În practică se poate prevedea o concentrație energetică cuprinsă între 2700 și 2900 Kcal E.M/kg.

Restricția are un caracter benefic. În raport cu furajarea "ad libitum", o restricție de 5% reduce mortalitatea fără să afecteze nivelul ouatului. Această restricție îmbunătățește ușor indicele de consum, dar reduce greutatea ouălor cu 0,5÷1,5%. De fapt, influența restricției energetice depinde de originea genetică a păsărilor.

La găinile ouătoare de tip Rhode Island, sporul de creștere al păsărilor variază în funcție de ingestia energetică, indicele de consum atingând o valoare minimă pentru ingestia puțin inferioară (90%) față de consumul "ad libitum". La găinile de tip Leghorn, o ușoară restricție (de 5-10%), nu are efect asupra intensității de ouat dar diminuează greutatea oului.

Pentru anumiți hibrizi restricționarea diminuează atât ouatul cât și greutatea medie a ouălor iar la alți hibrizi numai numărul de ouă.

5.3. Câteva date privind producția și furajarea găinilor ouătoare [111]

Producția medie de ouă variază în funcție de rasă de la 100-120 buc/an (rasa Cornish) la 179-180 buc/an (Rhode-Island) și 180-250 buc/an (Leghorn). Producția maximă de ouă se obține în primul an de ouat, apoi scade treptat.

Anul de ouat	1	2	3	4
Producția de ouă %	100	86,37	76,68	64,42

Producția maximă de ouă se realizează mai ales la păsări caracterizate prin greutatea medie a rasei.

Masa ouălor este influențată de un număr de factori biologici cum sunt specia, rasa, linia. Spre exemplu:

Rasa	Masa oului (g)
Sussex	60-65
Leghorn	55-67
Rhode-Island	55-68
Minorca	70-80

Oul este un produs biologic complex, a cărui compoziție chimică diferă în funcție de specie, fiind caracterizată în general printr-un conținut în substanță uscată de 27-30%.

Compoziția chimică a oului de găină este dată în tab. 5.2.

Tab. 5.2. Compoziția chimică a oului de găină

Denumirea	U.M.	Apă	Protide	Lipide	Glucide	Săruri minerale
Oul întreg	%	72,5	13,3	11,6	1,5	1,1
Gălbenușul	%	50,8	16,2	31,7	0,2	1,1
Albușul	%	85,7	12,7	0,3	0,7	0,6

Câteva date generale privind valoarea nutritivă a rețetei de nutreț combinat pentru găini rase ușoare sunt redată în tab. 5.3.

Tab. 5.3. Date privind nutrețul combinat pentru găini rase ușoare

Indicatorul	U.M.	Valoarea
Energie metabolizabilă	kcal/kg	2800-2900
Proteină brută	%	17
Grăsimi	%	2÷4
Calciu	%	3,2÷3,5
Fosfor	%	0,7÷0,8
Lizină	%	0,7÷0,8
Metionină și cistină	%	0,6÷0,65

Nu este recomandată forțarea ouatului prin administrarea de nutrețuri cu procent ridicat de proteină deoarece produce tulburări care duc ulterior la reduceri ale ouatului.

5.4. Apele uzate de la abatoare, sursă de proteine pentru adaus de furaje

Conținutul în aminoacizi al proteinelor din carne este redată în tab. 5.4.

Tab. 5.4. Conținutul de aminoacizi al proteinelor din carne [7]

Aminoacidul	Mușchi de vită	Mușchi de pasăre	Miozina	Actina	Colagenul	Elastina
Acid asparagic	9,7÷9,9	9,7÷11,0	10,9	10,4	5,4	1,0
Treonina	4,8	3,5÷4,5	4,7	6,7	2,1	1,1
Serina	4,1÷4,5	-	4,1	5,6	2,9	0,9
Acid glutamic	15,8÷16,2	16÷18	21,9	14,2	9,7	2,4
Prolina	3,0÷4,1	-	2,4	4,9	13,0	11,6
Hidroxipirolină					10,5	1,5
Glicină	4,6÷6,1	4,6÷6,7	2,8	4,8	22,5	22,5
Alanină	6,1÷6,3		6,7	6,1	8,2	21,1
Cistină	1,3÷1,5		1,0	1,3	0	0,3
Valină	4,8÷5,5	4,7÷4,9	4,7	4,7	2,9	16,5
Metionină	4,1÷4,5		3,1	4,3	0,7	Urme
Izoleucină	5,2	4,6÷5,2	5,3	7,2	4,8	3,7
Leucină	8,1÷8,7	7,3÷7,8	9,9	7,9		8,6
Tirozină	3,8÷4,0		3,1	5,6	1,2	1,3
Fenilalanină	3,8÷4,5	3,7÷3,9	4,5	4,6	2,2	5,9
Lizină	9,2÷9,4	8,3÷8,8	11,9	7,3	3,9	0,5
Hidroxilizină					1,1	-
Histidină	3,7÷3,9	2,2÷2,3	2,2	2,8	0,7	0,1
Arginină	5,3÷5,5	5,7÷6,1	6,8	6,3	7,6	1,2
Triptofan			0,8	2,0	0	-

Dintre aminoacizii citați, valina, metionina, leucina, izoleucina, fenilalanina, lizina, histidina, treonina și triptofanul sunt aminoacizi esențiali la care, în cazul creșterii puilor se adaugă ca aminoacid esențial glicina și ca semiesențial arginina.

Apele uzate rezultate în cursul prelucrării cărnii conțin cantități însemnate de substanțe organice care în principal sunt proteine și anume aceleași proteine care există în carne. În acest fel se justifică testarea proteinelor separate din apele uzate de la abatoare ca adaus la furajele pentru animale.

Considerațiile anterioare au determinat orientarea testărilor spre producția avicolă și mai precis spre utilizarea proteinelor separate din apele uzate de la abatoare ca adaus la furajarea găinilor ouătoare.

6. DATE SI CONSIDERATII PRELIMINARE

Datele din literatură, redate în tab.3.1 și 3.2 au sugerat analiza comparativă a caracteristicilor apelor uzate rezultate la abatoarele din municipiu și împrejurimi cu valorile prescrise prin normative.

În tabelul 6.1. sunt redate caracteristicile de calitate impuse prin norme pentru apele uzate și rezultatele unor analize efectuate pe probe momentane recoltate din efluentul general de la câteva abatoare mari, în perioade de funcționare la capacitate maximă [112]. La aprecierea datelor din tabel trebuie să se țină cont de faptul că valorile sunt rezultatul unor analize momentane deci aleatorii și există probabilitatea ca maximele să nu fi fost redate de analize. De asemenea, analizele dau o imagine numai asupra efluentului general, nu și asupra efluenților din secții. Datele caracterizează abatoare mari nu și micile abatoare și carmangerii care au apărut și s-au dezvoltat în ultimul timp și care nu aplică toate procedeele tehnologice caracteristice marilor abatoare. Cu toate aceste limitări, din studiul datelor cuprinse în tabel rezultă două concluzii:

- ◆ Apele uzate evacuate, chiar preepurate, conțin cantități mari de impurificatori, așa cum rezultă și din datele din literatură.
- ◆ Deși încărcarea organică reflectată de valorile indicatorilor CBO₅ și CCO-Mn sau CCO-Cr este mare, nu rezultă natura poluanților organici, așa cum nu rezultă nici din datele citate din literatură. Fără însă a cunoaște natura lui, recuperarea eficientă a materialului poluant este imposibilă.

Faptul că materia primă prelucrată – carnea – este în principal de natură proteică și că în cursul prelucrării carnea vine în contact intim cu apa, sugerează că poluanții organici din apele uzate sunt de natură proteică. Din acest motiv, în cadrul lucrării de față s-a urmărit punerea în evidență și dozarea cantitativă a proteinelor din apele uzate de la abatoare și apoi separarea și caracterizarea lor.

Compoziția cărnii depinde de specia, vârsta, starea de îngrășare, etc a animalului sacrificat ceea ce înseamnă că și compoziția poluanților din apele uzate depinde de acești factori.

Obiceiurile gastronomice, structura producției zootehnice și tradiția au făcut ca în zona noastră geografică să predomine producția și consumul cărnii de porc. Din această cauză studiul poluanților proteici s-a făcut din apele uzate de la abatoarele de suine.

Pe baza studiului din literatură, în partea experimentală s-au urmărit:

- alegerea metodei analitice adecvate pentru determinarea conținutului de proteine din apele uzate de la abatoare și pentru urmărirea separării proteinelor din ape.
- determinarea conținutului de proteine totale din apele uzate de la abatoare.
- separarea și fracționarea proteinelor din apele uzate de la abatoare.
- determinarea masei moleculare a proteinelor separate.
- testarea proteinelor separate pentru utilizarea ca adaos la furajarea animalelor.

Materiale și aparatură

Apele uzate au fost recoltate din tehnologie, în mare majoritate de la același abator pentru a asigura constanța maximă a compoziției lor.

Pe tot parcursul lucrării, procedeele aplicate au fost încercate pe extracte de carne preparate în laborator, extracte care au constituit un model al apelor uzate.

Aparatura utilizată pentru determinările experimentale au fost:

- spectrofotometru UV-VIS, UNICAM (1995)
- aparat pentru electroforeză KIT MIDIGEL PROTEINS cu soluțiile de lucru (colorant Roșu Ponceau, tampon barbituric, soluție de decolorare, soluție de fixare și gel de agaroză)
- aparat Parnas-Wagner
- coloane cromatografice.

Pentru separările gelcromatografice s-au folosit geluri:

- SEPHADEX G 200 și G 25 produse de firma PHARMACIA Uppsala, Suedia
- FILTRADEX R50, produs de Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași

Etaloanele pentru determinările de masă moleculară au fost:

- Blue dextran
- Ureeză (Fluka Chemie)
- Albumină serică bovină (Merck)
- Glucagon (Novo Ind. Copenhagen)

Tab.6.1. Privire comparativă a caracteristicilor de calitate impuse prin norme pentru apele uzate evacuate și a caracteristicilor reale ale apelor uzate evacuate de la abatoare [11]

INDICATORUL	VALORI PRESCRISE			ABATORUL 1				ABATORUL 2					ABATORUL 3				ABATORUL 4				
	Tipul apei	AS	EAS	EAC	Proba nr.				Proba nr.					Proba nr.				Proba nr.			
					1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4
pH	AB				7,6	6,2	6,5	7,1	6,9	7,0	7,2	8,3	7,2	7,4	7,1	8,2	6,8	6,5	6,5		
	AP	6,5÷ 8,5	6,5÷ 8,5		7,3	6,2	6,6	7,1	7,0	7,1	7,1	8,4	7,1	7,5	7,1	6,5	6,9	6,8	6,8		
Suspen sii	AB				311	1040	1570	612	418	326	783	495	507	319	289	8065	713	2390	2345		
	AP		60	300	128	787	1086	565	293	277	185	279	467	108	112	1261	350	1912	1872		
CBO ₅	AB				269	281	492	927	191	560	712	1234	535	180	62	735	685	1516	1721		
	AP	12	20	300	126	244	305	817	167	522	553	688	517	74	51	632	465	1222	1472		
CCO- Mn	AB				58	213	229	229	110	292	300	462	335	32	32	608	237	712	779		
	AP	25	40	500*	40	158	197	218	95	267	276	276	276	32	18	316	165	593	630		
NH ₄ ⁺	AB				37	22	11	19	14	9	90	64	17	14	6	40	77	52	27		
	AP	10	2	30	11	20	9	17	9	8	46	69	22	3	4	220	50	47	21		
Cl ⁻	AB				710	860	700	620	240	530	1320	1300	160	40	40	110	160	300	200		
	AP	300	500		410	850	690	600	230	530	160	1220	150	40	30	110	250	300	190		
Subst. Extract	AB				112	62	92	62	52	28	61	55	71	4	98	122	80	87	114		
	AP	5	20		40	47	60	50	39	16	25	30	53	3	58	34	37	64	90		

* valoare reglementată pentru CCO-Cr

AS: ape de suprafață de categoria III

EAS: evacuări în ape de suprafață

EAC: evacuări în canalizări

AB: ape brute

AP: ape preepurate înainte de evacuare

Abatoarele 1-4 se găsesc pe platforme industriale din municipiul și județul Arad

7. DETERMINAREA CONTINUTULUI DE PROTEINE DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE

7.1. Pregătirea soluțiilor de proteine supuse studiului

7.1.1. Obținerea extractului de carne în laborator

S-a urmărit obținerea unui extract de carne în laborator, extract care să servească drept apă uzată model.

Drept mediu de extracție se folosește apa potabilă sau soluția apoasă de clorură de amoniu sau de clorură de sodiu. După câteva încercări cu soluție de clorură de amoniu s-a preferat soluția de clorură de sodiu deoarece extractele preparate cu clorură de amoniu s-au dovedit a fi mai predispuse la alterare și pentru a evita introducerea suplimentară de ioni amoniu în amestec. De asemenea, extractele cu clorura de sodiu se aseamănă mai mult cu apele uzate din tehnologie unde se folosește tot clorură de sodiu.

Caracteristicile electroliților folosiți pentru prepararea extractelor de carne sunt redate în tab.7.1 unde tăria ionică a soluțiilor este o mărime calculată cu relația :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (7.1)$$

unde C_i = concentrația molară a cationilor și anionilor

Z_i = sarcinile ionilor electrolitului

Tab.7.1 Caracteristicile electroliților folosiți pentru prepararea extractelor de carne

Nr. crt.	SOLUȚIA DE ELECTROLIT FOL. LA EXTRAȚIE	CONC. PROCENTUALĂ	DENSITATEA RELATIVĂ	CONC. MOLARĂ	TĂRIA IONICĂ
1.	CLORURĂ DE SODIU	0,5	1,0027	0,09	0,09
2.	CLORURĂ DE SODIU	1,5	1,0083	0,26	0,26
3.	CLORURĂ DE SODIU	15,0	1,1085	2,8	2,8
4.	CLORURĂ DE AMONIU	0,5	1,0007	0,09	0,09
5.	CLORURĂ DE AMONIU	1,5	1,0028	0,28	0,28

La alegerea metodelor de lucru s-au avut în vedere prevederile standardelor existente pentru acest domeniu.

Extractul de carne a fost preparat din carne măcinată și mediul de extracție sub agitare. În general s-a lucrat cu probe de 50g carne măcinată și 200 ml mediu de extracție, respectiv cu raportul în greutate carne/mediu de extracție 1:4 . După filtrare a rezultat un extract lipsit de culoare.

După filtrare a rezultat un extract lipsit de culoare.

7.1.2. Recoltarea probelor de apă uzată

La recoltarea probelor de apă uzată s-a ținut cont de prevederile SR ISO 5667 –10:1994 “Ghid pentru prelevare apă uzată”.

În cazul apelor tehnologice, probele au fost recoltate direct din utilajul în cauză, la terminarea operațiilor tehnologice, după o prealabilă agitare.

Probele recoltate au fost păstrate timp de 24 ore la rece, astfel încât impuritățile mecanice și grăsimile să se separe. Impuritățile au constituit aproximativ 50% din volumul inițial de apă uzată recoltată.

După decantare apa s-a filtrat pe hârtie filtru calitativă.

7.2. Determinarea conținutului de proteine totale prin metoda Gornall [26,32]

REACTIVI

- reactiv Gornall (preparat prin aducerea cu apă distilată la 1000ml a unui amestec care conține 1,5g sulfat de cupru pentahidrat, 6,0g sare Seignette și 300ml soluție de hidroxid de sodiu 10%);
- soluție standard de proteină (preparată prin dizolvarea a 0,2g albumină serică bovină în 100ml apă distilată; 1ml soluție etalon corespunde la 0,002g albumină serică bovină).

MODUL DE LUCRU

a) Trasarea curbei de etalonare

În mai multe eprubete se pipetează în ordine 0,0 , 0,5 , 1,0 , 1,5 , 2,0 , 2,5 , 3,0, 3,5 , 4,0 ml soluție standard de proteină și în aceeași ordine 10,0 , 9,5 , 9,0 , 8,5 , 8,0 , 7,5 , 7,0 , 6,5 , 6,0 ml apă distilată. În fiecare eprubetă se pipetează câte 2,0 ml reactiv Gornall. Probele se omogenizează prin agitare energică, se lasă să staționeze 15 minute, după care se determină absorbanta probelor la 540nm în cuve de 1cm. Drept martor se folosește soluția din prima eprubetă care nu conține proteină.

Valoarea absorbantei în funcție de concentrația albuminei serice bovine este redată în tab. 7.2 și graficul din fig.7.1 pentru domeniul 0-800 mg/l.

Probele cu concentrații de peste 800 mg/l proteine nu au respectat legea Lambert – Beer. Din această cauză probele analizate, cu concentrații mai mari decât această valoare, au fost diluate pentru a se încadra între limitele curbei de etalonare.

Tab.7.2 Determinarea curbei de etalonare pentru dozarea proteinelor prin metoda Gornall

Nr crt	SOL.STANDARD PROTEINĂ ml	APA DISTILATĂ ml	REACTIV GORNALL ml	CONC.PROTEINĂ ÎN PROBA CITITĂ mg/l	ABSORBANȚA LA $\lambda = 540\text{nm}$
1.	0,0	10,0	2	0,0	0,000
2.	0,5	9,5		100,0	0,0212
3.	1,0	9,0		200,0	0,0360
4.	1,5	8,5		300,0	0,0617
5.	2,0	8,0		400,0	0,0738
6.	2,5	7,5		500,0	0,0986
7.	3,0	7,0		600,0	0,1140
8.	3,5	6,5		700,0	0,1258
9.	4,0	6,0		800,0	0,1317

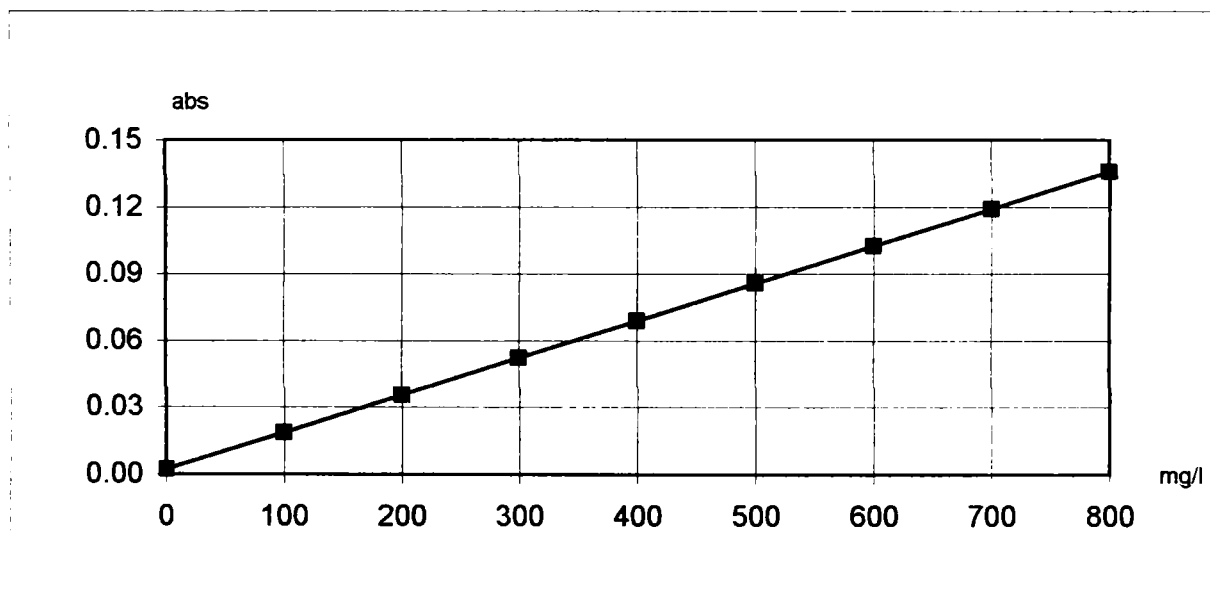
Pentru valorile determinate ale absorbantei funcție de concentrațiile diferite ale etalonului, ecuația de regresie corespunde unei drepte:

$$y = 0,000172(\pm 0,000015)x + 0,004744(\pm 0,00730)$$

iar gradul de corelație este:

$$r = 99,24\%$$

Fig.7.1 Curba etalon pentru dozarea proteinelor prin metoda Gornall



b) Influența prezenței ionului amoniu

Pentru a constata în ce măsură prezența ionului amoniu din sulfatul de amoniu care urmează să se utilizeze pentru separarea proteinelor influențează acuratețea determinărilor prin metoda Gornall, s-a aplicat metoda unor soluții de sulfat de amoniu lipsite de proteine.

MODUL DE LUCRU

S-a lucrat în condiții identice cu cele descrise pentru dozarea proteinelor, descrise în punctele anterioare, supunându-se analizei o soluție rezultată prin dizolvarea a 40g sulfat de amoniu în 1000ml apă.

Într-un balon cotat de 1000ml s-au dizolvat în apă 40g sulfat de amoniu, apoi s-a adus la semn. În baloane cotate de 100ml s-au pipetat 1,2,3,5,6,7,10,15,20ml din soluția de sulfat de amoniu și s-au adus la semn cu apă distilată, apoi soluțiile s-au analizat prin metoda Gornall. S-au obținut rezultatele din tab.7.3.

Tab. 7.3. Rezultatele analizei prin metoda Gornall a unor soluții de sulfat de amoniu

Nr. crt.	SOL.SULFAT DE AMONIU ml	APĂ DISTILATĂ ml	CONȚINUT DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ g/l	REACTIV GORNALL ml/10ml probă	ABSORBANȚA la $\lambda = 540,0 \text{ nm}$
1.	1	99	0,4	2	0
2.	2	98	0,8		0
3.	3	97	1,2		0
4.	5	95	2,0		0
5.	6	94	2,4		0
6.	7	93	2,8		0
7.	10	90	4,0		0
8.	15	85	6,0		0
9.	20	80	8,0		0

Pentru domeniul de concentrație $0,4 \div 8,0$ /l sulfat de amoniu nu a apărut un rezultat fals pozitiv cu reactivul Gornall.

Pentru a verifica dacă această concluzie se poate extinde și la concentrații mai mari, 7,5g sulfat de amoniu s-au dizolvat în 50ml apă, rezultând o soluție cu saturația de aproximativ 30%. Analiza cu metoda Gornall a acestei soluții a dus la rezultatul de 4,1 mg/l, corespunzător interferenței ionului amoniu. Încercarea a dus deci la un rezultat fals pozitiv mic în raport cu concentrațiile de proteine care urmează să se determine.

7.3. Determinarea conținutului de proteine prin metoda Lowry [32]

REACTIVI

- reactiv Folin – Ciocâlțeu (preparat prin diluarea cu apă distilată, în raport 1:10, a unui reactiv Folin-Ciocâlțeu p.a. produs de Fluka Chemie, care conține dintr-un amestec de wolframat de sodiu $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și molibdat de sodiu $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

- reactiv alcalin de cupru (preparat prin amestecarea a zece părți soluție 10% carbonat de sodiu anhidru în hidroxid de sodiu 0,5N cu o parte soluție 0,5% sulfat de cupru pentahidrat în citrat de sodiu 1%).

- soluție standard de proteină (preparată prin dizolvarea a 0,01g albumină serică bovină în 100ml apă distilată; 1ml soluție etalon corespunde la 0,0001g albumină serică bovină).

MODUL DE LUCRU

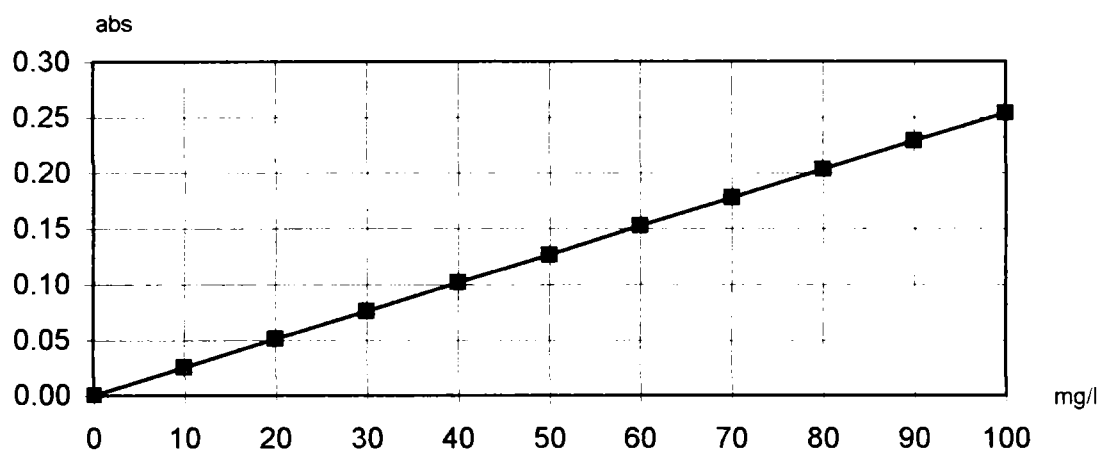
a) Trasarea curbei de etalonare

În mai multe eprubete se pipetează în ordine 0,0 , 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 , 0,5 , 0,6 , 0,7 , 0,8 , 0,9 , 1,0 ml soluție standard de proteină și apoi, în aceeași ordine 1,0 , 0,9 , 0,8 , 0,7 , 0,6 , 0,5 , 0,4 , 0,3 , 0,2 , 0,1 , 0,0 ml apă distilată. În fiecare eprubetă se pipetează câte 1,0 ml reactiv alcalin de cupru(b), se lasă în repaus timp de 10 minute, după care se pipetează în fiecare eprubetă câte 3,0 ml reactiv Folin-Ciocâlțeu(a) diluat, se agită energic și se incubează timp de 10 minute pe o baie de apă la 50°C. După răcire se citește extincția la 660nm în cuva de 1cm, folosindu-se drept martor soluția din prima eprubetă, care nu conține proteină. Valoarea extincției în funcție de concentrația albuminei serice bovine este redată în tab.7.4 și graficul din fig.7.2 pentru domeniul 0-100mg/l, domeniu în care legea Lambert – Beer este respectată. Probele care au avut concentrații mai mari decât domeniul curbei de etalonare, au fost diluate corespunzător în vederea efectuării analizei.

Tab.7.4. Determinarea curbei de etalonare pentru dozarea proteinelor prin metoda Lowry

Nr. crt.	SOLUȚIE STANDARD PROTEINĂ ml	APĂ DISTIL. ml	REACTIV CUPRIC ml	REACTIV FOLIN-CIOCÂLȚEU ml	CONC. PROTEINĂ ÎN PROBA CITITĂ mg/l	ABSORBANȚA la $\lambda = 660\text{nm}$
1.	0,0	1,0	1	3	0	0,0000
2.	0,1	0,9			10	0,0249
3.	0,2	0,8			20	0,0498
4.	0,3	0,7			30	0,0747
5.	0,4	0,6			40	0,0996
6.	0,5	0,5			50	0,1245
7.	0,6	0,4			60	0,1473
8.	0,7	0,3			70	0,1713
9.	0,8	0,2			80	0,1988
10.	0,9	0,1			90	0,2254
11.	1,0	0,0			100	0,2567

Fig.7.2 Curba etalon pentru dozarea proteinelor prin metoda Lowry



Pentru valorile determinate ale absorbantei funcție de concentrațiile diferite ale etalonului, ecuația de regresie corespunde unei drepte :

$$y = 0,002521(\pm 0,000046)x - 0,001250(\pm 0,002724)$$

și gradul de corelație este:

$$r = 99,95\%$$

7.4. Determinarea conținutului de ioni anorganici al apelor uzate supuse studiului

Analiza conținutului de ioni anorganici din apele uzate și din amestecurile rezultate la salifierea lor, s-a făcut conform cu metodele standardizate pentru apele de suprafață și apele uzate.

7.4.1. Determinarea ionului amoniu prin metoda Nessler

Ionul amoniu s-a determinat, conform cu prevederile STAS 8683 – 70, cu ajutorul tetraiodomercuriatului de potasiu care în prezența ionului amoniu se descompune cu formarea iodurii amido-oxi-dimercurice, de culoare galbenă cu maxim de absorbție la 440nm.

REACTIVI

- soluție de tartrat dublu de sodiu și potasiu (obținută prin decantarea după omogenizare a unui amestec de 392g NaK(C₄H₄O₆) dizolvat în 748ml apă cu 5,5ml KOH 30% și 4,5ml NaOH 30%).

- soluție standard de NH₄Cl (preparată prin dizolvarea a 2,972g NH₄Cl în 1.000ml apă distilată; 1ml soluție standard corespunde la 1mg NH₄⁺).

MODUL DE LUCRU

Trasarea curbei de etalonare

În baloane cotate de 50ml se măsoară câte 0,00 , 0,25 , 0,50 , 0,75 , 1,00 , 1,25, 1,50 , 1,75 , 2,00 , 2,75 , 3,00 , 3,25 , 3,50 , 3,75 , 4,00 ml soluție standard și se aduce la semn cu apă distilată. La probele astfel obținute se adaugă câte 2ml tartrat dublu de sodiu și potasiu și 2ml reactiv Nessler. Probele se colorimetrează la 440nm, față de proba martor, în cuvă de 1cm, după maxim 30 de minute.

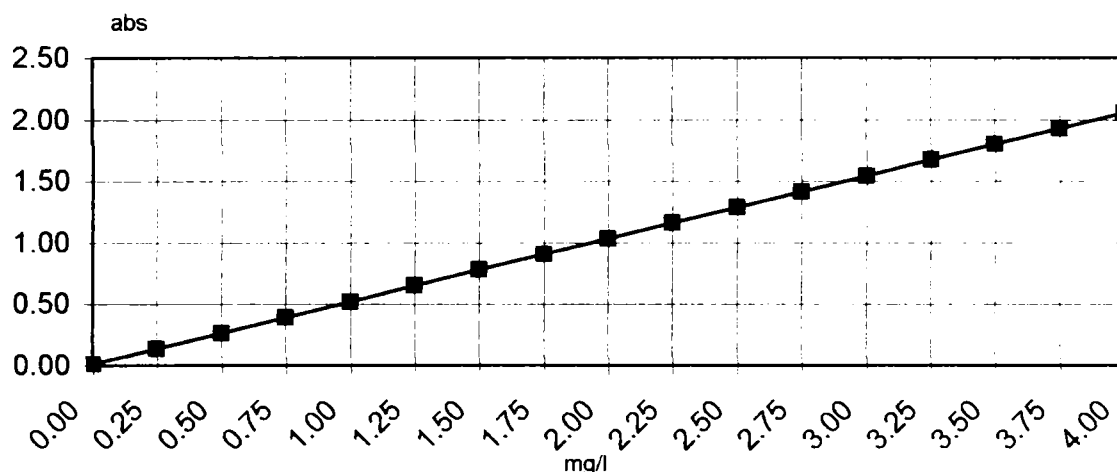
Valoarea absorbantei în funcție de concentrația ionului amoniu este redată în tab.7.5 și graficul din fig.7.3 pentru domeniul 0-4 mg/l.

Probelor analizate care au avut concentrații mai mari decât 4 mg/l au fost diluate corespunzător.

Tab.7.5 Determinarea curbei de etalonare pentru dozarea ionului amoniu.

Nr. crt.	SOLUȚIE STANDARD DE AMONIU ml	APĂ DISTILATĂ ml	REACTIV NESSLER ml	TARTRAT DE SODIU ȘI POTASIU ml	CONC. DE AMONIU ÎN PROBA CITITĂ mg/l	ABSORBANȚA LA $\lambda = 440\text{nm}$
1.	0,00	50,00	2	2	0,00	0,000
2.	0,25	49,75			0,25	0,1296
3.	0,50	49,50			0,50	0,2592
4.	0,75	49,25			0,75	0,3888
5.	1,00	49,00			1,00	0,5501
6.	1,25	48,75			1,25	0,6480
7.	1,50	48,50			1,50	0,7776
8.	1,75	48,25			1,75	0,9073
9.	2,00	48,00			2,00	1,0255
10.	2,25	47,75			2,25	1,1665
11.	2,50	47,50			2,50	1,2961
12.	2,75	47,25			2,75	1,4257
13.	3,00	47,00			3,00	1,5355
14.	3,25	46,75			3,25	1,6849
15.	3,50	46,50			3,50	1,8145
16.	3,75	46,25			3,75	1,9441
17.	4,00	46,00			4,00	2,0067

Fig. 7.3. Curba de etalonare pentru dozarea ionului amoniu prin metoda Nessler



Pentru valorile determinate ale extincției funcție de concentrațiile diferite ale etalonului, ecuația de regresie corespunde unei drepte de forma:

$$y = 0,51116(\pm 0,005940)x - 0,010627(\pm 0,013931)$$

iar gradul de corelație este:

$$r = 99,97\%$$

7.4.2. Determinarea clorurilor

Pentru determinarea clorurilor s-a aplicat o metodă argentometrică standardizată folosită în practica curentă la analiza apelor uzate (STAS 8663 – 70)

În soluția adusă la pH = 8,3 clorurile sunt determinate prin titrare cu azotat de argint în prezență de K_2CrO_4 ca indicator, până la apariția precipitatului galben-cărămiziu de cromat de argint.

RECTIVI

- soluție de cromat de potasiu (obținută prin dizolvarea a 50g K_2CrO_4 în puțină apă bidistilată, adaugarea de soluție de $AgNO_3$ până la formarea unui precipitat roșu slab, decantare filtrare și diluare la 1000ml cu apă bidistilată)
- soluție $AgNO_3$ 0,0282 N.

MODUL DE LUCRU

50ml apă de analizat se aduc la punctul de viraj cu H_2SO_4 sau $NaOH$ în prezență de fenolftaleină, se adaugă 1ml sol. K_2CrO_4 și se titrează cu soluție 0,0282 N $AgNO_3$ până la apariția culorii galben-cărămiziu. În paralel se prelucrează o probă martor cu apă bidistilată.

Dacă proba are un conținut mai mare de 20 mg/l cloruri, ea trebuie diluată corespunzător.

7.5. Rezultate și discuții

7.5.1. Conținutul de proteine din apele uzate "model" și din apele uzate recoltate de la abatoare

Rezultatele analizelor privind conținutul de proteine din apele uzate luate în lucru sunt redate în tab.7.6. Din tabel rezultă că extractele de carne preparate în laborator folosind soluții de electroliți conțin cantități însemnate de proteine; doar extracția cu apă a dus la concentrații mai mici. Există o concordanță între ordinul de mărime al conținutului de proteine din extractele de carne și cel din apele uzate reale. În cazul în care s-a asigurat o agitare mai intensă, conținutul de proteină din extract a fost mai mare; probele 1-7 au fost agitate manual, iar 8-18 cu ajutorul unui agitator magnetic.

Probele ale căror concentrații au depășit domeniul pentru care au fost trasate curbele de etalonare s-au diluat corespunzător.

Tab.7.6 Conținutul de proteine al unor "modele" de ape uzate A și al apelor uzate propriu-zise B

Nr. crt.	NATURA APEI	Tărie ionică	Timp extracție min	Conținut de proteine (met.Gornall) mg/l	pH	Obs.
A: "MODELE" DE APE UZATE						
1.	Extract de carne, agent de extracție apa	0,00	20	328	5,3	
2.	Idem, agent NH ₄ Cl 0,5%	0,09	20	827	5,4	910*
3.	Idem, agent NaCl 0,5%	0,09	20	854	5,3	925*
4.	Idem, agent NH ₄ Cl 1,5%	0,26	20	736	5,4	800*
5.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	20	831	5,4	
6.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	20	862	5,3	
7.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	20	831	5,3	890*
8.	Idem, agent NH ₄ Cl 1,5%	0,26	40	1152	5,4	
9.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	60	1756	5,5	
10.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	40	1007	5,0	
11.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	40	1223	5,4	
12.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	60	1449	5,2	
13.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	40	1189	5,3	
14.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	40	1254	5,2	

15.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	60	1872	5,2	
16.	Idem, agent NaCl 1,5%	0,26	90	2239	5,3	
17.	Idem, agent NaCl 15%	2,80	40	1103	5,3	
18.	Idem, agent NaCl 15%	2,80	60	1852	5,4	

B. APE UZATE PROPRIU ZISE

Nr. crt.	NATURA APEI			Conținut de proteine mg/l	pH	NH ₄ ⁺ mg/l	Cl ⁻ mg/l	Obs.
19.	Apă uzată recoltată din abator, efluent general			411**	7,0	0,6	120	
20.	Idem, efluent general			900**	6,5	1,3	116	
21.	Idem, spălare carcase			1176	6,5	-	80	1200*
22.	Idem, stocare organe			598	6,1	4	103	
23.	Idem, stocare organe			636	6,1	5	112	
24.	Idem, fierbere salam			204	6,2	12	204***	
25.	Idem, fierbere salam			373	6,2	12	426	
26.	Idem, fierbere salam			326	6,4	12	605	
27.	Idem, fierbere organe			755	6,2	172	354	
28.	Idem, fierbere organe			864	6,3	181	327	
29.	Idem, fierbere organe			671	6,2	175	338	
30.	Idem, fierbere organe			853	6,2	196	346	
31.	Idem, fierbere organe			1193	6,4	198	593	1290*
32.	Idem, fierbere organe			2557	6,2	192	1083***	
33.	Idem, fierbere organe			4008	5,3	193	5985	
34.	Idem, fierbere organe			750	5,4	231	650	
35.	Idem, fierbere organe			8807	6,4	242	944	
36.	Idem, fierbere organe			4463	7,2	160	312	
37.	Idem, fierbere organe			4314	6,5	162	4400***	
38.	Idem, fierbere organe			750	5,9	231,5	650	

* Conținutul de proteine determinat prin metoda Lowry

** Probe recoltate din efluentul general în condițiile funcționării abatorului la o mică utilizare a capacității de fabricație și la funcționarea doar a fazei de tăiere

*** Produs dietetic și respectiv organe pregătite pentru produse picante

Extractele de carne obținute cu soluții cu tărie ionică mică și cele cu tărie ionică mare au conținut cantități asemănătoare de proteine ceea ce, corelat cu informațiile din literatură [7], potrivit cărora proteinele miofibrilare se extrag la $\mu < 0,3$ iar cele sarcoplasmice la $\mu < 0,1$, permite presupunerea că extractele preparate în laborator conțin ambele categorii de proteine.

În ceea ce privește apele uzate reale, se constată că unele faze, cum este fierberea, produc concentrații mari, motiv pentru care atenția a fost concentrată în

continuare asupra acestor faze. Recoltarea apei uzate din faza de fierbere prezintă și avantajul că oferă garanția unei ape proaspete și lipsite de infestare microbiologică.

Rezultatele analizelor prin metoda Lowry și prin metoda Gornall s-au dovedit a fi comparabile, de același ordin de mărime, deși procedeul Lowry a dus în mod sistematic la valori mai mari ceea ce este în concordanță cu acele indicații din literatură potrivit cărora produce rezultate supraestimate pentru unele proteine (globuline) [65].

Tab. 7.7 Rezultate comparative ale analizelor unor probe prin metodele Gornall și Lowry

NUMĂRUL PROBEI	CONȚINUTUL DE PROTEINE mg/l	
	METODA GORNALL	METODA LOWRY
2	827	910
3	854	925
4	736	800
7	831	890
31	1193	1290

Una dintre probe (nr.21) a fost tratată cu cărbune activ pentru a elimina opalescența care deranjează determinările prin metoda Gornall. În toate celelalte cazuri opalescența uneori prezentă a dispărut la adăugarea reactivului Gornall, rezultând o soluție clară.

Pentru a constata care este ponderea proteinelor în încărcarea organică a apelor uzate, în paralel cu analiza conținutului de proteină s-au executat și analize privind indicatorii de poluare urmăriți curent la apele uzate. Astfel, o probă din efluentul general al unui abator a conținut 1008mg/l azot organic (metoda prin mineralizare) și a avut o valoare a indicelui de poluare consum chimic de oxigen CCO_{Mn} de 217mg O_2/l . Probele nr.19 și 20 din tab.7.6 supuse analizelor curente privind încărcarea cu poluanți au dus la rezultatele din tab.7.8. Analizele au fost efectuate folosind metodele standardizate pentru apele de suprafață și pentru apele uzate, cuprinse în STAS 6560 – 82 (Determinarea consumului biochimic de oxigen – CBO_5 - care constă în menținerea probei la incubare timp de 5 zile la 20°C și determinarea diferenței de concentrație a oxigenului dizolvat la începutul și la sfârșitul perioadei de incubare; dozarea oxigenului dizolvat se bazează pe oxidarea de către oxigenul molecular din apă, în mediu puternic alcalin, a hidroxidului de mangan bivalent în hidroxid trivalent, eliberarea de către acesta a iodului din iodurile alcaline și determinarea acestuia cu tiosulfat de sodiu, STAS 6953 – 81 (Determinarea materiilor în suspensie, prin filtrare și uscare), STAS 3002 – 85 (Determinarea consumului chimic de oxigen – CCO_{Mn} – prin oxidarea substanțelor organice cu permanganat de potasiu), STAS 9187 - 84 (Determinarea reziduuului filtrabil la 105°C) și metoda Gornall pentru determinarea proteinelor.

Tab.7.8 Analizele efluentului general

INDICATORUL	U.M.	PROBA		OBSERVAȚII
		NR.19	NR.20	
pH		7,0	6,5	
Amoniu	mg/l	0,62	1,31	
Reziduu fix	mg/l	538	726	
Materii în suspensie	mg/l	80	366	
Consum biochimic de oxigen (CBO ₅)	mg/l	210	231	Măsură a încărcării organice
Consum chimic de oxigen (CCO _{Mn})	mg/l	237	474	Măsură a încărcării organice
Proteine	mg/l	411	900	

Aceste date confirmă faptul că efluenții de la abatoare, bogați în substanțe organice sunt bogați de fapt în proteine.

Determinările efectuate pentru urmărirea conținutului de proteine din apele uzate permit următoarele concluzii:

- Metoda Gornall este potrivită pentru determinarea conținutului de proteine din apele uzate de la abatoare.
- Apele uzate studiate sunt bogate în proteine, în special apele de la unele faze tehnologice cum este fierberea.

7.5.2. Alți indicatori ai apelor uzate de la abatoare

Alți indicatori importanți ai apelor uzate sunt pH-ul, conținutul de ioni amoniu și conținutul de cloruri. Rezultatele determinării acestor indicatori sunt redată în tab.7.6.

a) pH-ul apelor

Extractele de carne au avut pH-ul cuprins între 5,0-5,5, dar la apele uzate s-au înregistrat și pH-uri mai mari, între 6,4-7,2. Diferențele se pot explica prin procesele post sacrificare din carne, extractele fiind obținute întotdeauna din carne care a suferit procesul de rigiditate și de maturare pe când apele uzate au luat naștere în contact cu carne proaspătă care nu a trecut prin aceste procese. Se cunoaște că în timpul rigidizării are loc acumulare de acid lactic cu scăderea pH-ului de la 7-7,1 la 5,3-5,8 datorită degradării anaerobe a glicogenului [7]. Odată cu modificarea de pH se modifică și extractibilitatea proteinelor: crește cantitatea de actinomiozină extrasă și scade extractibilitatea proteinelor sarcoplasmice ca urmare a unor procese de denaturare și agregare influențate de pH.

b) Conținutul de ioni amoniu

Conținutul de ioni amoniu al extractelor de carne a fost de aproximativ 1,5mg/l cu excepția extractelor 4 și 8 care s-au preparat în prezența NH₄Cl (5,1 mg/l NH₄⁺). Valorile scăzute ale concentrației ionului amoniu indică un grad scăzut de hidroliză a proteinelor și în același timp reprezintă un factor minor de interferență în timpul analizei conținutului de proteine.

În apele uzate reale, concentrația ionilor de amoniu a fost în general mai mare, ajungând în apele puternic încărcate de la fierbere la peste 150-200mg/l, ceea ce înseamnă că de această dată are loc hidroliza proteinelor, dar concentrațiile se găsesc sub limita pentru care s-a făcut verificarea lipsei unei influențe a ionului amoniu asupra determinărilor de proteine prin metoda Gornall (tab.7.3. și 7.6)

c) Conținutul de cloruri

Conținutul de clorură de sodiu al extractelor de carne a fost reglat în mod deliberat astfel ca în unele cazuri tăria ionică să fie sub 0,1, în altele să fie în jur de 0,3 și în altele să fie mai mare, apropiată de eventualele vârfuri de concentrație din apele reale .

În apele uzate reale provenite de la fierbere, clorurile au avut concentrații cuprinse între 312-4400 mg/dm³, corespunzător unor tării ionice cuprinse între 0,009 și 0,12. Desigur tăria ionică reală a apelor respective ar fi putut fi crescută de prezența și a altor electroliți proveniți din carne, din alte materiale folosite în tehnologie, cum sunt azotatul și azotitul de sodiu și de potasiu și polifosfații.

8. SEPARAREA SI FRACTIONAREA PROTEINELOR DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE

8.1. Precipitarea proteinelor din apele uzate la punctul izoelectric

Valoarea pH-ului izoelectric al proteinelor diferă funcție de natura radicalilor din catenele laterale ale resturilor de aminoacizi, ceea ce permite separarea lor fracționată dintr-un amestec.

Pentru modificarea pH-ului probelor s-au folosit soluții tampon adăugate până la atingerea pH-ului dorit, sau, din cauză că într-un amestec complex și variabil cum este apa uzată este greu de stabilit de la început care este pH-ul la care trebuie ajuns, soluțiile tampon au fost adăugate continuu dintr-o biuretă, urmărindu-se în paralel valoarea pH-ului și modificarea stării probei. O astfel de precipitare este descrisă în continuare.

MODUL DE LUCRU

Într-un pahar Berzelius, la 100ml extract de carne cu pH=5,4 cu un conținut de 831mg/l proteine s-au adăugat 4,8ml soluție tampon acid acetic-fosfat disodic cu pH=3,3, rezultând o soluție tulbure cu pH=4,6 care s-a filtrat pe hârtie cu bandă neagră. Precipitatul, maroniu, 0,0303g, nu s-a putut redizolva în apă.

Filtratul, 96 ml cu un conținut de 400 mg/l proteine (46,2% din inițial) a fost tratat cu 27,5 ml din aceeași soluție tampon când a rezultat un precipitat abundent albicios care s-a filtrat pe hârtie cu bandă neagră. Precipitatul a fost parțial solubil în apă; precipitatul dizolvat în apă a produs o soluție cu un conținut de 8,42 mg proteine.

Noului filtrat cu pH=4,5 și 63,86 mg/l proteine (10,8% din cantitatea inițială) i s-au adăugat încă 23 ml soluție tampon când a apărut o turbureală sub formă de "scame" la pH=3,35.

Filtratul final a avut un conținut de 57,2 mg/l proteine (8,6% din cantitatea inițială).

Tratarea succesivă cu soluție tampon și reducerea pH-ului de la 5,4 la 3,3 a produs o reducere a conținutului de proteine ceea ce demonstrează că deși precipitatele nu au putut fi analizate întotdeauna, ele au conținut proteine separate din apă. S-a încercat precipitarea în domeniu alcalin conform următorului procedeu: 100 ml din același extract cu pH=5,4 a fost amestecat cu 25 ml soluție tampon fosfat disodic de pH=9,0 și a fost adus succesiv la pH=7,1 și apoi până la pH=9, fără a se constata apariția vre-unui precipitat.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele probelor privind separarea proteinelor din apele uzate la punctul izoelectric sunt redate în tabelul 8.1.

Tabelul 8.1. Precipitarea proteinelor din apele uzate la punctul izoelectric

Nr crt	NATURA ȘI INDICATORI AI APEI TRATATE			pH-ul PROBEI DUPĂ ADĂUGAREA DE SOLUȚIE TAMPON													Peste 7
	NATURA APEI	pH	PROTEINE	3,2	3,3	3,4	3,6	4,1	4,3	4,5	4,6	5,2	5,4	5,9	6,7		
1	EXTRACT DE CARNE	5,2	1872,5	A													
2	EXTRACT DE CARNE	5,2	1449			P			p	p	p						
3	EXTRACT DE CARNE	5,4	1223						p	p	p		N	N	N		
4	EXTRACT DE CARNE	5,4	831		p					A	P						N
5	APĂ DE LA FIERBERE	5,3	4000				P		P								
6	APĂ DE LA FIERBERE	6,4	8807	p								N					
7	APĂ DE LA FIERBERE	7,2	4663					p									

Legendă :
 A – precipitare abundentă;
 P – precipitare;
 p – precipitare slabă;
 N – nu are loc precipitarea.

Câteva particularități ale probelor cuprinse în tabelul 8.1. sunt redate în continuare.

- Proba nr. 1 a produs un precipitat abundent la scăderea pH-ului la 3,2 cu tampon acid citric-fosfat. Filtratul rămas după separarea precipitatului s-a tratat cu sulfat de amoniu până la saturație 90% când s-a produs un nou precipitat. Filtratul final a conținut 104,95 mg/dm³ proteine adică sub 10% din valoarea inițială. Combinarea metodei de precipitare la punctul izoelectric cu salifierea a dus deci la separarea proteinelor în proporție de peste 90%.

Faptul că precipitarea a avut loc la pH=3,2 poate constitui un indiciu cu privire la natura precipitatului dat fiind că mioalbumina are punctul izoelectric în acest domeniu (tabelul 3.4.).

- Proba nr. 2 a produs precipitarea la pH=3,4 a unui precipitat albicios ușor filtrabil care a conținut 88,47% din proteinele inițiale din extract.

- Proba nr.3 a produs la adăugarea de tampon acid citric – fosfat disodic o precipitare slabă. Precipitatul separat prin centrifugare la 4500 rot/min a avut aspectul unei gume care nu s-a putut redizolva în apă.

- Proba nr. 4 a produs precipitarea netă în domeniul pH=4,5÷4,6 și o precipitare slabă la pH=3,3 datorită, probabil, calității diferite de carne luate în lucru la prepararea extractului.

- Proba nr. 5, efectuată cu apă uzată reală a produs la pH=3,6 un precipitat care nu a putut fi redizolvat în apă. Filtratul a avut un conținut de 876 mg/dm³ proteine (43,7% din cantitatea inițială).

Aceeași apă, la pH=4,3 a produs un precipitat care, reluat cu 50 ml apă a produs o soluție cu 606 mg/l proteine iar filtratul rămas după separarea precipitatului a conținut 1155 mg/dm³ proteine, adică 31% din cantitatea inițială.

- Proba nr. 6 constituie un exemplu pentru situațiile când rezultatele precipitării nu sunt atât de nete. Tratarea probei cu soluție tampon nu a produs precipitare la pH=5,2 iar la pH=4,9 soluția și-a schimbat consistența devenind nefiltrabilă. La pH=3,2 soluția s-a tulburat puternic.

Această apă s-a comportat deosebit față de celelalte ape luate în lucru și la salifiere.

Conținutul ridicat de collagen și eventual de miozină care ca și collagenul are tendința de a forma geluri pe măsură ce este denaturat [7,8] se poate face responsabil pentru comportamentul deosebit al apei uzate.

- Proba nr. 7 adusă la pH=4,14 a precipitat; precipitatul filtrat și reluat cu 50 ml apă a dus la o soluție cu un conținut de proteine de 285,6 mg/l. O a doua încercare de modificare (scădere) a pH-ului a dus la un amestec nefiltrabil.

Precipitarea la punctul izoelectric este o metodă aplicabilă pentru separarea proteinelor din apele uzate. Domeniul de pH cuprins între 3,2 și 3,6 care corespunde aproximativ punctului izoelectric al mioalbuminelor s-a dovedit a fi cel mai potrivit pentru precipitări dar și în domeniul 4,3-4,6 se produce precipitarea proteinelor.

Randamentele de separare a proteinelor, înregistrate experimental, au fost de până la 92% în cazul extractelor de carne și de 56-70% la apele reale.

Dezavantajele precipitării la punctul izoelectric constau în formarea, în cazul unora din apele uzate, a unor precipitate greu separabile și în precipitarea uneori ireversibilă, cu formarea de proteine denaturate insolubile în apă.

8.2. Separarea și fracționarea prin salifiere a proteinelor din apele uzate

8.2.1. Precipitarea fracționată prin salifiere a proteinelor din apele uzate

În scopul precipitării și fracționării proteinelor se realizează în proba de apă concentrații crescânde de sulfat de amoniu, corespunzând la 30%, 60% și 90% din concentrația de saturație.

Concentrațiile de lucru alese corespund concentrațiilor de precipitare a α -globulinelor (30% saturație) și albuminelor (60% saturație), iar concentrația de 90% saturație permite precipitarea unor proteine greu precipitabile din probă.

Pentru a limita volumul preparatelor proteice, precipitarea s-a efectuat cu sulfat de amoniu ca atare.

MODUL DE LUCRU

Într-un pahar Berzelius se introduc 100 ml apă care conține proteine și se adaugă 17,60 g sulfat de amoniu solid, cantitatea necesară pentru realizarea saturației de 30%. După agitare se lasă 30 de minute la rece, apoi precipitatul se separă fie prin centrifugare la 4000 rotații pe minut fie prin filtrare pe hârtie cu bandă neagră.

Precipitatul se reia într-un pahar Berzelius cu 50 ml apă distilată iar în soluția rezultată se determină conținutul de proteine. Rezultatele sunt cuprinse în tab.8.2.

Filtratul rezultat la separarea anterioară (filtratul 1) se tratează în continuare cu sulfat de amoniu pentru a ajunge la saturație 60%.

Astfel, peste filtratul 1 (70ml) se adaugă 13,86 g sulfat de amoniu, se lasă 30 de minute la rece, se filtrează sau se centrifughează (filtratul 2). Precipitatul se reia cu 50 ml apă distilată iar soluția rezultată se analizează pentru a determina conținutul de proteine.

Filtratul 2 rezultat la separarea anterioară se tratează în continuare cu sulfat de amoniu pentru a ajunge la saturație 90%.

Filtratul (65ml) se amestecă cu 14,8 g sulfat de amoniu, se agită, se lasă 30 de minute la rece, precipitatul se separă prin filtrare sau centrifugare, precipitatul se reia cu 50 ml apă distilată și soluția rezultată se analizează pentru a determina conținutul de proteine.

Schema procedurii aplicat pentru precipitarea-fraționarea proteinelor este redată în fig. 8.1 iar rezultatele sunt cele din tab. 8.2.

Din cauză că precipitarea prin salifiere este influențată de pH-ul la care are loc operația, solubilitatea proteinei fiind minimă la pH-ul izoelectric, s-au executat precipitări din soluții tamponate la pH-uri diferite astfel încât să fie posibilă atingerea punctului izoelectric al diferitelor proteine din amestec. S-au folosit soluții tampon acid citric-fosfat sau tampon acetat pentru $\text{pH} < 6$ și tampon fosfat în domeniul de $\text{pH} \geq 6$.

Unele din apele supuse salifierii și unele soluții rezultate prin redizolvarea precipitatelor rezultate în urma salifierii au fost opalescente. Opalescența a fost determinată cu un turbidimetru de laborator model 2001N HACH, folosit în mod curent pentru determinarea turbidității apei potabile, cu domeniul de măsură 0 – 4000 NTU. Astfel, o probă de apă pregătită pentru salifiere, cu conținut inițial de proteine de 997mg/l a avut turbiditatea de 342mg/l NTU. Precipitatele rezultate după salifierea la 30% și 60% saturație au produs prin redizolvarea în apă soluții cu turbiditatea de 101 NTU și respectiv 194 NTU. Probele prelevate din aceste soluții pentru analiza conținutului de proteine și tratate cu reactiv Gornall au avut turbidități mult scăzute, comparabile cu cele ale apei, și anume 0,86 NTU în cazul apei inițiale, 0,37 NTU în cazul soluției de la 30% saturație și 0,33 NTU în cazul celei de la saturația de 60%.

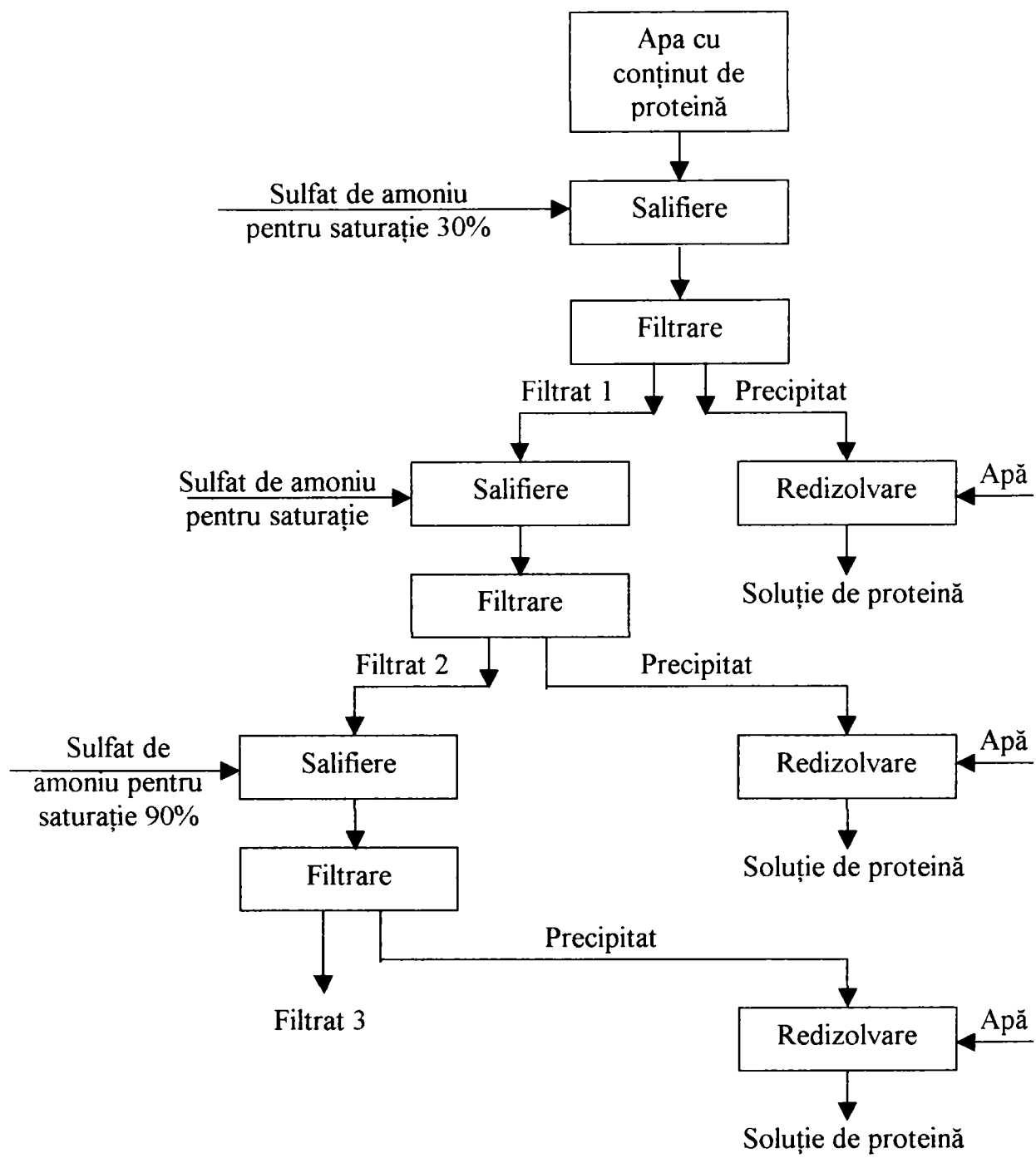


Fig. 8.1. Schema de principiu a procesului de precipitare-fracționare prin salifiere

Tab. 8.2. Precipitarea fracționată a proteinelor din ape uzate prin salifiere cu sulfat de amoniu

Nr. crt.	PROBA PRELUCRATĂ		PROTEINE ÎNAINTE DE SEPARARE						PROTEINE SEPARATE												OBSERVAȚII	
			LA SATURAȚIE 30%			LA SATURAȚIE 60%			LA SATURAȚIE 90%			LA SATURAȚIE 90%										
			Natura probei	Caracteristici	Volum soluție ml	Conc. mg/l	Cant. mg	Vol. reluare ml	Conc. mg/l	Cant. mg	Vol. reluare ml	Conc. mg/l	Cant. mg	Vol. reluare ml	Conc. mg/l	Cant. mg	Vol. reluare ml	Conc. mg/l	Cant. mg	Vol. reluare ml		Proc. din total %
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				
1	Extract de carne	Extract cu NH ₄ Cl 1,5%	100	1152	115,2	50	1805	90,3	78,4	50	131,5	6,6	5,7	50	122,9	6,1	5,3					
2	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% pH=5,5	100	1756	175,6	50	2197	109,8	62,2	50	333,9	16,7	9,4	50	187,2	9,3	5,3					
3	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% pH=5,0	100	1007	100,7	100	395	39,5	39,2	50	311,6	15,6	15,5	50	70,3	3,5	3,5					
4	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% pH=5,4	50	1223	61,2	50	212	10,6	17,3	50	243,3	12,1	19,8	50	45,3	2,2	3,6					
5	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% tamponat pH=4,2	100	1223	122,3	50	153	7,6	6,2	50	140,6	7,0	5,7	50	0,0	0,0	0,0					
6	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% tamponat pH=5,4	100	1223	122,3	50	1055	52,2	42,8	50	608,4	30,4	24,8	50	0,0	0,0	0,0					
7	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% tamponat pH=5,9	100	1223	122,3	50	213,7	10,7	8,7	50	906,6	45,3	37,0	50	35,4	1,7	1,4					
8	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% tamponat pH=6,7	100	1223	122,3	50	46,5	2,3	1,9	50	568,8	28,4	23,2	50	109,6	5,5	4,5					
9	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% pH=5,2	100	1449	144,9	50	676,5	33,8	23,3	50	818,8	40,9	28,2	50								
10	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% tamponat pH=3,2	100	462	46,2	50	62,0	3,1	7,3	50	538,0	26,9	63,1	50	0,0	0,0	0,0					
11	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5% pH=5,4	100	1254	125,4	80	181,7	14,5	11,5	68	563,5	38,3	30,3	90	246,0	22,1	17,6					Precipitatele reluate în apă au conținut 2130, 6135 și respectiv 23110 mg l azotat de amoniu
12	Extract de carne	Extract cu NaCl 1,5%	100	2239	223,9	50	316,0	15,8	7,0	50	694,7	34,7	15,5	50	0,0	0,0	0,0					

13	Extract de carne	Extract cu NaCl 15% pH=5,4	100	1103	110,3	50	292,5	14,6	13,2	50	294,3	14,7	13,3	50	92,1	4,6	4,2
14	Apă uzată de la fierbere	Cl ⁻ =1082,75 mg/l	100	2557	255,7	50	585,0	29,2	11,4	50	109,3	5,5	2,1	50	147,6	7,3	2,8
15	Apă uzată de la fierbere	tamponată la pH=5,0	100	1193	119,3	50	92,1	4,6	3,9	50	1394,0	69,7	58,4	50	59,9	3,0	2,5
16	Apă uzată de la fierbere	tamponată la pH=4,2	100	853	85,3	50	76,2	3,8	4,5	50	1048,3	52,4	61,4	50	51,8	2,6	3,1
17	Apă uzată de la fierbere	tamponată la pH=5,4	100	750	75,0	50	94,3	4,7	6,3	50	864,5	43,2	57,6	50	54,1	2,7	3,6
18	Apă uzată de la fierbere	tamponată la pH=4,3	100	4134	431,4	100	482,8	48,3	11,2	100	2364,1	236,4	54,8	100	224,5	22,4	5,2
19	Apă uzată de la fierbere	pH=6,4 Cl ⁻ =944,3 mg/l	100	8807	880,7	100	1371	137,1	15,4	150	230,2	34,5	3,9	50	32,5	1,6	0,2
20	Apă uzată de la fierbere	pH=7,2	100	4463	446,3					50	186,0	9,3	2,0	50	294,0	14,7	3,1
21	Apă uzată de la fierbere	NH ₄ ⁺ =192,8 mg/l Cl ⁻ =5985 mg/l Tamponat la pH=3,6	50	4008	200,4	50	204	10,2	5,1	50	344,4	17,2	8,6	50	130,3	6,4	3,2
22	Apă de la poziția 20 după 2 zile	pH=5,9	100	4735	473,5	50	428	21,4	4,5	50	1120,0	59,5	12,6	50	564,0	28,2	5,9
23	Apă uzată de la fierbere	pH=5,3	50	4008	200,4	50	80	4,0	2,0	50	661,0	33,0	16,5	50	231,8	11,6	5,8
24	Apă uzată de la fierbere	pH=6,8	50	4008	200,4	50	90	4,5	2,2	50	122,9	6,1	3,0	50	224,4	11,2	5,6
25	Apă uzată de la fierbere	pH=3,6	100	462	46,2	50	62	3,1	7,3	50	538,0	26,9	63,1	50	306,0	6,5	15,3
26	Apă uzată de la fierbere	pH=4,3	100	578	57,8	50	84	4,2	7,3	50	614,0	30,7	53,1	50	66,0	1,9	3,3

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele au evidențiat existența unor particularități și au dus la concluziile următoare:

- a) Este posibilă separarea și fracționarea proteinelor din apele uzate de la abatoare prin procedeul de salifiere cu sulfat de amoniu.
- b) Randamentele maxime de separare au fost de $70,7 \div 77,6$ % pentru extractele de carne și de $67,5 \div 75,7\%$ pentru apele uzate, obținute toate în domeniul de $pH=3,6 \div 5,5$, astfel că domeniul optim de pH pentru salifiere se suprapune cu bună aproximație peste domeniul găsit în cazul precipitării la punctul izoelectric.
- c) Deși rezultatele reflectă o diversitate corespunzătoare diversității inerente a materiilor prime prelucrate, se poate constata că în cazul extractelor de carne randamentul maxim de separare apare în majoritatea cazurilor la 30% saturație ceea ce denotă ponderea mai mare a globulinelor iar în cazul majorității probelor din ape uzate reale randamentul maxim este înregistrat la saturația de 60% ceea ce denotă preponderența moleculelor mai mici, cum sunt albuminele.

Creșterea gradului de saturație la 90% nu aduce în majoritatea cazurilor o creștere substanțială a randamentului de separare, de aceea este recomandabilă numai în cazul că recuperarea maximă a proteinelor este importantă sau epurarea avansată a apelor uzate o impune.

- d) Produsul obținut prin salifiere este puternic impurificat cu agentul de salifiere ceea ce impune pentru utilizări ulterioare operații de purificare.
- e) Modul în care decurge salifierea depinde în mare măsură de compoziția apei supuse tratamentului care la rândul ei depinde de compoziția și calitatea cărnii prelucrate și de tehnologia aplicată. Astfel, probele de la punctele 19 și 20 din tabelul 8.2. s-au comportat la salifiere diferit de celelalte probe.

Proba nr. 19 a fost recoltată dintr-o șarjă de fierbere foarte bogată în părți anatomice cu conținut de collagen, în condiții precare de omogenizare. La 30% saturație s-a depus o masă gelatinoasă care s-a putut separa prin decantare și care s-a redizolvat numai parțial în apă. La saturație 60% din soluția separată anterior s-a format masiv un precipitat alb spongios care, reluat cu apă s-a dizolvat numai parțial. La saturație 90% a apărut o opalizare care, după filtrare, a fost redizolvabilă în apă. Comportarea probei 20 se explică la fel.

- f) Deși separarea de masă gelatinoasă descrisă mai sus nu a avut loc la celelalte probe, în toate cazurile precipitatul separat la saturație 30% nu a fost complet solubil, după redizolvare rămânând un precipitat cu aspectul unei membrane depuse pe hârtia de filtru (care nu a fost cuprins în randamentele din tabelul 8.2.).

Este probabil că și în acest caz a avut loc separarea unor scleroproteine din apă.

- g) La analiza comportamentului deosebit al probelor nr.19 și 20 și la aprecierea naturii precipitatelor formate la saturație 30% trebuie luată în considerație și contribuția miozinei, proteina cu cea mai mare pondere procentuală în țesutul muscular.

Proprietățile miozinei pot explica fenomenele de mai sus. Astfel, în timpul depozitării la rece miozina își pierde solubilitatea prin denaturare, producând agregate care duc la opalizarea soluției. Denaturarea este mai puternică la $pH < 7$ și la concentrații mari de săruri, exact condițiile de la salifiere. Dacă concentrația miozinei este mai mare, prin denaturarea și degradarea ei se formează un gel[7].

Prezența miozinei în aceste probe mai este indicată de două constatări:

- toate extractele și majoritatea apelor uzate luate în lucru au avut un caracter acid mai puternic $pH=5,0\div 5,5$, iar proba 19 a avut $pH=6,4$, mai slab acid. Miozina are $pH_i=5,4$, pH la care nu a apărut un precipitat vizibil, dar au apărut semnele unei denaturări cu formare de gel;

- prin depozitare la rece miozina produce opalizarea soluției, ceea ce s-a și constatat la toate probele care au trebuit păstrate la rece de pe o zi pe alta.

- h) Influența naturii apei uzate este ilustrată și de unele probe necuprinse în tab.8.2., în care s-a încercat precipitarea și fracționarea proteinelor din apele de la fierberea salamurilor, o fază considerată înainte de începerea lucrărilor ca fiind poluantă și sursă de proteine. În realitate proteinele au fost prezente în aceste ape doar în concentrații mici (320-370 mg/l), iar sulfatul de amoniu nu a produs precipitarea la nici una din concentrațiile și pH -urile testate. Explicația poate fi aceea că la fierberea salamului trecerea compusului organic în apă are loc printr-o membrană semipermeabilă prin care pot trece doar moleculele mai mici, rezultate prin scindarea moleculelor de proteine. Aceste molecule conțin legături peptidice care se pun în evidență cu reactivul Gornall, deși sunt prea mici pentru a fi precipitate prin salifiere.

Proba recoltată la curățirea carcaselor după sacrificare nu a produs precipitat la saturația de 30%, la 60% saturație s-au separat 15,50% iar la 90% saturație 23,0% din totalul proteinelor ceea ce denotă prezența proteinelor cu greutate moleculară mică.

- i) O influență importantă asupra calității apei uzate și asupra comportării la salifiere o are vechimea apei. De obicei extractele preparate în laborator au fost prelucrate în stare proaspătă imediat după extracție. În cazul apelor uzate reale, apa proaspătă a însemnat efectuarea primelor operații după 24 ore, necesare transportului, răcirii și separării gravitaționale a grăsimilor și impurităților mecanice solide.

Un caz aparte îl reprezintă proba 22 care a fost reținută încă timp de două zile, după care s-a supus procesului de salifiere. La 72 ore după recoltare s-au obținut rezultatele cuprinse în tab. 8.3.

Modificările conținutului de ioni amoniu și de pH în apa brută indică faptul că proteinele au intrat într-un proces de degradare. Faptul că la saturație de 30% rămân mai multe proteine în soluție, că proteine de consistența celor precipitate inițial la 30% precipită la 60% și, în special, că în filtratul final rămâne un procent dublu din proteinele inițiale se poate pune pe seama procesului de degradare, moleculele proteice suferind degradări la fragmente mici și mai greu precipitabile.

Tab.8.3. Comportamentul la salifiere a probei funcție de vechime

CARACTERISTICA	A. APĂ PROSPĂTĂ	B. ACEEAȘI APĂ DUPĂ DOUA ZILE
Apa brută: pH proteine mg/l amoniu mg/l clururi mg/l	7.2 4663.4 160 312	5.9 4735.2 248 326
Comportament la saturație 30% amestecul nefiltrat filtratul precipitatul	- Opalescent intens - 203 mg/l proteine - gelatinos bogat, nefiltrabil	- Opalescent ușor - 650mg/l proteine - filtrabil
Comportament la saturație 60% Amestecul nefiltrat Filtratul Precipitatul	- Opalescent ușor - 187 mg/l proteine - filtrabil	- Opalescent - 200 mg/l proteine - gelatinos, asemănător cu cel de la pct Aa, dar încă filtrabil
Comportament la saturație 90% amestecul nefiltrat filtratul precipitatul	- Opalescent - 129 mg/l proteine (8.7% din total) - filtrabil	- Opalescent - 195 mg/l proteine (4.4% din total) - filtrabil

Apa uzată de la fierbere salam a avut după 7 zile un conținut de ioni amoniu de 19,1mg/dm³ față de 11,6mg/dm³ în stare proaspătă. În apa învechită nu s-a produs precipitarea la salifiere la nici una din concentrațiile (30% și 60% saturație) sau pH-urile (3,5 , 4,5 , 5,6 , 6,4 , 7,2) încercate. Fragmentele proteice au fost atât în apa inițială cât și după degradare prea mici pentru a precipita la salifiere.

8.2.2. Analiza prin electroforeză a precipitatelor de la salifiere

Rezultatele precipitării și fracționării proteinelor prin salifiere au fost verificate prin electroforeza precipitatelor de la salifiere, stabilindu-se conținutul de albumine și respectiv de globuline [8,77]

MATERIALE ȘI APARATURĂ

Pentru studiu s-a folosit aparatura KIT MIDIGEL PROTEINS, destinată separării proteinelor din serul sanguin sau din alte lichide biologice (urină, fluid cerebrospinal) și care separă proteinele din ser în 6 fracțiuni: albumină, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 și γ globulină. Electroforeza s-a făcut pe gel de agaroză, proteinele s-au pus în evidență cu colorant Roșu Ponceau, interpretarea s-a făcut cu un densitometru iar rezultatul este în procente din conținutul total de proteine pentru fiecare component al amestecului.

REACTIVI

- tampon barbituric, diluat la 1000ml cu apă distilată.
- soluție de decolorare, doza diluată la 2000ml cu apă distilată sau acid acetic 5%, în cantitate de 300ml pentru o doză de gel.
- colorant Roșu Ponceau, diluat la 1000ml cu apă distilată.

- folii de gel de agaroză pentru probe
- soluție de fixare preparată prin amestecarea a 90ml metanol, 20ml acid acetic glacial și 90ml apă distilată.

MODUL DE LUCRU

După aplicarea probei pe gel, aplicarea diferenței de potențial, fixare, uscare, colorare, probele s-au citit la densitometru la 520nm.

Electroforeza s-a făcut pentru patru tipuri de probe și anume:

- apa uzată ca atare (proba 1 din tab.7.4).
- soluții rezultate prin redizolvarea precipitatelor rezultate prin salifiere la 30% saturație la pH-uri diferite de precipitare (probele 2-4).
- soluții rezultate prin redizolvarea precipitatelor rezultate prin salifiere la 60% saturație la pH-uri diferite de precipitare (probele 5-7).
- soluții rezultate prin redizolvarea precipitatelor rezultate prin salifiere la 90% saturație la pH-uri diferite de precipitare (probele 8-10).

Rezultate și discuții

Rezultatele analizei prin electroforeză a proteinelor din precipitatele separate la salifiere sunt cuprinse în tab.8.4.

Se constată un conținut ridicat de albumină, în special la saturația de 30% iar între globuline un procent mai mare al fracțiunii β care conține și lipoproteinele.

Faptul că la proba nr.7 nu a avut loc migrarea sugerează că proteinele prezente în această probă se află la pH izoelectric.

Tab.8.4. Rezultatele analizei prin electroforeză a proteinelor separate prin salifiere din extracte și ape uzate

Nr. crt.	Natura probei	Conținut de proteine mg/l	Albumine %	Globuline %				Observații
				α_1	α_2	β	γ	
1.	Apa uzată de la fierbere	853	26,5	3,4	7,6	48,9	14,5	
2.	Extract de carne, precipitat la saturație 30% și redizolvat în 50ml apă	212,38	50	6	14	20	10	
3.	Extract de carne, precipitat la saturație 30% și redizolvat în 50ml apă, precipitat la pH=4,2	152,98	52	4	12	18	14	
4.	Extract de carne, precipitat la saturație 30% și redizolvat în 50ml apă, precipitat la pH=5,4	1055,2	48,5	-	10,5	21	13	
5.	Extract de carne, precipitat la saturație 60% și redizolvat în 50ml apă	243,4	39	6	10	20	25	
6.	Extract de carne, precipitat la saturație 30% și redizolvat în 50ml apă, precipitat la pH=4,2	281,2	55	2,5	7,5	20	15	
7.	Extract de carne, precipitat la saturație 60% și redizolvat în 50ml apă, precipitat la pH=5,4	608,4	-	-	-	-	-	Nu a migrat
8.	Extract de carne, precipitat la saturație 90% și redizolvat în 50ml apă	45,4	60	5	10	23	12	

8.2.3. Purificarea prin dializă a proteinelor separate prin salifiere

Soluțiile rezultate prin redizolvarea precipitatelor care s-au separat la 30% și 60% saturație a agentului de salifiere în 45 și 50ml apă au conținut 10.800mg/l și respectiv 19.375mg/l ioni sulfat, ceea ce înseamnă că 2,76% și 2,60% din agentul de salifiere utilizat s-a regăsit în produsul precipitat. Aceleași probe au conținut 2197mg/l și respectiv 333,9mg/l proteină, adică raportul proteină.sulfat de amoniu a fost 1:4,9 și 1:58,0.

Pentru eliminarea sulfatului de amoniu s-a apelat la dializă, iar conținutul în sulfați a fost urmărit prin metoda colorimetrică.

Determinarea colorimetrică a ionului sulfat [113]

Metoda constă în precipitarea ionului sulfat cu o cantitate cunoscută, în exces, de BaCl₂, precipitarea ionului Ba²⁺ în exces cu K₂CrO₄ și colorimetrarea excesului de cromat la $\lambda=380-400\text{nm}$. Metoda se poate aplica până la o concentrație de 200mg/l sulfat fără diluție.

REACTIVI

- soluție de clorură de bariu, obținută prin aducerea la 1000ml cu apă distilată a unui amestec de 11,2214g BaCl₂·2H₂O cu 250ml etanol și 10ml HCl 37%.

- soluție de cromat de potasiu, obținută prin dizolvare unui amestec de 0,9710g și 25ml NH₄OH 25% în 1000ml apă distilată.

- soluție standard de sulfat preparată prin dizolvarea a 1,4786g Na₂SO₄ anhidru sau 2,5657g MgSO₄·7H₂O în 1000ml apă distilată; 1ml soluție etalon corespunde la 1mg SO₄²⁻.

MODUL DE LUCRU pentru trasarea curbei de etalonare

În baloane cotate de 100ml se măsoară câte 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10ml soluție etalon și se aduc la semn cu apă distilată. Din fiecare balon se scot câte 20ml în pahare Berzelius și se pun la fiert. Când începe să fiarbă se adaugă în fiecare pahar 10 ml BaCl₂ în picături. Soluțiile cu suspensiile formate se răcesc complet. După răcire, se adaugă câte 10 ml K₂CrO₄ și se agită foarte bine. După 10 minute soluțiile cu precipitate se trec cantitativ în baloane cotate de 50 ml și se aduc la semn cu apă distilată. Se filtrează pe hârtie cu bandă albastră sau se centrifughează. Proba filtrată se determină la 380-400 nm față de proba martor, în cuvă de 1 cm. S-au obținut rezultatele din tab.8.5. pentru 0-10 mg/l iar curba de etalonare este redată în fig. 8.2.

Din datele experimentale a rezultat ecuația:

$$y = 0,012337(\pm 0,000229)x - 0,008710(\pm 0,013536)$$

și

$$r = 99,95\%$$

Tab. 8.5. Curba de etalonare pentru dozarea colorimetrică a ionului sulfat

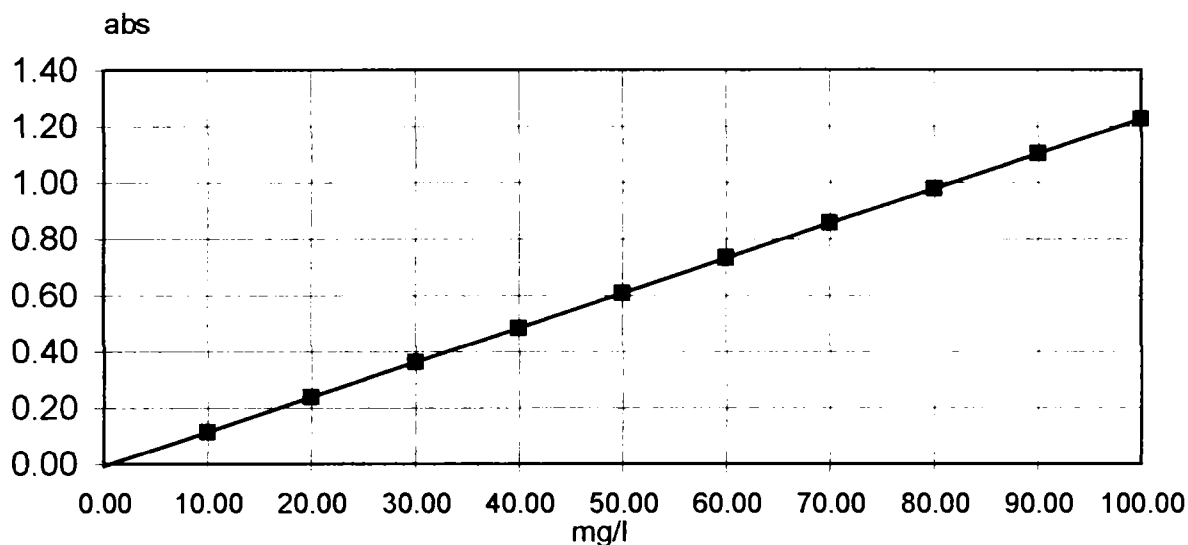
Nr. crt.	SOLUȚIE STANDARD DE SULFAT ml	APĂ DISTILATĂ ml	CONCENTRAȚIA DE SULFAT ÎN PROBA CITITĂ mg/l	ABSORBANȚA $\lambda=380$ nm
	0,0	100,0	0	0,000
	1,0	99,0	10	0,1136
	2,0	98,0	20	0,2419
	3,0	97,0	30	0,3628
	4,0	96,0	40	0,4837
	5,0	95,0	50	0,6023
	6,0	94,0	60	0,7256
	7,0	93,0	70	0,8466
	8,0	92,0	80	0,9675
	9,0	91,0	90	1,0884
	10,0	90,0	100	1,2570

Pentru concentrații mai mari ale probelor de analizat, acestea au fost diluate corespunzător.

MODUL DE LUCRU pentru dializă

În sacul de dializă s-au introdus 50ml probă, produs separat prin salifiere și redizolvat în apă. Săculețul s-a suspendat într-un vas cu 100ml apă și s-a lăsat în această stare timp de 72 ore, apa din vas fiind ținută la temperatură scăzută (4°C) sub agitare.

Fig. 8.2. Curba etalon pentru dozarea sulfatilor



Rezultate și discuții

Analizele și măsurătorile efectuate după dializă au indicat următoarele modificări față de stare inițială:

- Volumul de lichid din sacul de dializă a scăzut de la 50ml la 18ml iar cel din vas a crescut de la 100ml la 120ml.
- În cei 120ml apă din vas a apărut o concentrație de proteine de 36,26mg/l.
- Concentrația ionului sulfat a scăzut în proba supusă dializei de la 10.800mg/l la 2.500mg/l, adică din 540mg au mai rămas în probă 45mg.

Dializa a fost testată ca metodă de separare a ionilor sulfat și amoniu din amestec și concentrațiile de proteine nu au fost urmărite astfel încât să se realizeze un bilanț al lor. Totuși la această primă probă s-a verificat posibilitatea unor pierderi și s-a constatat că prin sacul de dializă au trecut 4,35 mg proteine (corespunzător concentrației de 36,26mg/l) din totalul inițial de 109,85 mg (corespunzător concentrației de 2197 mg/l), iar cantitatea finală rămasă în soluția a fost de 95mg (la o concentrație de 5277 mg/l).

În mod similar, o probă care a conținut inițial 715,52mg a ajuns după dializă la 128,52mg ion sulfat. Eliminarea ionului sulfat s-a făcut în proporție de 82%.

O nouă încercare a fost efectuată folosindu-se precipitatul format prin salifierea la 30% saturație, redizolvat în 70ml apă. Soluția supusă dializei a conținut 590,72mg/l proteine și 6788mg/l NH_4^+ .

Din cantitatea inițială de 169,7mg ioni amoniu din proba de 25ml supusă dializei, au rămas după dializă 13,7mg, realizându-se eliminarea în proporție de 92%.

În cazul unei probe similare de la salifierea la 60% din totalul de 15,8mg NH_4^+ au mai rămas după dializă 5,5mg, adică eliminarea s-a produs în proporție de 65,2%.

Rezultă că dializa deși este o metodă viabilă de purificare a proteinelor separate prin salifiere, aplicabilă eventual împreună cu separarea pe coloană gel cromatografică, are dezavantajul că este lentă și că duce la diluarea produsului.

Soluțiile unei probe dializate au fost analizate din punct de vedere al conținutului

de proteine prin măsurători UV scopul fiind și acela de a verifica dacă analizele prin metoda Gornall au fost influențate de prezența ionului amoniu.

Determinarea proteinelor prin absorbție cantitativă în ultraviolet[27]

Maximul de absorbție al proteinelor în UV este influențat de pH și măsurătorile se realizează de obicei în mediu alcalin.

Pentru a determina proteinele în prezența acizilor nucleici, determinările de absorbantă la 260nm și 280nm (A260 și A280) se introduc în formula:

$$\text{Proteine(mg/l)} = 1,45 \cdot A280 - 0,74 \cdot A260 \quad (8.1)$$

sau concentrația de proteină se extrage din tabele funcție de raportul:

$$R = A280/A 260$$

REACTIVI

- soluției etalon de albumină serică bovină, preparată prin dizolvarea a 0,5g albumină serică bovină în 50ml apă distilată; 1ml soluție etalon corespunde la $1 \cdot 10^{-4}$ g albumină serică bovină.

MODUL DE LUCRU PENTRU TRASAREA CURBEI DE ETALONARE

În mai multe eprubete se pipetează câte 0,0 , 0,5 , 1,0 , 1,5 , 2,0 , 2,5 , 3,0 , 3,5ml soluție standard de proteine și în aceeași ordine 10,0 , 9,5 , 9,0 , 8,5 , 8,0 , 7,5 , 7,0 , 6,5ml apă distilată. Probele se omogenizează prin agitare energetică, apoi se determină absorbanta fiecărei probe la $\lambda=280\text{nm}$, față de martorul care conține numai apă distilată, în cuvă de 1cm din sticlă de cuarț.

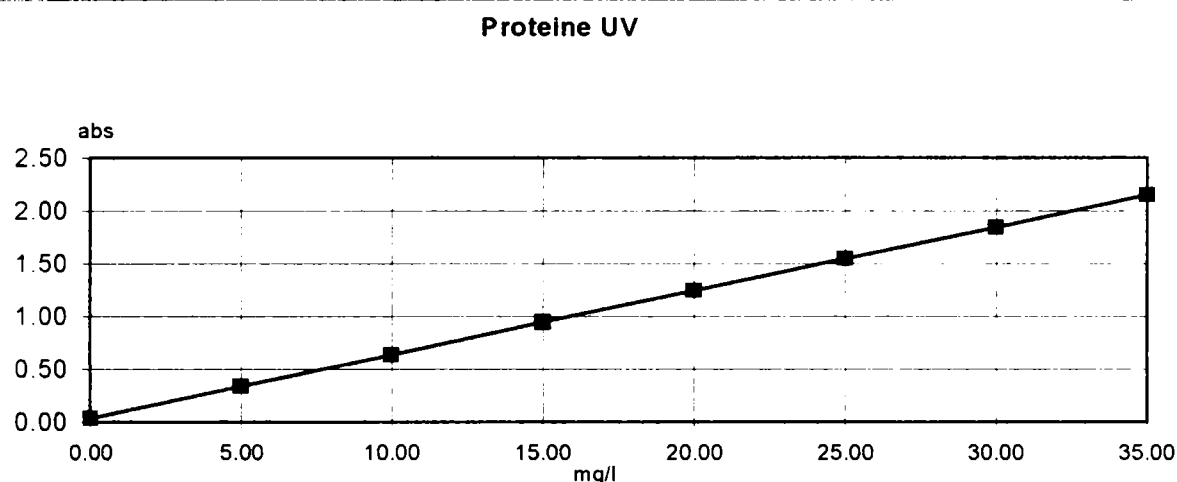
Valorile absorbantei în funcție de concentrația albuminei serice bovine sunt redate în tab.8.6 și graficul din figura 8.3 pentru domeniul 0-35,7mg/l.

Probele care au avut concentrații mai mari decât cele din curba de etalonare au fost diluate în vederea efectuării determinării.

Tab.8.6 Curba de etalonare pentru dozarea proteinelor prin absorbție în U.V.

Nr. crt.	Soluția standard proteină ml	Apă distilată ml	Concentrația de proteină în proba citită mg/l	Absorbanta la $\lambda=280\text{nm}$
	0,0	10,0	0	0.0000
	0,5	9,5	5.01	0.3728
	1,0	9,0	10,02	0.6482
	1,5	8,5	15,03	0,9313
	2,0	8,0	20,04	1,2748
	2,5	7,5	25,05	1,5583
	3,0	7,0	30,06	1,8536
	3,5	6,5	35,07	2,1229

Fig.8.3 Curba de etalonare pentru determinarea proteinelor prin absorbție în U.V.



Ecuția dreptei este:

$$y = 0,060329(\pm 0,001641)x + 0,039483(\pm 0,033942)$$

și

$$r = 99,94\%$$

S-au determinat concentrațiile în proteine ale soluțiilor de la dializă și anume ale soluției inițiale și ale dializatelor și s-au obținut rezultatele de mai jos (tab.8.7.):

Tab.8.7. Rezultatele determinării proteinelor prin absorbție cantitativă în ultraviolet

Locul de prelevare a probei	Conc.de proteine Met Gornall mg/l	DETERMINAREA ÎN U.V.			Conc. conf. curbei de etalonare mg/l	A280/A260	Acizi nucleici %	Proteine Met UV mg/l
		Absorbantă						
		280 nm	260nm					
Soluția inițială	1964	0,23 ^{**}	1,75 ^{**}	1955	1,31	1,30	1930	
Dializatul probei de 30% sat.	598	0,66 [*]	0,85 [*]	620	0,776	7,40	575	
Dializatul probei de 60% sat.	654	0,29 [*]	0,35 [*]	682	0,828	6,20	640	
^{**} Diluția dubla 1: 200 [*] Diluție 1: 100								

Rezultatele obținute prin cele două metode sunt de același ordin de mărime.

8.3. Precipitarea proteinelor din apele uzate cu ajutorul solvenților organici

Precipitarea cu solvenți organici a fost studiată ca o alternativă la celelalte metode dar și ca o verificare a rezultatelor salifierii printr-un procedeu care nu introduce în amestec ionul amoniu. Dintre solvenții recomandați care îndeplinesc condițiile impuse, cel mai la îndemână este alcoolul etilic.

MOD DE LUCRU

Într-un pahar Berzelius s-au adăugat sub agitare la 20ml extract de carne, 70ml etanol rezultând un precipitat alb, frumos, suspendat într-un lichid clar și limpede. Precipitatul s-a separat prin filtrare și apoi s-a încercat să se redizolve în apă sau în soluție de clorură de sodiu, fără succes.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele separării proteinelor din apele uzate cu solvenți organici sunt redate în tab.8.8.

Tab.8.8. *Precipitarea proteinelor din apele uzate cu solvenți organici*

Nr. crt	NATURA PROBEI	Solvent organic	Raport solvent/apă ml	Conținut proteină		Solubilit. precipitat.	Natura precipitat
				Proba iniț. mg/l	După separare mg/l		
1.	Precipitat de la salifiere redizolvat	Alcool etilic	40/20	819	13	Insolubil în apă	Alb frumos
2.	Extract de carne	Alcool etilic	70/20	1189	66	Insolubil în apă	Alb ușor filtrabil
3.	Apă de la fierbere						
	-la pH=5,9 necorectat	-Alcool etilic	50/20	750			Opalescență
	-la pH tamponat: 4,6	-Alcool etilic					Opalescență
	6,6	-Alcool etilic					Opalescență
	6,9	-Alcool etilic					Opalescență
4.	Extract de carne cu NaCl 15%, pH=5,2	Alcool etilic	25/100	1872	153	Insolubil în apă	Abundent
		Alcool etilic	50/50	1872	82	Insolubil în apă	
		Alcool etilic	25/75	1872	525		
5.	Extract de carne	Alcool etilic	75/50	2240	61	Insolubil în apă	

În urma analizei datelor s-au constatat următoarele:

- Proba nr.1 a constat din prelucrarea precipitatului obținut la salifierea la 60% saturație a unui extract de carne (poz. 11 din tab.8.2). Diferența dintre conținutul de proteină în apa supusă probei și în soluția rămasă după separarea precipitatului indică precipitarea proteinelor în proporție de 95,7%.

Faptul că salifierea și precipitarea cu solvenți duc ambele la separarea din soluție a unui compus care în cazul salifierii este solubil și răspunde pozitiv probei pentru proteine confirmă posibilitatea separării proteinelor prin oricare din aceste metode.

- Proba nr.2 a constat dintr-un extract de carne din care, prin tratarea la temperatura camerei cu alcool etilic a rezultat un precipitat insolubil în apă sau soluție de NaCl. Filtratul incolor și limpede a conținut 26,3% din proteina inițială, ceea ce înseamnă că precipitatul a conținut 73,7% din proteină. Apariția precipitatului care nu se mai poate redizolva în apă este consecința modificării structurii moleculelor proteice ca urmare a înlocuirii apei cu constanta dielectrică mare cu molecule ale solventului (alcoolul) cu constante dielectrice mici. Alcoolul

acționează asupra proteinelor și prin efect deshidratant; moleculele de apă care hidratează macromoleculele proteice prin interacții ion-dipol sunt atrase de moleculele solventului organic introdus în amestec. Aceste observații sunt în concordanță cu datele din literatură [32].

- Proba nr.3, apă uzată de la fierbere a produs la adăugarea alcoolului doar o accentuare a turburelii soluției provocate de modificarea pH-ului. Filtrarea a dus la un precipitat insolubil în apă și la un filtrat de culoare galbenă.

- Proba nr.4 a servit pentru a încerca stabilirea unor condiții mai bune de precipitare (raport alcool: apă uzată mai mic). Același extract a fost prelucrat și la punctul izoelectric (precipitare la pH=3,2) și prin salifiere (saturație 90%).

Se constată o reducere mai modestă a conținutului de proteine din apă la un raport mic apă/alcool și randamentul de separare crește cu creșterea cantității de alcool.

- Proba nr.5 a dus prin tratarea cu etanol în raportul 75:50 la un precipitat insolubil în apă și la scăderea conținutului de proteină din soluție cu 93,2%

Și în acest caz, s-a lucrat în paralel și prin salifiere. Atât la proba 4 cât și la proba 5 s-au obținut grade de eliminare a proteinelor asemănătoare, respectiv randamente de precipitare similare, ceea ce se poate considera o confirmare a rezultatelor obținute prin salifiere (tab.8.9.).

Tab.8.9. Rezultate comparative ale precipitării proteinelor din extracte de carne

Nr. crt.	Natura probei	Agent de precipitare	Cantitatea de proteină în proba inițială mg	Conținut de proteină în filtrat	
				mg	% din inițial
1	Extract 1872 mg/l	Etanol	93,6	7,1	7,5
2	Extract 1872 mg/l	Sulfat de amoniu 90% saturație	52,4	2,3	4,3
3	Extract 2240 mg/l	Etanol	111,9	7,6	6,8
4	Extract 2240 mg/l	Sulfat de amoniu 60% saturație	223,9	29,0	12,9

Precipitarea cu solvenți organici a dus la randamente uneori mai scăzute decât salifierea, dar într-un domeniu încă acceptabil, 62-74%, uneori și 90%, iar precipitatele sunt mai ușor separabile prin filtrare decât cele de la salifiere.

Precipitatele separate nu s-au putut redizolva. Insolubilitatea se datorează probabil denaturării ireversibile a proteinelor sub influența alcoolului. Pentru a evita sau a micșora denaturarea ar trebui lucrat la temperaturi scăzute ceea ce complică tehnica și, în special, economia procesului.

Dezavantajul major al procedurii este consumul mare de alcool, în raport de cel puțin 1:1 față de apa uzată, motiv pentru care procedeul se consideră recomandabil numai dacă utilizarea ulterioară a proteinelor recuperate este foarte pretențioasă. Recuperarea alcoolului este posibilă prin distilare, dar aceasta înseamnă consum energetic suplimentar.

9. FRAȚIONAREA, PURIFICAREA ȘI DETERMINAREA MASEI MOLECULARE A PROTEINELOR DIN APELE UZATE

9.1. Fraționarea prin cromatografie pe gel permeabil

Prin trecerea proteinelor peste coloane de gel permeabil s-a urmărit fracționarea lor în vederea unei mai bune cunoașteri în perspectiva unei viitoare utilizări și pentru obținerea unor fracțiuni care ar putea fi folosite ca atare. De asemenea, s-a urmărit purificarea produsului salifierii prin îndepărtarea ionilor anorganici mici, în special a ionului amoniu.

Gelul SEPHADEX G200 care a fost ales pentru coloana cromatografică permite fracționarea proteinelor cu mase moleculare cuprinse între 5000 și 800000 daltoni, ceea ce corespunde spectrului de mase moleculare ale proteinelor din carne (tab.3.4).

Caracteristicile gelului ales sunt:

- reținerea apei (“water regain”), $w_r = 20 \pm 2\text{g/g}$
- diametrul particulei uscate: 40 - 120 μ
- volumul de strat pe gram de gel uscat: 30 – 40ml
- timpul minim de îmbibare la temperatura camerei: 72 ore
- timpul minim de îmbibare la fierbere: 5 ore

REACTIVI ȘI MATERIALE

- SEPHADEX G200
- soluție tampon de pH 4,7
- coloana cromatografică A, cu diametrul interior de 3,3cm, înălțimea stratului de 21,5cm și volumul stratului $V_t = 183,9\text{ cm}^3$.
- coloana cromatografică B, cu diametrul interior de 3,3cm, înălțimea stratului de 11,5cm și volumul $V_t = 98,3\text{ cm}^3$.

MODUL DE LUCRU

Înainte de utilizare, SEPHADEX -ul a fost gonflat în soluție tampon de pH = 4,7 timp de 72 ore, într-un raport corespunzător caracteristicii de reținere a apei (20g/g), iar coloana formată a fost spălată timp de 8 ore cu aceeași soluție tampon.

a) Fraționarea extractului de carne

Prin coloana A s-au trecut 50ml extract de carne filtrat, cu un conținut de proteine de 1253,96mg/l de culoare gălbuie. Culoarea a permis urmărirea deplasării probei prin strat. Eluarea s-a făcut cu soluție tampon pH=4,7, timp de 5h 55', timp în care s-au recoltat 15 eșantioane de câte 10ml. Rezultatele sunt redată în tab.9.1 și sunt reprezentate în graficul din fig.9.1.

Din același extract de carne 50ml s-au trecut prin coloana B, eluarea fiind făcută cu 270ml soluție tampon. Rezultatele sunt trecute tot în tabelul 9.1 și sunt reprezentate în graficul din fig.9.2.

reprezentate în graficul din fig.9.2.

Determinarea conținutului de proteine din eșantioane s-a făcut în ambele cazuri, ca și la toate celelalte teste cromatografice, prin metoda Gornall.

Tab.9.1. Fraționarea extractului de carne pe coloane de SEPHADEX G200

Numărul eșantionului	Volumul eșantionului	Determinarea proteinelor prin metoda Gornall		
		Diluția probei	Absorbanta la $\lambda=540\text{nm}$	Conc. în proteine mg/l
PROBA 1, COLOANA A				
1.	10	2	0,018	214,86
2.			0,058	711,14
3.			0,064	779,20
4.			0,057	695,04
5.			0,055	664,10
6.			0,054	660,40
7.			0,071	860,90
8.			0,060	729,70
9.			0,044	532,92
10.			0,041	498,26
11.			0,042	509,40
12.			0,031	368,32
13.			0,029	347,28
14.			0,027	325,00
15.			0,021	245,80
PROBA 2, COLOANA B				
1.	20	-	0,005	22,03
2.			0,007	38,12
3.			0,018	105,07
4.	10	2	0,027	325,00
5.			0,035	420,30
6.			0,046	556,44
7.			0,046	556,44
8.			0,047	571,28
9.			0,042	513,12
10.			0,040	483,42
11.			0,030	364,60
12.			0,033	399,26
13.			0,020	230,94
14.			0,021	242,08
15.			0,016	187,62
16.			0,016	180,19
17.			0,012	131,93
18.			-	-
19.	0,020	120,36		
20.	0,015	86,39		
21.	0,005	22,65		
22.	0,003	10,89		

Fig.9.1 Fraționarea extractului de carne pe SEPHADEX G200, coloana A (Φ 3,3cm, H=21,5cm)

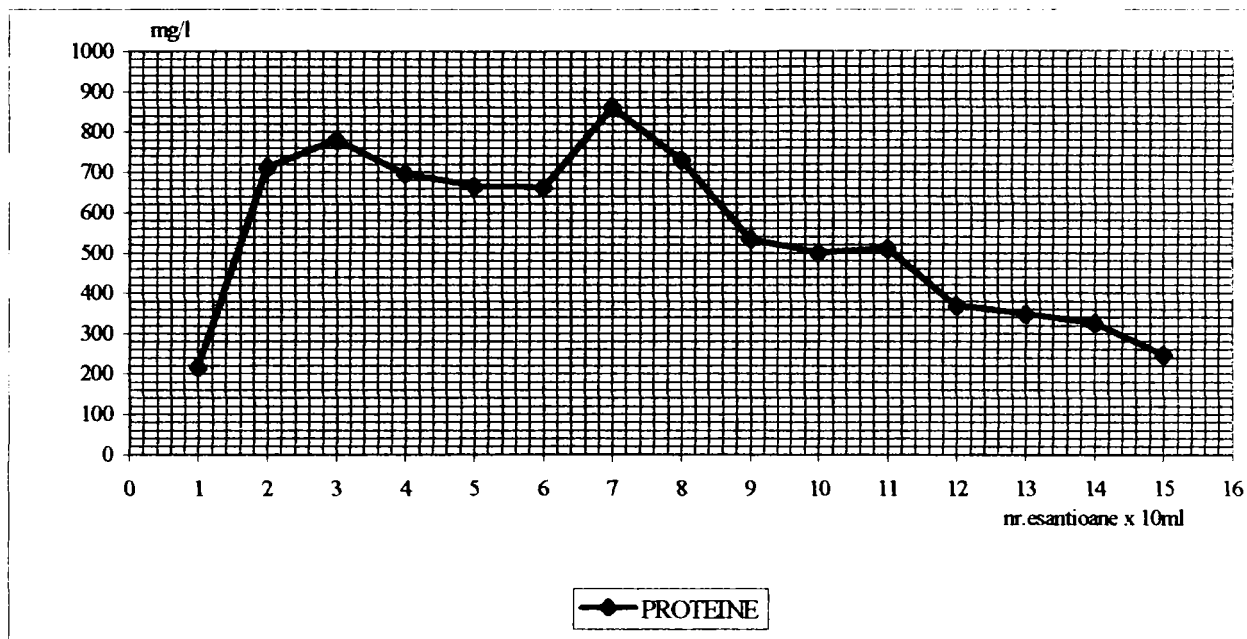
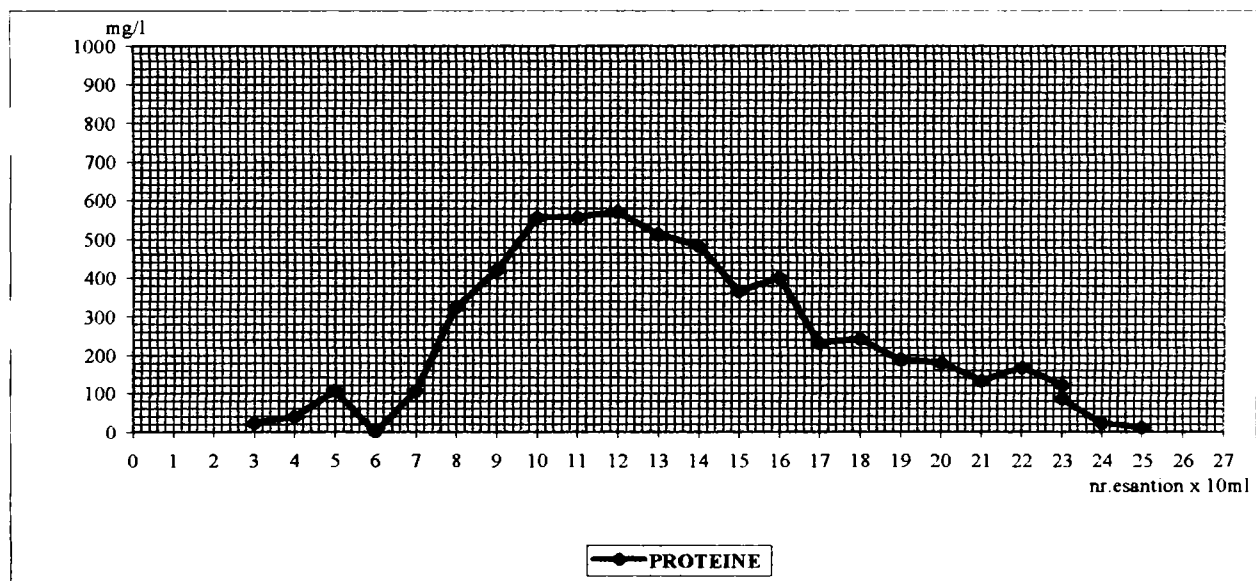


Fig.9.2 Fraționarea extractului de carne pe SEPHADEX G200, coloana B (Φ 3,3cm, H=11,5cm)



La ambele treceri prin coloană se constată două vârfuri de concentrație, ceea ce ar putea să fie o confirmare a faptului că extractele de carne conțin molecule mari de globuline și mai mici de albumine. Nu există o separare netă între categoriile de molecule mari și cele mai mici.

b) Fraționarea precipitatelor obținute la salifierea extractelor de carne

Pentru studiul soluțiilor obținute prin redizolvarea precipitatelor formate la salifierea extractelor de carne s-au folosit coloana B și 50ml extract de carne cu conținut inițial de 1253,96mg/l proteine. În urma redizolvării precipitatelor de la salifiere și centrifugarea soluțiilor opalescente rezultate s-au obținut compozițiile redată în tab.9.2.

Tab.9.2. Compoziția unor soluții de la salifiere supuse fracționării prin cromatografie pe gel permeabil

Saturația sulfatului de amoniu	Volumul de apă în care s-a redizolvat precipitatul	Proteine mg/l	Amoniu mg/l
30%	80	181,68	2.130
60%	68	536,49	6.135
90%	90	246,04	23.110

Au fost trecuți prin coloană, pe rând, 36ml soluție rezultată la redizolvarea precipitatului de la 30% saturație, 24ml de la 60% saturație și 40ml de la 90% saturație.

După fiecare soluție eluarea s-a făcut cu câte 100ml și în final cu 160ml soluție tampon. Probele de la baza coloanei au fost recoltate din 10 în 10ml. Rezultatele sunt redată în tab.9.3 și reprezentate în graficele din fig.9.3 și 9.4.

Tab.9.3. Fracționarea prin cromatografie pe gel permeabil SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere din extract de carne

Nr. eșantion	Saturația	Volumul eșantionului ml	Determinarea proteinelor prin metoda Gornall	
			Absorbanța la $\lambda=540\text{nm}$	Concentrația în proteine mg/l
1.	30%	10	0,000	0,000
2.			0,000	0,000
3.			0,000	0,000
4.			0,001	0,000
5.			0,003	12,129
6.			0,000	0,000
7.			0,002	4,084
8.			0,003	9,034
9.			0,000	0,000
10.			0,004	20,173
11.			0,000	0,000
1.	60%	10	0,000	0,000
2.			0,000	0,000
3.			0,003	9,653
4.			0,012	70,916
5.			0,013	74,010
6.			0,012	70,914
7.			0,016	90,718
8.			0,016	93,812
9.			0,013	71,535
10.			0,024	142,080
11.			0,013	77,104
12.			0,000	0,000
13.			0,001	2,227

Fig.9.3. Fractionarea proteinelor separate din extract de carne prin salifiere la 30% saturatie, pe coloana B de SEPHADEX G200 (Φ 3,3cm, H= 11,5cm)

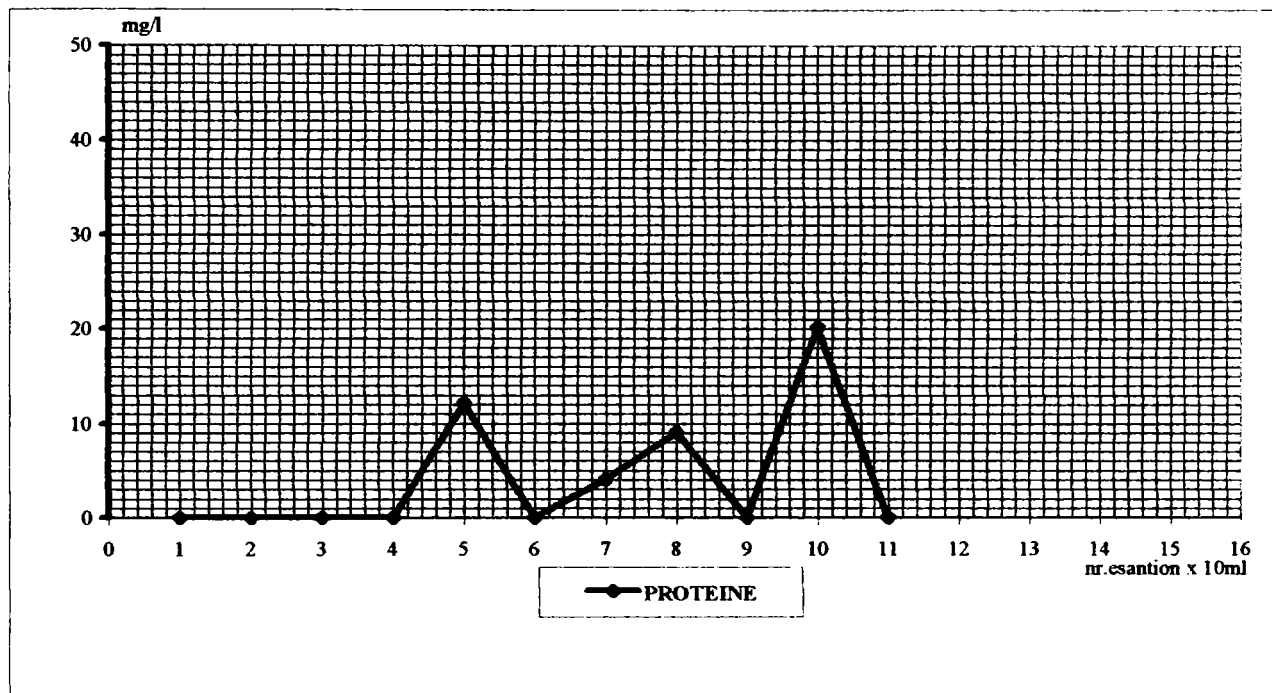
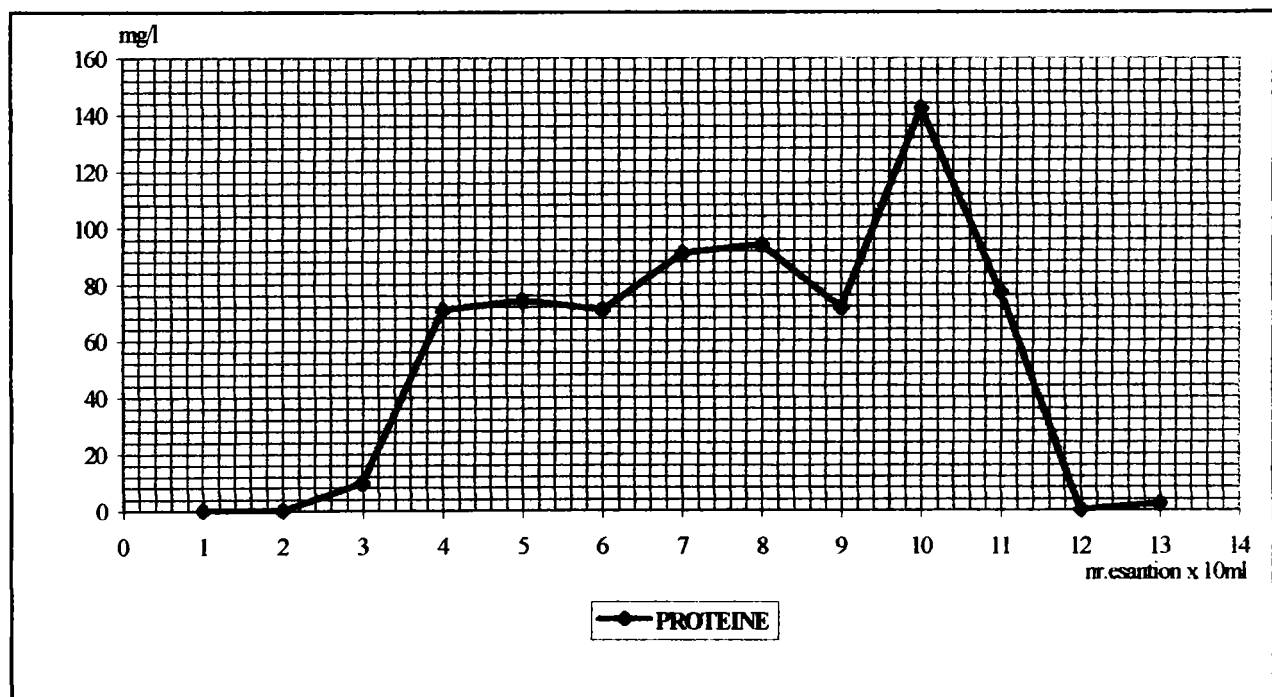


Fig.9.4. Fractionarea proteinelor separate din extract de carne prin salifiere la 60% saturatie, pe coloana B de SEPHADEX G200 (Φ 3,3cm, H= 11,5cm)



Probele de la 90% saturație nu au fost analizate după separarea cromatografică, ele devenind opalescente. Determinarea concentrației ionului amoniu însă, din ultima fracțiune de 10ml a dus la un rezultat de 7630mg/l ceea ce înseamnă o scădere de 67% față de concentrația inițială.

Proteinele separate la 30% saturație prezintă două maxime mai mici și unul mai pronunțat la timpuri de eluție mai mari. Prin comparare cu rezultatele electroforezei (tab.8.4), interpretarea potrivit căreia primele maxime ar corespunde globulinelor cu molecule mai mari și prezente în concentrații mai mici iar maxima a treia ar corespunde albuminelor cu molecule mai mici dar prezente în concentrații mai mari este justificată.

În cazul proteinelor separate la 60% saturație apare un maxim foarte pronunțat la timpul de retenție corespunzător maximului atribuit mai înainte albuminelor, ceea ce este în concordanță și cu rezultatul electroforezei. Un maxim mai puțin pronunțat precum și celelalte valori, aproape constante trebuie atribuite diferitelor proteine globulare.

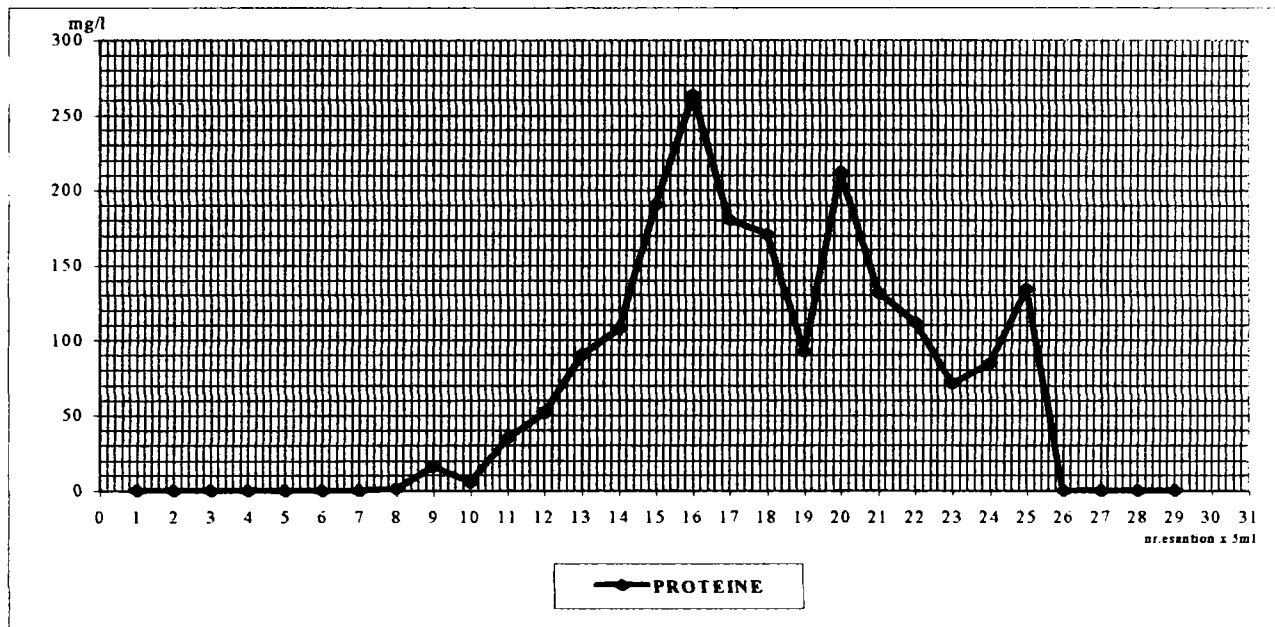
Pentru a verifica ipoteza anterioară potrivit căreia maximul înregistrat la extractele de carne se datorește prezenței albuminelor, pe aceeași coloană și în aceleași condiții s-au trecut 50ml soluție cu un conținut de 1000mg/l albumină serică bovină. Rezultatele sunt cuprinse în tab.9.4 și sunt reprezentate în graficul din fig.9.5.

Tab.9.4. Cromatografia pe gel permeabil SEPHADEX G200 a albuminei serice bovine

Numărul eşantionului	Volumul eşantionului	Determinarea proteinelor prin metoda Gornall		
		Diluția probei	Absorbanța la $\lambda=540\text{nm}$	Concentrația în proteine mg/l
1.	5	-	0,000	0,000
2.		-	0,000	0,000
3.		-	0,000	0,000
4.		-	0,000	0,000
5.		-	0,000	0,000
6.		-	0,000	0,000
7.	5	-	0,000	0,000
8.		-	0,001	0,990
9.		-	0,004	15,842
10.		-	0,002	5,322
11.		-	0,007	35,025
12.		-	0,009	51,733
13.		-	0,016	90,099
14.		-	0,018	107,430
15.		-	0,032	190,350
16.		-	0,044	263,370
17.		-	0,030	179,830
18.		-	0,029	170,540
19.		-	0,016	92,574
20.		-	0,035	212,000
21.		-	0,022	131,560
22.		-	0,019	111,760
23.		-	0,013	71,535
24.		-	0,015	84,530
25.		-	0,023	134,030
26.		-	0,000	0,000
27.		-	0,000	0,000
28.		-	0,000	0,000
29.		-	0,000	0,000

Se constată existența unui maxim în același domeniu în care s-au înregistrat și maximele cele mai pregnante în cromatogramele precipitatelor de la salifiere. Se mai constată un maxim, mai intens, la 80ml (eșantion 16) acesta fiind atribuit albuminei serice bovine dimer. Astfel se confirmă prezența albuminei în precipitate, mai intens în cazul salifierii la 60% saturație și mai puțin intens la 30% saturație. Maximele mai mici, înregistrate la 80ml (eșantion 16) în ambele probe de extract de carne (fig. 9.3 și fig.9.4), se dovedesc, prin comparare cu diagrama corespunzătoare albuminei serice bovine (fig 9.5), a fi corespunzătoare tot unor albumine, cu molecule mai mari. Confirmarea va putea fi dată cu certitudine de determinările de mase moleculare.

Fig.9.5 Cromatografia albuminei serice bovine pe coloana B de SEPHADEX (Φ 3,3cm, 11,5cm)



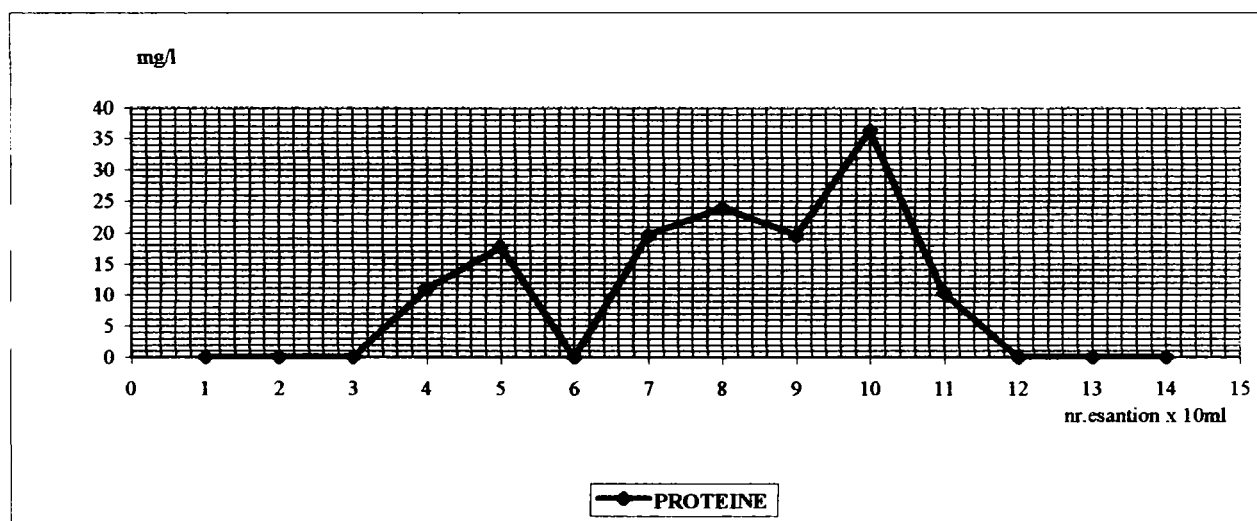
c) Cromatografierea pe gel permeabil a fracțiunilor obținute prin salifierea apelor uzate reale

Apele uzate puternic încărcate recoltate din fluxul tehnologic, de exemplu de la faza de fierbere, chiar după separarea grăsimilor și decantarea solidelor urmată de filtrare și centrifugare, conțin impurificatori care nu permit trecerea peste coloana cromatografică de gel permeabil fără pericolul colmatării și distrugerii gelului. Din această cauză s-a optat de la început pentru cromatografierea fracțiunilor obținute la salifiere și nu a apei brute. S-a folosit coloana B, Φ 3,3cm, H=11,5cm de SEPHADEX G200 iar apa uzată a fost recoltată de la fierbere organe și a conținut 4735,2 mg/l proteine, 248mg/l NH_4^+ și 326mg/l Cl^- la pH=5,87. S-au trecut prin coloană 30ml din soluția rezultată la redizolvarea precipitatului la salifierea la 60% saturație. Rezultatele sunt cuprinse în tab.9.5 și sunt reprezentate în graficul din fig.9.6.

Tab9.5 Fractionarea prin cromatografie pe gel permeabil SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere la 60% saturație din apele uzate reale

Numărul fracțiunii	Saturația	Volumul fracțiunii	Determinarea proteinelor prin metoda Gornall	
			Absorbanța la $\lambda=540\text{nm}$	Concentrația mg/l
1.	60%	10	0,000	0,000
2.			0,000	0,000
3.			0,000	0,000
4.			0,003	10,891
5.			0,004	17,698
6.			0,000	0,000
7.			0,004	19,554
8.			0,005	23,886
9.			0,004	19,554
10.			0,007	36,262
11.			0,003	10,272
12.			0,000	0,000
13.			0,000	0,000
14.			0,000	0,000

Fig.9.6 Fractionarea proteinelor separate din ape uzate prin salifiere la 60% saturație pe coloana B de SEPHADEX (Φ 3,3cm, 11,5cm)



Se constată existența a două domenii și anume acela al eșantioanelor 4-5 și al eșantioanelor 7-11. Comparând cu probele anterioare, în special cu proba de albumină serică bovină, maximele eșantioanelor indică prezența unor albumine cu molecule mici, în concentrații mari.

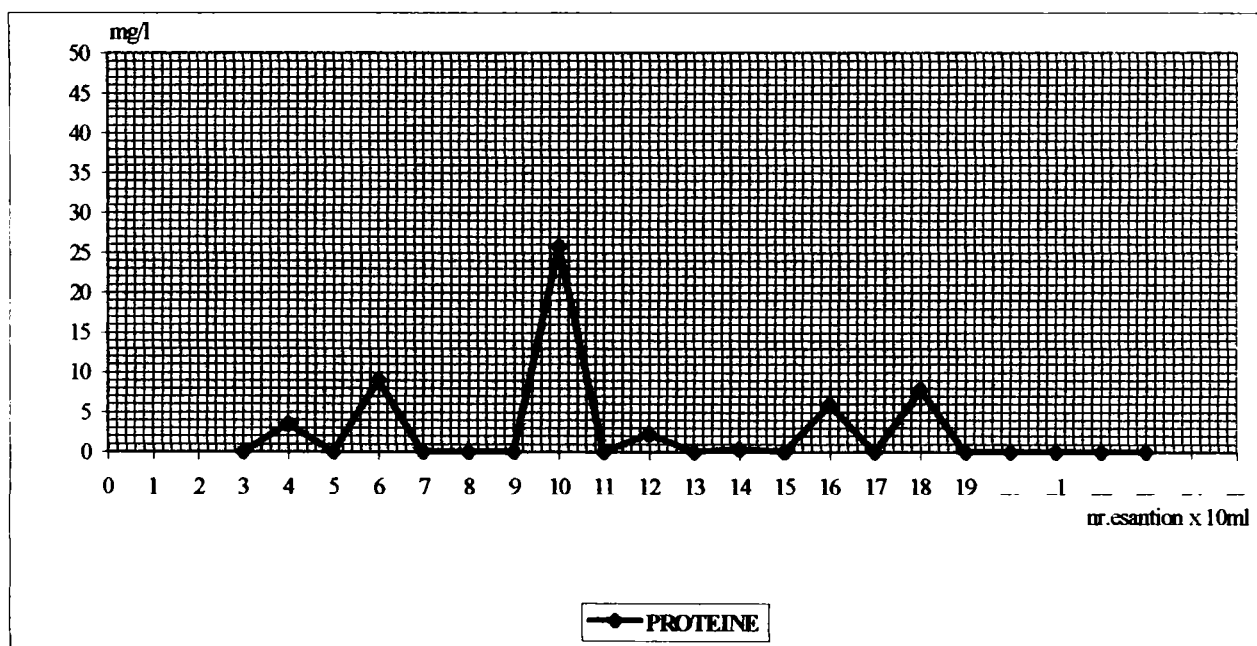
Domeniul eșantioanelor 4-5 corespunde unor molecule mai mari, probabil globuline, prezente în cantități mici.

Un al doilea test s-a efectuat cu 30ml dintr-o soluție rezultată la redizolvarea precipitatului de la salifierea la 90% saturație a aceleiași ape uzate. S-a folosit tot coloana B de SEPHADEX G200 și rezultatele sunt cuprinse în tab.9.6 și graficul din fig.9.7.

Tab.9.6. Fraționarea prin gelcromatografie pe SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere la 90% saturație din apele uzate

Numărul fracțiunii	Saturația	Volumul fracțiunii	Determinarea proteinelor prin metoda Gornall	
			Absorbanța la $\lambda=540\text{nm}$	Concentrația mg/l
1.	90%	10	0,000	0,000
2.			0,000	0,000
3.			0,000	0,000
4.			0,002	3,465
5.			0,000	0,000
6.			0,002	9,035
7.			0,000	0,000
8.			0,000	0,000
9.			0,000	0,000
10.			0,005	25,743
11.			0,020	0,000
12.			0,001	2,228
13.			0,000	0,000
14.			0,001	0,371
15.			0,000	0,000
16.			0,002	5,940
17.			0,000	0,000
18.			0,002	7,797
19.			0,000	0,000
20.			0,000	0,000
21.			0,000	0,000
22.			0,000	0,000
23.			0,000	0,000

Fig.9.7. Fraționarea proteinelor separate din ape uzate prin salifiere la 90% saturație pe coloana de SEPHADEX G200 (Φ 3,3cm, H=11,5cm)



Se constată existența unor domenii bine delimitate, picul cel mai înalt fiind

înregistrat la volum de eluție identic cu volumul la care s-a înregistrat maximul pentru albumina serică bovină. Acest maxim se poate identifica cu albuminele. Moleculele mai mari, probabil globuline, sunt responsabile pentru picurile mai mici de la începutul cromatogramei iar picurile finale mici sunt probabil produse de molecule mici de proteine greu precipitabile care în proba de 60% saturație nu au apărut.

Rezultatele au fost verificate prin electroforeza aceluiași probe. Rezultatele sunt cuprinse în tab.9.7.

Tab.9.7. Compoziția procentuală a proteinelor precipitate prin salifiere, determinată prin electroforeză

FELUL PROTEINEI	U.M.	GRADUL DE SATURAȚIE AL AGENTULUI DE SALIFIERE	
		60%	90%
Globuline			
- α_1	%	2	2
- α_2		8	6
- β		14	14
- γ		10	24
Albumină		66	54

Concentrațiile de 66% și 54% albumine confirmă rezultatele cromatografiei pe gel permeabil reprezentate prin maximele de la volumul de eluție 100ml. Concentrațiile mai mici de globuline înregistrate la electroforeză sunt regăsite în picurile mai mici la timpi de retenție mai scăzuți.

Aceeași apă uzată, prin precipitare la punctul izoelectric (pH=3,88), fără salifiere, a produs un amestec de proteine de compoziție asemănătoare: albumine 55%, globuline α_1 3%, α_2 7%, β 20% și γ 15%.

Din cauză că apa uzată învechită s-a comportat diferit la salifiere, au fost supuse cromatografiei pe gel permeabil produsele rezultate la salifierea ei. Precipitatele rezultate la salifiere, reluate cu 50ml apă au conținut 429,97mg/l proteine la 30% saturație, 1190,1mg/l la 60% saturație și 564,11mg/l la 90% saturație. S-au supus cromatografiei pe gel permeabil câte 25ml soluție.

Deoarece metoda se oferă și ca o modalitate de eliminare a ionilor amoniu rămași în urma salifierii, a fost urmărită și concentrația ionilor amoniu. Rezultatele sunt cuprinse în tab.9.8 și sunt redată în graficele din fig.9.8, 9.9, 9.10.

Tab.9.8 Fraționarea prin cromatografie pe gel permeabil SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere din ape uzate reale învechite

SATURAȚIE 30%					SATURAȚIE 60%					SATURAȚIE 90%				
Nr. eșantion	Saturația %	Volum eșantion ml	Concentrația		Nr. eșantion	Saturația %	Volum eșantion ml	Concentrația		Nr. eșantion	Saturația %	Volum eșantion ml	Concentrația	
			NH ₄ ⁺	Proteine mg/l				NH ₄ ⁺	Proteine mg/l				NH ₄ ⁺	Proteine mg/l
1.				0,000	1.				0,000	1.				
2.				0,000	2.			27	0,000	2.				
3.				0,000	3.				0,000	3.				
4.				0,000	4.				103,710	4.			167	61,634
5.				0,000	5.				205,200	5.				27,599
6.			370,6	31,931	6.			1080	249,750	6.				39,356
7.			497,8	25,743	7.				238,000	7.				43,688
8.			553,0	17,079	8.			1513	260,270	8.				39,356
9.				0,000	9.				269,550	9.			390	41,832
10.				0,000	10.				310,400	10.				46,163
11.				0,000	11.			2165	309,780	11.				48,020
12.				0,000	12.				296,160	12.			679	35,644
13.			724,3	13,366	13.				248,510	13.				25,124
14.				8,416	14.				225,000	14.				26,361
15.				9,653	15.			2056	186,630	15.			556	11,510
16.			854,8	12,748	16.				118,560	16.				0,000
17.				2,228	17.				87,000	17.				0,000
18.				0,000	18.			1850	123,510	18.				0,000
19.				0,000	19.				61,630	19.				0,000
20.			358,6	0,000	20.				30,690	20.				0,000
21.				0,000	21.				0,000	21.				0,000
22.			38,8	0,000	22.			193	0,000	22.			78	0,000

Fig 9.8. Fraționarea prin cromatografie pe gel permeabil a proteinelor separate prin salifierea la 30% a apelor uzate învechite pe SEPHADEX G200, coloană Φ 3,3cm, H=11,5cm

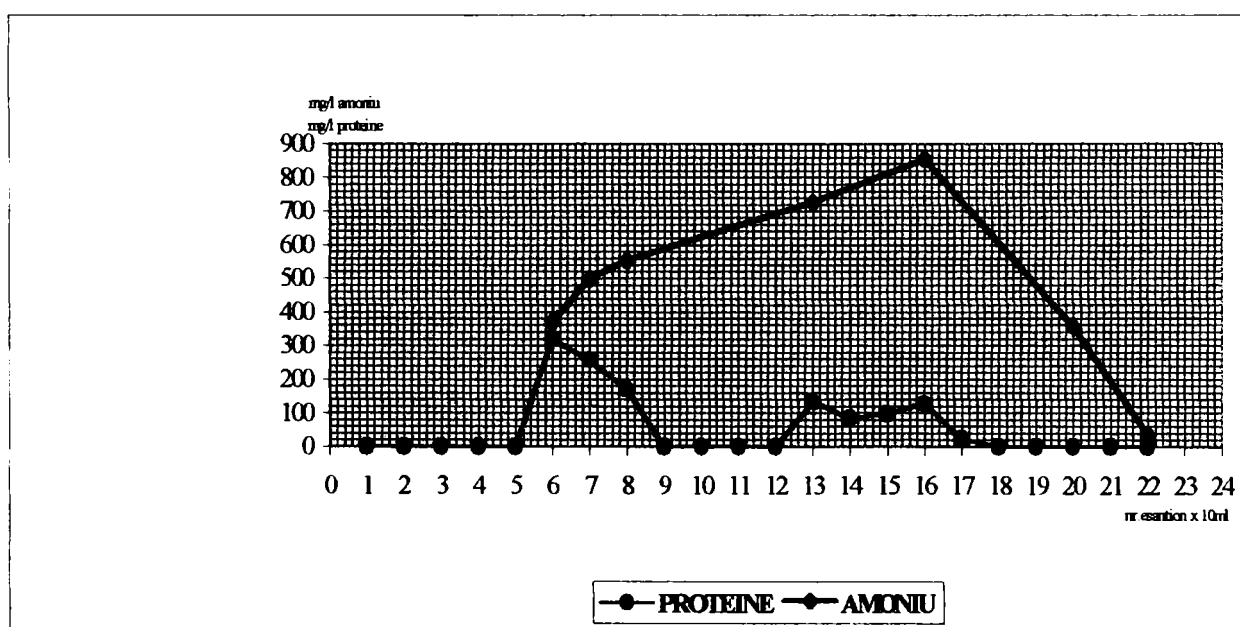


Fig.9.9. Fractionarea prin cromatografie pe gel permeabil a proteinelor separate prin salifiere la 60% a apelor uzate învechite pe SEPHADEX G200, coloană Φ 3,3cm, H=11,5cm

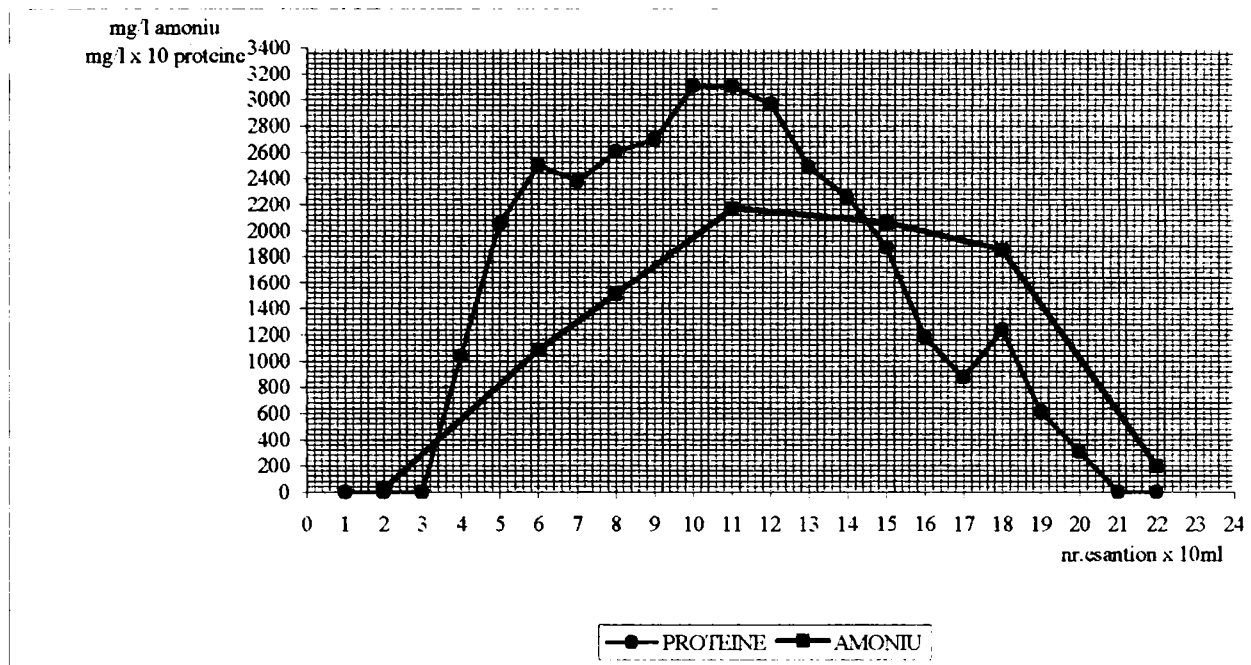
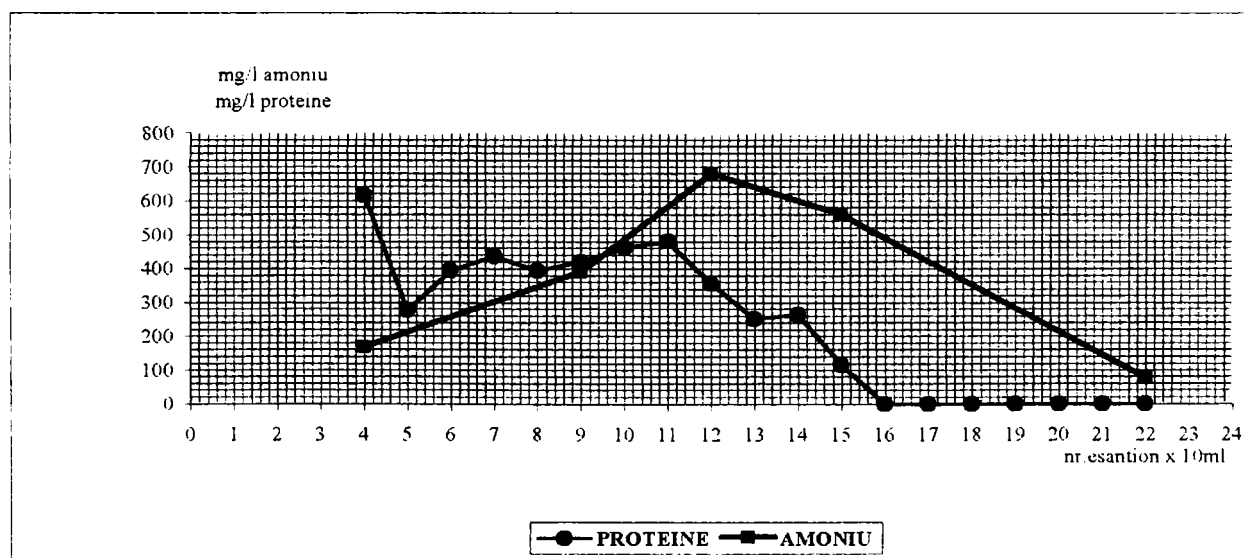


Fig.9.10. Fraționarea prin cromatografie pe gel permeabil a proteinelor separate prin salifiere la 90% a apelor uzate învechite pe SEPHADEX G200, coloană Φ 3,3cm, H=11,5cm



Așa cum s-a întâmplat la salifiere, apa uzată care a stat netratată se comportă la trecerea peste SEPHADEX complet diferit de apa proaspătă. Separarea pe fracțiuni nu este netă, înregistrându-se un ușor maxim în domeniul albuminelor la saturația de 60% și 90%. Repartizarea practic continuă, fără separarea netă a fracțiunilor poate fi urmare a scindării în timp a moleculelor mari.

Variația concentrației ionului amoniu care are aceeași alură în toate cele trei cazuri, indică posibilitatea eliminării amoniului prin cromatografie pe gel permeabil.

9.2. Separarea ionului amoniu prin gelcromatografie

9.2.1. Separarea ionului amoniu pe SEPHADEX G200

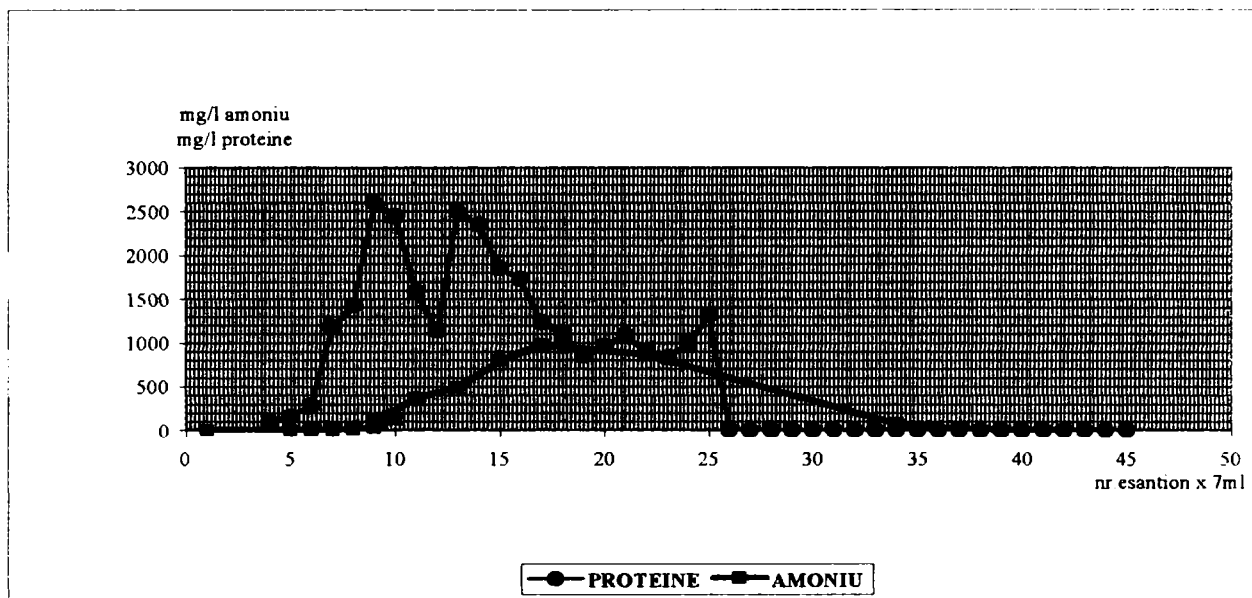
Posibilitatea separării ionului amoniu a fost testată pe un extract de carne care la salifiere la 30% saturație și reluarea precipitatului în 70ml apă, a dus la o soluție cu 590,72mg/l proteine și 6788,0mg/l amoniu. Rezultatul trecerii prin coloana B de SEPHADEX G200 este redat în tab.9.9 și graficul din fig.9.11.

Precipitatul rezultat la salifierea la saturația de 60% reluat cu 70ml apă a conținut 201,49mg/l proteine și 634mg/l ioni amoniu. Rezultatul trecerii prin coloana B de SEPHADEX G200 este redat în tab.9.10 și graficul din fig.9.12.

Tab.9.9 Fraționarea și purificarea de ionul amoniu pe SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere la 30% saturație

Nr. eșantion	Saturația la salifiere	Mărimea eșantionului ml	Determinarea proteinelor		Concentrația ionilor amoniu mg/l
			Absorbanța la $\lambda=540\text{nm}$	Concentrația de proteine (mg/l)	
1.	30%	7	0,003	9,653	0,051
2.			0,004	15,842	1,104
3.			0,006	28,837	3,720
4.			0,020	117,950	3,910
5.			0,024	142,700	9,310
6.			0,043	260,270	29,460
7.			0,040	244,180	127,600
8.			0,027	158,170	
9.			0,019	114,280	113,800
10.			0,041	249,750	
11.			0,039	234,280	365,800
12.			0,031	184,780	
13.			0,029	172,400	481,000
14.			0,021	122,900	
15.			0,019	109,900	790,500
16.			0,015	84,530	
17.			0,016	95,668	974,000
18.			0,019	108,660	
19.			0,016	90,099	
20.			0,014	83,292	
21.			0,017	98,762	
22.			0,022	131,560	857,000
23.			0,000	0,000	
24.			0,000	0,000	
25.			0,000	0,000	
26.			0,000	0,000	
27.			0,000	0,000	
28.			0,000	0,000	
29.			0,000	0,000	
30.			0,000	0,000	
31.			0,000	0,000	
32.			0,000	0,000	
33.			0,000	0,000	
34.			0,000	0,000	70,460
35.			0,000	0,000	
36.			0,000	0,000	
37.			0,000	0,000	22,846
38.			0,000	0,000	
39.			0,000	0,000	1,328
40.			0,000	0,000	
41.			0,000	0,000	
42.			0,000	0,000	0,276

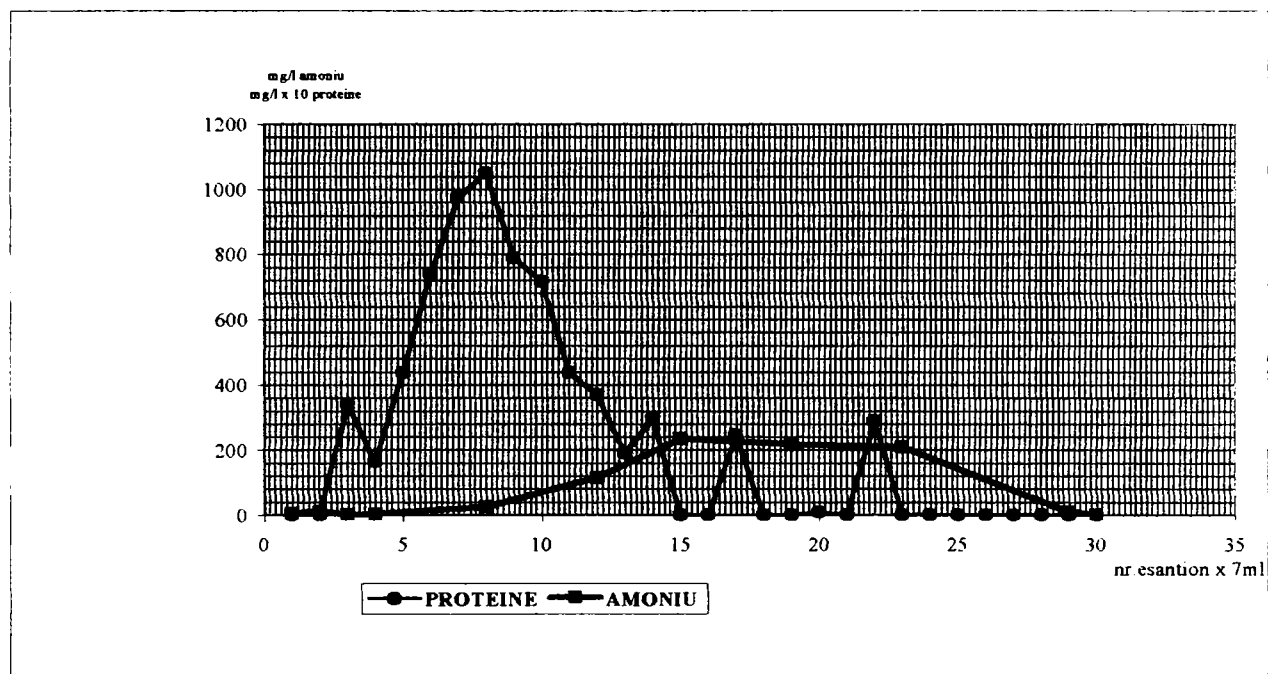
Fig.9.11. Fraționarea și purificarea de ionul amoniu pe SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere la 30% saturație



Tab.9.10 Fraționarea și purificarea de ionul amoniu pe SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere la 60% saturație

Nr. eșantion	Saturația la salifiere	Mărimea eșantionului ml	Determinarea proteinelor		Concentrația ionilor amoniu mg/l
			Absorbanța la $\lambda=540\text{nm}$	Concentrația de proteine mg/l	
1.	60%	7	0,000	0,000	4,896
2.			0,000	0,000	11,490
3.			0,006	33,787	1,280
4.			0,004	16,460	2,610
5.			0,008	43,688	
6.			0,013	74,010	
7.			0,017	97,525	
8.			0,018	104,950	24,200
9.			0,014	78,960	
10.			0,013	71,535	
11.			0,008	43,688	
12.			0,007	36,881	113,400
13.			0,004	18,936	
14.			0,006	29,455	
15.			0,000	0,000	233,000
16.			0,000	0,000	
17.			0,005	24,505	
18.			0,000	0,000	
19.			0,000	0,000	217,000
20.			0,001	0,990	
21.			0,000	0,000	
22.			0,006	28,837	
23.			0,000	0,000	208,020
24.			0,000	0,000	
25.			0,000	0,000	
26.			0,000	0,000	
27.			0,000	0,000	
28.			0,000	0,000	
29.			0,000	0,000	10,020
30.			0,000	0,000	0,080

Fig. 9.12. *Fracționarea și purificarea de ionul amoniu pe SEPHADEX G200 a proteinelor separate prin salifiere la 60% saturație*



În privința proteinelor, la 30% saturație se constată o alură asemănătoare a curbei ca la probele anterioare dar cu picurile mai puțin pronunțate și deplasate spre timpii de retenție mai scăzuți (molecule mai mari). La 60% saturație se găsește picul aferent albuminelor dar și mai pronunțat cel atribuit albuminei dimere. Curba pentru ionul amoniu prezintă în ambele cazuri câte un maxim foarte pronunțat, decalat față de maximum înregistrat pentru proteină, ceea ce permite separarea unora din fracțiile proteice de ionul amoniu.

9.2.2. Separarea ionului amoniu pe SEPHADEX G25

Din cauză că separarea nu a fost totuși foarte netă, s-a trecut la eliminarea ionului amoniu pe o coloană de SEPHADEX G25 care este destinat fracționării proteinelor cu mase moleculare mici, cuprinse între 1000 și 5000 daltoni.

Caracteristicile gelului ales sunt:

- reținerea apei (water regain), $w_r = 2,5 \pm 2g/g$
- diametrul particulelor uscate: 50 - 120 μ
- volumul de strat de gel uscat: 4-6ml.

REACTIVI ȘI MATERIALE

- SEPHADEX G25
- soluție tampon de pH 4,7
- coloana cromatografică C, cu diametrul interior de 1,3cm, înălțimea stratului de 40,0cm și volumul stratului $V_t = 60,7cm^3$.

MODUL DE LUCRU

Înainte de utilizare, SEPHADEX -ul a fost gonflat în soluție tampon de pH = 4,7 timp de 72 ore, într-un raport corespunzător caracteristicii de reținere a apei, iar coloana formată a fost spălată cu același fel de soluție tampon.

a) Etalonarea coloanei cromatografice pentru reținerea ionului amoniu

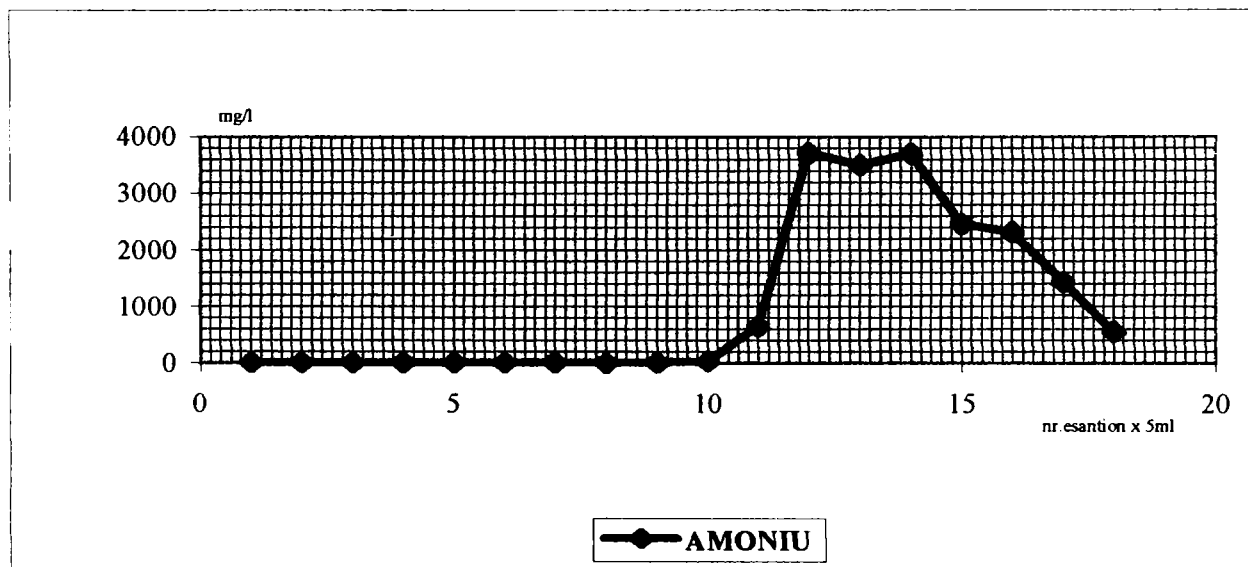
Peste coloana C s-au trecut 20ml soluție 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și s-a eluat cu tampon acetat de pH = 4,7. S-au obținut rezultatele din tab.9.11 și graficul din fig.9.13.

Tab.9.11 Reținerea ionului amoniu pe coloana de SEPHADEX G25

Nr. crt.	Mărimea probei ml	Concentrația NH_4^+ mg/l
1.	5	6.4
2.		5.3
3.		4.4
4.		3.7
5.		5.0
6.		4.7
7.		5.3
8.		3.0
9.		3.7
10.		27.0
11.		650
12.		3720
13.		3500
14.		3695
15.		2457
16.		2316
17.		1434
18.		552

Se constată că ionii amoniu sunt reținuți în gel până la proba nr.10 inclusiv.

Fig.9.13. Etalonarea coloanei cromatografice pentru reținerea ionului amoniu



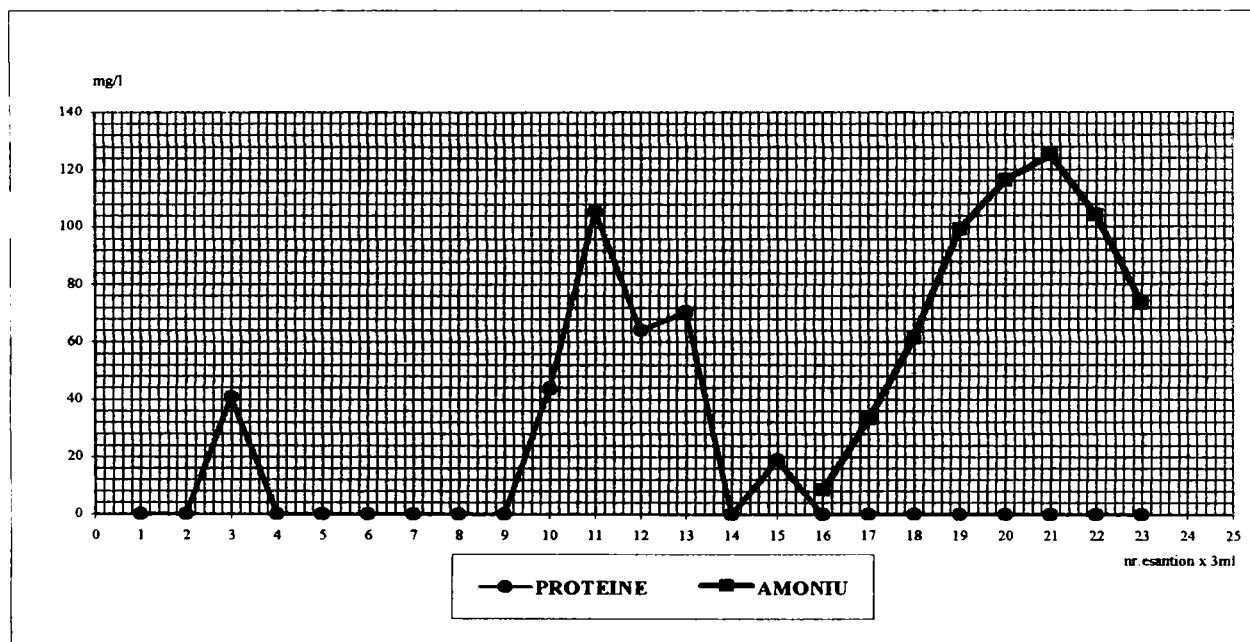
b) Separarea ionului amoniu pe coloana de SEPHADEX G25

S-au supus separării 5ml dintr-o soluție cu conținut de 639mg/l proteine și 6.788mg/l ioni amoniu, rezultată la redizolvarea precipitatului obținut la salifierea cu sulfat de amoniu la saturație de 30%. S-au obținut rezultatele din tab.9.12, redade în graficul din fig.9.14.

Tab.9.12. Separarea ionului amoniu din precipitatul redizolvat de la salifierea la 30% saturație

Nr. eșantion	Mărime ml	Proteine mg/l	Amoniu NH_4^+ mg/l
1.	3	0	0
2.		0	0
3.		40,594	0
4.		0	0
5.		0	0
6.		0	0
7.		0	0
8.		0	0
9.		0	0
10.		43,688	0
11.		105,57	0
12.		64,109	0
13.		70,297	0
14.		0	0
15.		18,936	0
16.		0	8,5
17.		0	33,0
18.		0	61,3
19.		0	99,2
20.		0	116,2
21.		0	125,0
22.		0	104,1
23.		0	73,3

Fig.9.14. Separarea ionului amoniu din precipitatul redizolvat de la salifierea la 30% saturație, pe coloană SEPHADEX G25, Φ 2,2 cm, H = 16,2 cm



Rezultă că timpii de eluție respectiv volumele de retenție pentru proteine și pentru ionul amoniu sunt complet diferiți, ceea ce face separarea posibilă.

9.3. Determinarea masei moleculare a proteinelor precipitate din apele uzate

Masele moleculare sunt o caracteristică esențială a proteinelor și cunoașterea lor permite o mai precisă identificare a naturii proteinelor separate din apele uzate.

Studiul din literatură al metodelor de determinare a masei moleculare a arătat că metoda prin cromatografie pe gel permeabil prezintă avantajul că nu necesită ca proteina să fie pură și permite determinări și în extracte totale așa cum este și cazul proteinelor extrase din apele uzate. Metoda se bazează pe corelația liniară dintre logaritmul masei moleculare a proteinelor și volumul de eluție sau dintre logaritmul masei moleculare și raportul V_e/V_0 dintre volumul de eluție și volumul spațiului gol al coloanei cromatografice găsită de Whitaker.

Raportul V_e/V_0 , denumit și volumul relativ de eluție pare să fie, potrivit autorilor metodei, independent de concentrația proteinei aplicate pe coloană și de dimensiunile coloanei, dar este afectat de variațiile de temperatură.

Etalonarea coloanei cromatografice constă din determinarea volumelor de eluție a unor proteine pure de masă moleculară cunoscută. După etalonare, volumele de eluție pentru proteinele studiate se trec pe curba etalon și se citesc logaritmii maselor moleculare. Andrews și Fischer [100,101,102] au obținut o curbă sigmoidală la reprezentarea grafică a volumelor de eluție în funcție de logaritmii maselor lor moleculare, cu porțiunea centrală dreaptă. Precizia determinării, citată în literatură, este de 93%.

MODUL DE LUCRU

9.3.1. Prepararea coloanei pentru determinarea masei moleculare

REACTIVI ȘI MATERIALE

- SEPHADEX G200; a fost ales SEPHADEX G200 ca gel pentru constituirea coloanei deoarece se pretează pentru întregul domeniu de mase moleculare care se prevăd să se găsească în amestecul de proteine separat din apele uzate. S-a lucrat cu 15g SEPHADEX;
- soluție tampon de pH 4,7;
- coloana cromatografică D, cu diametrul interior de 2,7cm, înălțimea stratului de 66,0cm și volumul stratului $V_1 = 377,7\text{cm}^3$.

Înainte de utilizare, SEPHADEX -ul a fost gonflat în soluție tampon de pH = 4,7 timp de 72 ore, într-un raport corespunzător caracteristicii de reținere a apei, iar coloana formată a fost spălată cu același fel de soluție tampon.

9.3.2. Etalonarea coloanei

Etalonarea s-a realizat prin introducerea în capătul superior al coloanei a 5ml amestec format din 1ml Blue dextran (masa moleculară $M = 2000000$ daltoni), 6,4g urează ($M = 470000 - 510000$ daltoni), 27,8mg albumină serică bovină care a conținut și dimer ($M = 65000 - 70000$ și 135000 daltoni), 1mg glucagon ($M = 3.500$ daltoni) și 5,7mg K_2CrO_4 ($M = 155,1$ daltoni) în tampon de $pH = 4,7$.

Aplicarea amestecului s-a făcut cu ajutorul unei seringi, cu grijă pentru a nu introduce aer în coloana de gel și a nu perturba suprafața uniformă a acesteia.

Eluarea s-a făcut cu soluție tampon cu un debit de 54ml/oră. S-au recoltat fracțiuni de câte 3ml fiecare; în fracțiuni s-au dozat componentele proteice prin metoda Lowry, cu citire la 660nm, iar pentru cromat și Blue-dextran, s-au citit absorbantele la 440nm și respectiv 625nm.

Rezultatele sunt cuprinse în tab.9.13 și sunt reprezentate în graficul din fig.9.15.

Correspondența maximelor cu substanțele standard este redată în tab.9.14.

În graficul din fig.9.15 este reprezentat numărul de fracțiuni corespunzător maximelor de mai sus funcție de logaritmul maselor moleculare. Punctele corespund de la stânga la dreapta la K_2CrO_4 , glucagon, albumină serică bovină, dimerul albuminei serice bovine, urează și Blue dextran.

Cunoscând volumul de eluție pentru Blue dextran, care nu este reținut de gel, se poate obține volumul spațiului gol al coloanei care a fost $V_o = 123ml$.

Volumul gelului din strat V_x definit prin relația :

$$\begin{aligned} V_x &= V_t - V_o & (9.1) \\ V_x &= 214,7 \text{ ml} \end{aligned}$$

Tab. 9.13. Eluarea substanțelor etalon de pe coloana SEPHADEX G200

Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	Absorbanța BLUE DEXTRAN $\times 10^3$ $\lambda=625$ nm	Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	Proteine mg/l	Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	Absorbanța cromat $\times 10^3$ $\lambda=440$ nm
23-32	3	0	23-57	3	0	120	3	9
33	3	1	58	3	14,6	121	3	14
34	3	2	59	3	19,5	122	3	14
35	3	2	60-67	3	0	123	3	18
36	3	3	68	3	9,6	124	3	22
37	3	7	69	3	43,7	125	3	29
38	3	12	70	3	17,1	126	3	35
39	3	22	71	3	74,3	127	3	43
40	3	30	72	3	30,1	128	3	48
41	3	32	73	3	33,8	129	3	53
42	3	31	74	3	39,7	130	3	60
43	3	26	75	3	45,0	131	3	70
44	3	19	76	3	51,1	132	3	76
45	3	16	77	3	86,4	133	3	85
46	3	12	78	3	69,0	134	3	98
47	3	12	79	3	67,8	135	3	103
48	3	10	80	3	67,8	136	3	116
49	3	8	81	3	56,0	137	3	112
50	3	7	82	3	52,3	138	3	124
51	3	7	83	3	37,5	139	3	124
52	3	6	84	3	26,4	140	3	119
53	3	5	85-106	3	0	141	3	110
54	3	0	107	3	33,2	142	3	109
			108	3	38,0	143	3	97
			109	3	43,1	144	3	91
			110	3	46,7	145	3	77
			111	3	38,1	146	3	69
			112-125	3	0	147	3	55
						148	3	49
						149	3	39
						150	3	32
						151	3	23
						152	3	19
						153	3	0
						154	3	0

Tab. 9.14. Etalonarea coloanei cromatografice pe gel permeabil pentru determinarea masei moleculare; corespondența maximelor cu substanțele standard

Fracțiunea	Substanța standard	Volumul de eluție V_e ml
41	Blue Dextran	41 x 3 = 123
59	Urează	59 x 3 = 177
71	Albumină serică bovină dimer	71 x 3 = 213
77	Albumină serică bovină	77 x 3 = 231
110	Glucagon	110 x 3 = 330
139	Cromat	139 x 3 = 417

Fig. 9.15. Eluarea substanțelor etalon de pe coloana SEPHADEX G200,
 Φ 2,7cm, H 66cm

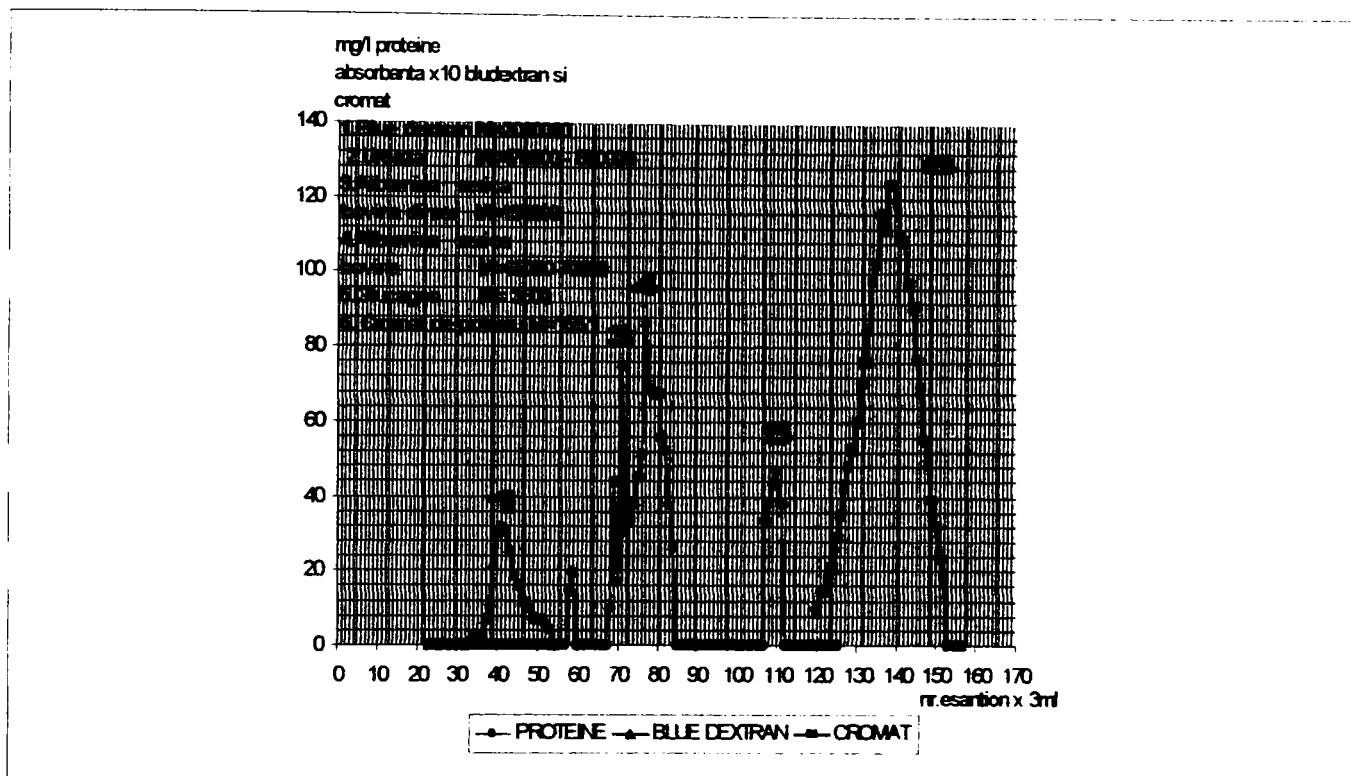
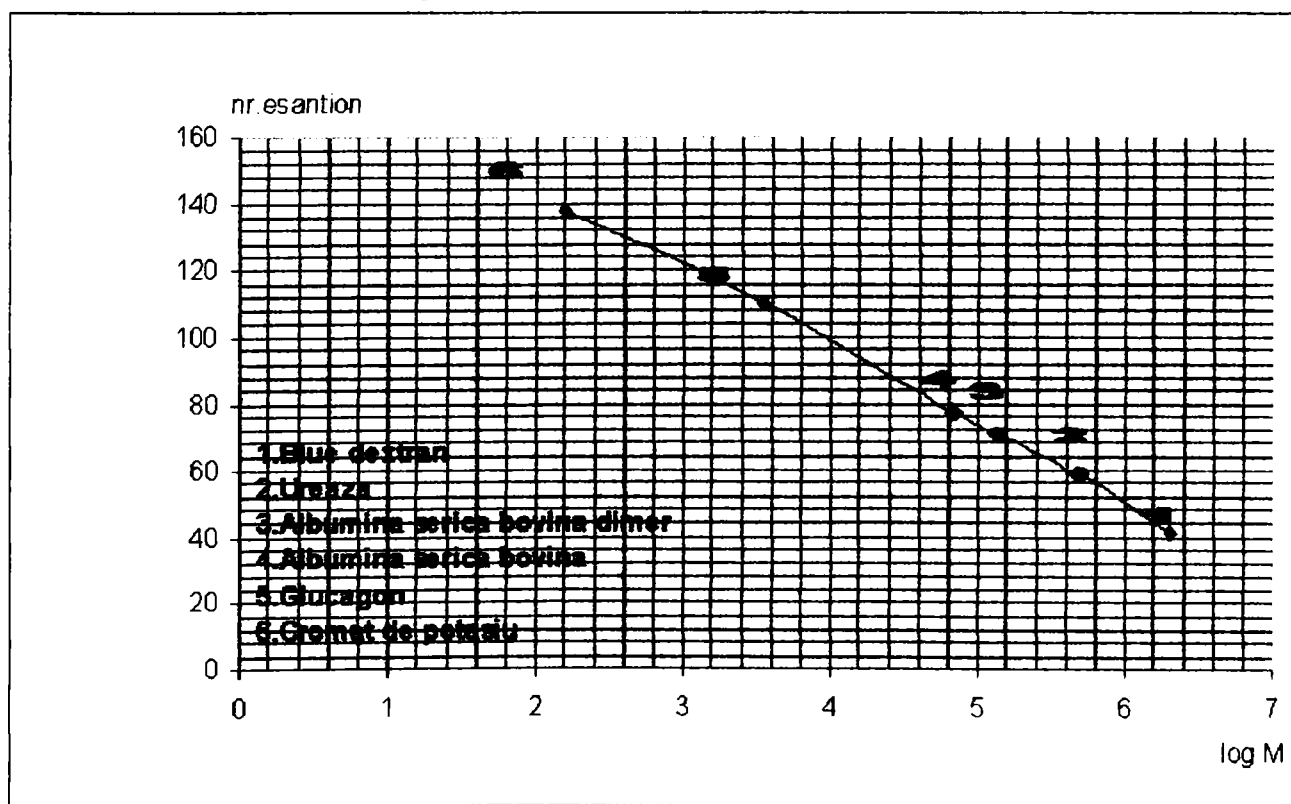


Fig. 9.16. Reprezentarea numărului de fracțiuni eluate funcție de
 logaritmul maselor moleculare



9.3.3. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor separate din apele uzate

REACTIVI ȘI MATERIALE

- soluție de lucru obținută prin redizolvarea în 50 ml apă distilată a precipitatului de la salifiere;
- soluție de cromat de potasiu;
- coloană de gel permeabil SEPHADEX G200 (coloana D).

MODUL DE LUCRU

a) Masele moleculare ale proteinelor separate dintr-un extract de carne salifiat la 30% saturație

După spălarea coloanei cu soluție tampon, soluția rezultată prin redizolvarea precipitatului de la salifiere a fost trecută prin coloana cromatografică (D), împreună cu 1ml K_2CrO_4 dizolvat în aceeași soluție, cu rolul de a indica sfârșitul cromatografiei.

Viteza de eluare a fost de 54 ml/oră. Frațiunile colectate au fost de câte 3 ml.

Proteinele au fost dozate prin metoda Lowry cu citire la 660 nm. Absorbanța cromatului s-a citit la 440 nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele sunt cuprinse în tab. 9.15. și graficul din fig. 9.17.

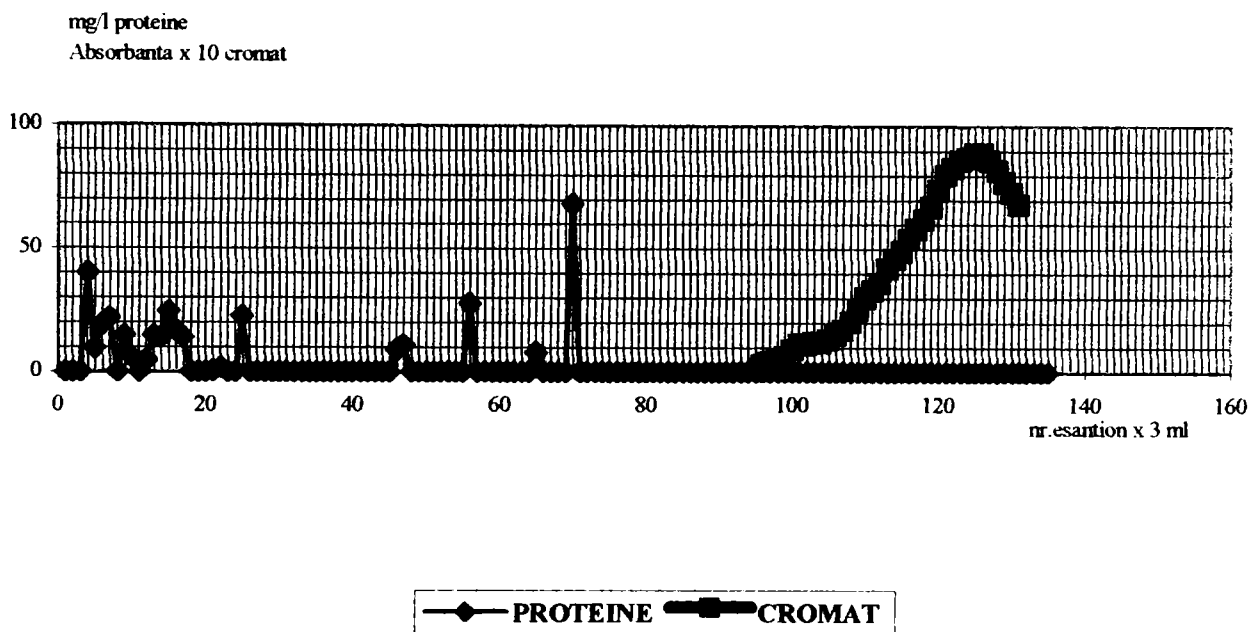
Tab. 9.15. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor din extractul de carne, separate la 30% saturație

Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	PROTEINE		Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	CROMAT Absorbanta x10 ³ la 440 nm
		Absorbanta la 660 nm	Concentrația mg/l			
1-3	3	0	0	96	3	3
4		0,098	39,9	97		4
5		0,024	9,6	98		5
6		0,047	18,9	99		6
7		0,054	22,0	100		9
8		0	0	101		11
9		0,037	14,6	102		11
10		0,013	5,9	103		12
11		0	0	104		12
12		0,011	4,7	105		13
13		0,037	14,6	106		15
14		0,033	13,9	107		17
15		0,061	24,5	108		20
16		0,041	16,5	109		25
17		0,034	14,0	110		30
18-20		0	0	111		33
21		0,001	0,4	112		36
22		0,003	1,6	113		42
23-24		0	0	114		46
25		0,056	22,6	115		49
26-45		0	0	116		54
46		0,022	9,0	117		58
47		0,027	10,9	118		62
48-55		0	0	119		67
56		0,078	27,6	120		74
57-64		0	0	121		80
65		0,019	7,8	122		83
66-69		0	0	123		86
70		0,171	68,4	124		87
71-130		0	0	125		89
				126		89
			127	86		
			128	82		
			129	77		
			130	73		
			131	68		

Prin comparare cu diagrama de eluare a substanțelor etalon (Fig. 9.15.) și prin citire de pe diagrama din fig. 9.16 rezultă următoarele:

- cel mai pregnant maxim se înregistrează la fracțiunea 70 care corespunde domeniului albuminei și masei moleculare 160000 daltoni;
- două picuri mai mici, fracțiunile 56 și 47 corespund domeniului unor molecule mai mari, mase moleculare 380000-1250000 daltoni;
- picurile din domeniul fracțiunilor 4-25 corespund unor molecule foarte mari sau conglomerate care nu sunt reținute pe gel.

Fig.9.17. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor din extractul de carne separate la 30% saturație pe SEPHADEX G200 (Φ 2,7cm, H = 66cm)



Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele electroforezei (Tab. 8.4) care indică un conținut ridicat de albumine și unul mai mic de diferite globuline și cu interpretarea modului în care a decurs salifierea și anume că la 30% saturație a agentului de salifiere are loc și precipitarea moleculelor mari, mai ușor precipitabile.

b) Masele moleculare ale proteinelor separate dintr-un extract de carne salifiat la 60% saturație.

Materialele și substanțele utilizate, precum și modul de lucru au fost identice cu cele descrise la punctul a.

Soluția rezultată prin redizolvarea în 50 ml a precipitatului de la salifiere a fost trecută prin coloana D, împreună cu 1ml K_2CrO_4 dizolvat în aceeași soluție.

Proteinele au fost dozate prin metoda Lowry cu citire la 660 nm iar extincția cromatului s-a citit la 440 nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele sunt cuprinse în tab. 9.16 și graficul din fig. 9.18.

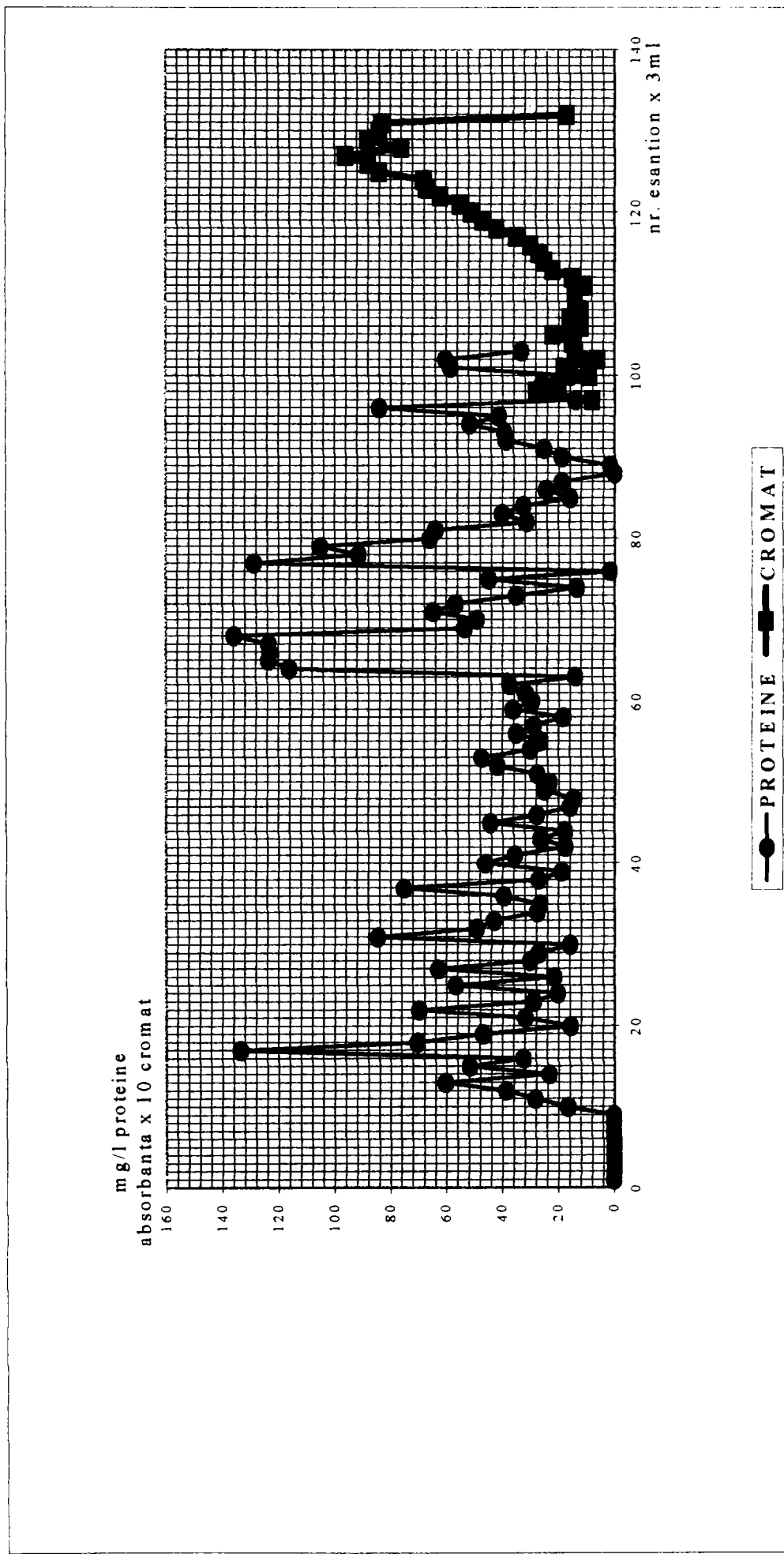
Tab. 9.16. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor din extractul de carne, separate la 60% saturație

Nr. Crt. Frațiune	Mărimea fracțiunii ml	PROTEINE		Nr. Crt. Frațiune	Mărimea fracțiunii ml	CROMAT Absorbanța x10 ³ la 540 nm
		Absorbanța la 660 nm	Concentrația mg/l			
1-9		0	0	97		8
10		0,041	16,5	98		28
11		0,069	28,2	99		20
12		0,095	38,7	100		19
13		0,159	60,4	101		22
14		0,057	23,3	102		26
15		0,128	51,7	103		24
16		0,080	32,5	104		25
17		0,166 *	133,4	105		22
18		0,182	70,3	106		22
19		0,117	46,8	107		26
20		0,039	15,8	108		22
21		0,079	31,9	109		24
22		0,174	69,7	110		24
23		0,072	28,8	111		21
24		0,051	20,2	112		25
25		0,141	56,7	113		22
26		0,053	21,4	114		25
27		0,157	62,9	115		27
28		0,076	30,1	116		30
29		0,067	27,0	117		35
30		0,039	15,8	118		42
31		0,210	84,5	119		47
32		0,123	49,2	120		51
33		0,107	43,1	121		55
34	3	0,066	27,6	122	3	62
35		0,065	26,4	123		67
36		0,097	39,4	124		68
37		0,186	75,2	125		84
38		0,065	27,0	126		88
39		0,047	18,9	127		96
40		0,114	46,2	128		76
41		0,088	35,6	129		88
42		0,042	17,7	130		84
43		0,065	26,4	131		83
44		0,042	17,7	132		17
45		0,111	44,3			
46		0,068	27,6			
47		0,039	15,8			
48		0,036	14,6			
49		0,062	25,1			
50		0,058	23,3			
51		0,068	27,6			
52		0,104	41,8			
53		0,118	47,4			
54		0,076	30,1			
55		0,065	26,4			
56		0,087	35,0			
57		0,072	28,8			
58	3	0,045	18,3			
59		0,090	36,3			
60		0,073	29,5			
61		0,079	31,9			

62		0,093	37,5		
63		0,034	14,0		
64		0,147 *	116,1		
65		0,153 *	123,5		
66		0,152 *	122,9		
67		0,153 *	123,5		
68		0,171	135,9		
69		0,134	53,6		
70		0,122	49,2		
71		0,161	64,7		
72		0,141	56,7		
73		0,087	35,0		
74		0,033	13,4		
75		0,112	44,9		
76		0,002	1,6		
77		0,159*	128,5		
78		0,226	91,3		
79		0,130*	104,9		
80		0,163	66,0		
81		0,151	61,0		
82		0,078	31,3		
83		0,099	40,0		
84		0,080	32,5		
85		0,038	15,8		
86		0,061	24,5		
87		0,041	18,9		
88		0	0		
89		0,002	1,6		
90		0,049	18,9		
91		0,062	25,1		
92		0,095	38,7		
93		0,098	39,3		
94		0,128	51,7		
95		0,101	41,2		
96		0,208	83,9		
97		0,097	14,9		
98		0,058	23,3		
99		0,063	25,7		
100		0,039	15,8		
101		0,145	58,5		
102		0,150	60,4		
103		0,082	33,2		
104-132		0	0		

*Diluție 2

Fig. 9.18. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor din extractul de carne separat la 60% saturatie pe SEPHADIX G200 (Φ 2,7 cm, H = 66 cm)



Prin comparare cu diagrama de eluare a substanțelor etalon (Fig. 9.15) și prin citire de pe diagrama din Fig. 9.16. rezultă următoarele:

– Există o plajă foarte extinsă de mase moleculare, practic fiecare fracțiune între 10-103 conținând proteine ceea ce confirmă rezultatele fracționării anterioare (Fig. 9.6.).

– Față de un câmp de valori relativ uniform, există câteva vârfuri pregnante de concentrație și anume corespunzător fracțiunilor 64-68, 77 și 79-81, masele moleculare sunt 199000-263000, 66100 și 45800-43700 daltoni. Dintre aceste maxime, cele de la poziția 79-81 și 77 se situează în domeniul albuminelor (fracțiunea 77 are chiar poziția și masa moleculară a albuminei serice bovine).

Maximele de la poziția 64-68 corespund probabil unor proteine globulare, a căror prezență a fost semnalată și prin electroforeză (tab. 8.4.). De altfel, întregul domeniu al fracțiunilor 10-68 dovedește prezența unor molecule mari de globuline.

c) Masele moleculare ale proteinelor separate din ape uzate de la abatoare salifiate la 30% saturație.

Soluția rezultată prin redizolvarea în 50 ml apă a precipitatului de la salifiere a fost trecută prin coloana D, împreună cu 1ml K₂CrO₄ dizolvat în aceeași soluție. Viteza de eluare a fost de 54 ml/oră. Au fost colectate fracțiuni de câte 3 ml în care proteinele au fost dozate prin metoda Lowry cu citire la 660 nm iar absorbanta cromatului s-a citit la 440 nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele sunt prezentate în tab. 9.17 și fig. 9.19.

Tab. 9.17. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor din apele uzate, separate la 30% saturație

Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	PROTEINE		Nr. Crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	CROMAT Absorbanta x10 ³ la 440 nm	
		Absorbanta la 660 nm	Concentrația mg/l				
1-27	3	0	0	73	3	17	
28		0,007	2,8	74		23	
29		0,009	4,1	75		27	
30		0,203	82,0	76		26	
31		0,152*	122,3	77		26	
32		0,225*	182,3	78		28	
33		0,204*	165,6	79		28	
34		0,229*	194,1	80		24	
35		0,204*	166,2	81		24	
36		0,164*	132,2	82		5	
37		0,169*	136,5	83		5	
38		0,141*	114,8	84		6	
39		0,130*	105,0	85		5	
40		0,130*	105,0	86		2	
41		0,203*	164,4	87		0	
42		0,157	64,5	88		2	
43-94			0	0		89	0
95			0,027	10,9		90	0
96			0,076	30,1		91	0

97		0,067	26,9	92		7
98		0,104	41,8	93		0
99		0,176	70,3	94		2
100		0,141	57,3	95		9
101		0,178	71,5	96		5
102		0,132*	106,8	97		8
103		0,198	79,6	98		8
104		0,197	79,0	99		8
105		0,147*	117,9	100		5
106		0,095	38,7	101		5
107		0,227**	366,7	102		7
108		0,130**	210,1	103		8
109		0,057	23,3	104		13
110		0,214**	347,5	105		14
111		0,149*	119,8	106		21
112		0,210	84,5	107		18
113		0,231	93,8	108		18
114		0,248	100,0	109		18
115	3	0,141*	113,6	110	3	88
116		0,223	90,1	111		36
117		0,138*	112,4	112		36
118		0,214	86,4	113		34
119		0,179	72,2	114		34
120		0,210	84,5	115		45
121		0,176	70,9	116		39
122		0,036	14,6	117		39
123		0,037	15,2	118		42
124		0,038	15,8	119		37
125		0,016	7,2	120		36
126		0,030	12,7	121		35
127-131		0	0	122		36
				123		33
				124		30
				125		30
				126		26
				127		26
				128		25
				129		23

* Diluție 2

** Diluție 4

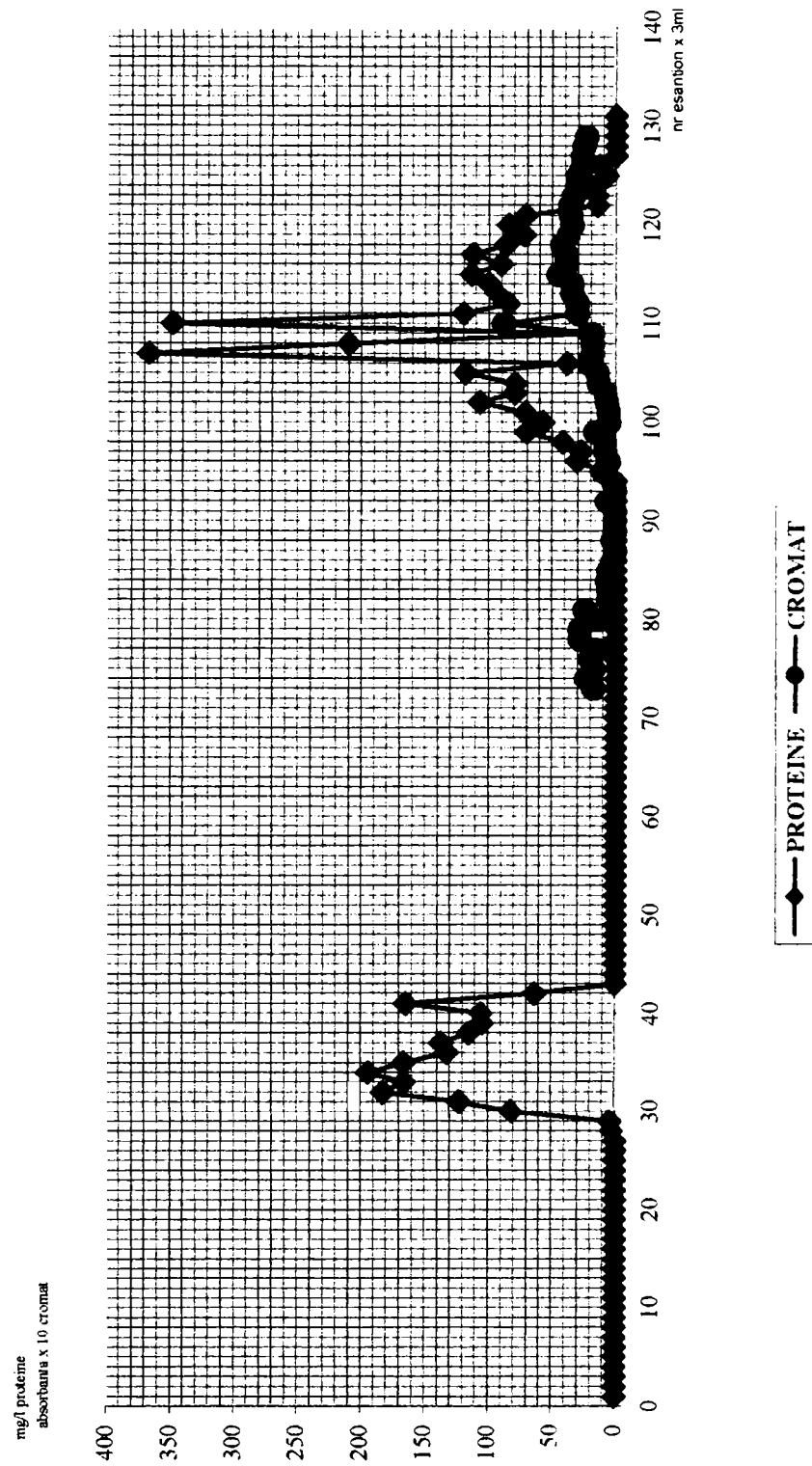
Prin comparare cu diagrama de eluare a substanțelor etalon (Fig. 9.15.) și prin citire de pe diagrama din Fig.9.16. rezultă următoarele:

– cel mai pregnant maxim se înregistrează în domeniul fracțiunilor 105-115 ceea ce corespunde unor proteine cu mase moleculare mici, în jur de 3500 daltoni. Acest domeniu este însoțit de un spectru mai larg de mase moleculare corespunzător eșantioanelor 95-126, adică maselor moleculare cuprinse între 560 și 15000 daltoni;

– picurile din domeniul fracțiunilor 30-42 corespund unor mase moleculare mari ale unor molecule care nu sunt reținute pe gel;

– deși există diferențe față de masele moleculare înregistrate în cazul extractelor de carne (tabelul 9.15. și figura 9.17.), se confirmă concluzia că în condițiile salifierii la 30% pe lângă moleculele cu mase moleculare mici precipită și

Fig. 9.19. Determinarea masei moleculare ale proteinelor din ape uzate separate la 30% saturatie pe SEPHADEX G200 (Φ 2,7 cm, H=66 cm)



molecule mari. Moleculele mici au mase moleculare mai mici decât la extracte probabil din cauza hidrolizei în timpul fierberii în procesul tehnologic.

d) Masele moleculare ale proteinelor separate din ape uzate de la abatoare salifiate la 60% saturație

Substanțele, materiale și metoda au fost similare cu cele descrise la punctul a. Soluția rezultată prin redizolvarea în 50ml apă a precipitatului de la salifiere a fost trecută prin coloana D, împreună cu K₂CrO₄ dizolvat în aceeași soluție. Au fost colectate fracțiuni de câte 3ml în care proteinele au fost dozate prin metoda Lowry cu citire la 540nm iar absorbanta cromatului s-a citit la 660nm.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele sunt prezentate în tab.9.18 și fig.9.20

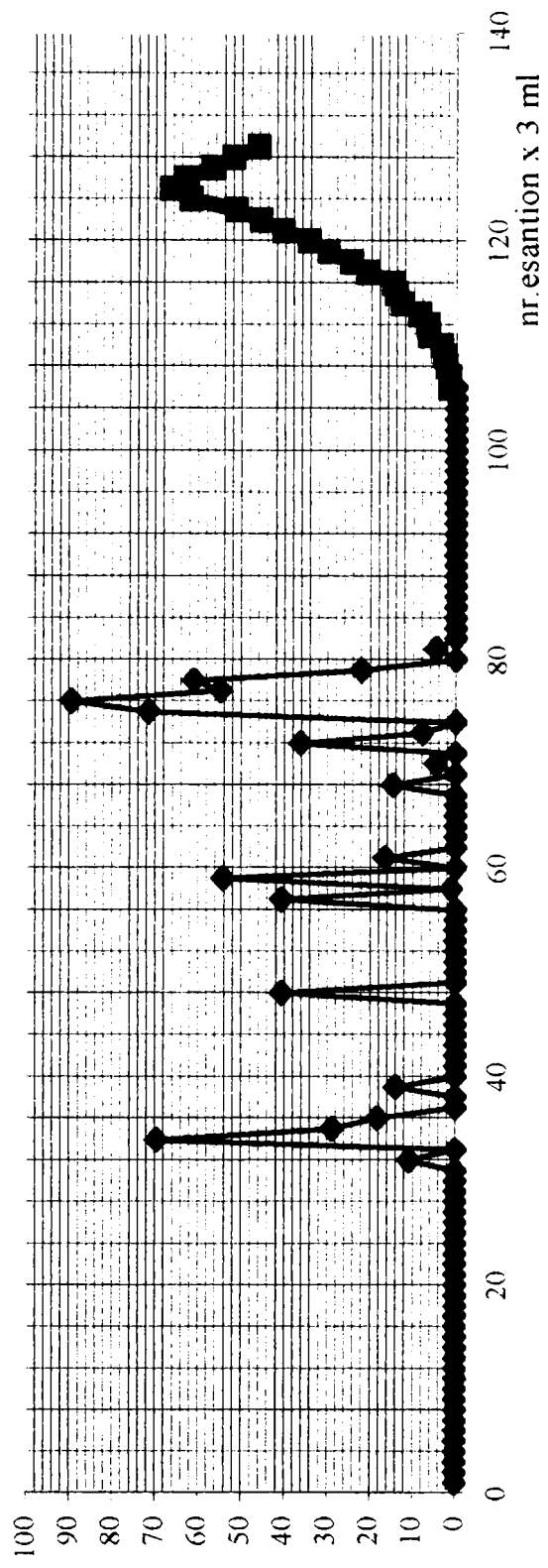
Tab. 9.18. Determinarea maselor moleculare ale proteinelor din apele uzate, separate la 60% saturație

Nr. crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	PROTEINE		Nr. Crt. fracțiune	Mărimea fracțiunii ml	CROMAT Absorbanta x10 ³ la 440 nm
		Absorbanta la 660 nm	Concentrația mg/l			
1÷30	3	0,000	0,000	106	3	16
31		0,027	10,891	107		16
32		0,000	0,000	108		22
33		0,173	69,678	109		27
34		0,072	28,837	110		35
35		0,045	18,317	111		64
36		0,000	0,000	112		67
37		0,000	0,000	113		87
38		0,034	13,985	114		127
39÷46		0,000	0,000	115		140
47		0,100	40,594	116		167
48÷55		0,000	0,000	117		208
56		0,100	40,594	118		245
57		0,002	0,990	119		298
58		0,134	54,208	120		343
59		0,000	0,000	121		403
60		0,041	16,460	122		456
61÷66		0,000	0,000	123		514
67		0,036	14,604	124		619
68		0,000	0,000	125		665
69		0,010	4,703	126		630
70		0,000	0,000	127		569
71		0,089	36,262	128		519
72		0,019	7,797	129		461
73		0,000	0,000			
74		0,178	71,535			
75		0,222	89,480			
76		0,148	59,777			
77		0,151	61,015			
78		0,054	22,030			
79		0,000	0,000			
80		0,010	4,703			
81	0,000	0,000				
82÷106	0,000	0,000				

Prin comparare cu diagrama de eluare a substanțelor etalon (fig.9.15) și prin citire de pe diagrama din fig.9.16 rezultă următoarele:

- cel mai pregnant maxim se înregistrează în domeniul fracțiunilor 71-72 și 74-77 care corespunde domeniului albuminelor ($M=65000\div 130000$ daltoni).
- mai apar maximele fracțiunilor 58 și 60 care corespund unor mase moleculare mai mari ($M\sim 500000$ daltoni, globuline). Din tab.3.4 rezultă că miozina are această masă moleculară.
- un domeniu bine reprezentat este acela al fracțiunilor 33-35 care corespund unor mase moleculare foarte mari, de ordinul de mărime 10^6 daltoni.
- deși există diferențe față de masele moleculare înregistrate în cazul extractelor de carne (tab.9.16 și fig.9.18), se confirmă prezența albuminelor precum și a unor molecule cu masă moleculară mare. Prezența unor proteine cu o gamă largă de mase moleculare, inclusiv mase moleculare mici, este explicabilă prin faptul că este vorba de proteine reziduale din carne procesată care a fost supusă unor procedee mecanice (tranșare, măcinare și amestecare inclusiv cu ingrediente ca NaCl) și termice (opărire, fierbere), procese care au favorizat denaturarea și probabil scindarea catenelor proteice.

mg/l proteine
absorbanta x 10E3 cromat



—◆— PROTEINE —■— CROMAT

10. TESTAREA PROTEINELOR SEPARATE PRIN SALIFIERE DIN APELE UZATE DE LA ABATOARE CA ADAOS LA FURAJAREA GĂINILOR OUĂTOARE

10.1. Pregătirea probelor de proteine

Proteinele obținute prin salifiere la saturație 60% a apelor uzate de la abatoare au fost purificate înainte de testare în vederea eliminării ionilor anorganici, în special a ionilor amoniu și clor care sunt contraindicați în furajele găinilor.

Separarea s-a făcut prin cromatografie pe gel permeabil, folosind FILTRADEX R50 produs de Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași. Pentru a evita introducerea unor componente dăunătoare animalelor testate, gonflarea s-a făcut cu apă distilată.

MATERIALE

- gel FITRADEX R50; coloană cu diametrul interior de 80mm și înălțimea stratului de gel de 18,5cm, volum total de gel $V_1 = 1040,44\text{cm}^3$ (coloana E).
- soluție rezultată prin redizolvarea precipitatului format la salifierea apei uzate la 60% saturație;

MODUL DE LUCRU

10.1.1. Pregătirea coloanei cromatografice

27 g FILTRADEX R50 s-au lăsat în 800 ml apă distilată timp de 72 ore pentru gonflare, după care din gelul format s-a constituit coloana E. Coloana formată s-a spălat cu apă distilată.

10.1.2. Etalonarea coloanei

În coloana E s-au introdus 50 ml soluție rezultată prin redizolvarea precipitatului format la salifierea la 60% saturație a apei uzate de la faza de fierbere, cu 1776,6 mg/l proteine și 1061,8 mg/l NH_4^+ .

Eluarea s-a făcut cu apă distilată. În probele recoltate la baza coloanei s-au determinat proteinele prin metoda Gornall cu citire la 540 nm și ionul amoniu cu reactiv Nessler cu citire la 440 nm. Rezultatele sunt cuprinse în tabelul 10.1 și graficul din figura 10.1.

În condițiile de lucru cu FILTRADEX R50 separarea ionului amoniu de proteinele separate prin salifiere din ape uzate nu este atât de netă ca la folosirea SEPHADEX G25 (tab. 9.12, graficul din fig. 9.14). Totuși, dacă pe coloana dată se colectează primele 50 de fracțiuni se obține un produs cu conținut redus de ioni amoniu, dar cu pierderea evidentă de cantități semnificative de proteine.

Tabelul 10.1. Etalonarea coloanei de separare a ionului amoniu din precipitatul de la salifiere

Nr. crt. fracțiune*	Conținut de proteine mg/l	Nr. crt. Frațiuni*	Conținut de proteine mg/l	Nr. crt. fracțiune*	Conținut de ioni amoniu Mg/l
1-10	0	62	0,0	15	1,0
11	100,6	63	0,4	20	3,0
12	82,2	64	26,4	25	3,0
13	75,9	65	5,9	30	3,0
14	75,9	66	15,8	35	3,0
15	75,9	67	18,3	40	3,0
16	38,2	68	0,0	45	3,7
17	46,7	69	14,0	50	4,2
18	46,3	70	74,0	55	8,8
19	24,3	71	18,9	60	22,7
20	46,1	72	20,8	63	87,6
21	45,2	73	39,0	65	89,3
22	78,9	74	68,2	68	100,3
23	195,4	75	66,4	70	101,9
24	244,9	76	95,8	74	105,4
25	202,5	77	140,3	75	106,6
26	201,9	78	205,1	76	122,8
27	126,6	79	215,5	77	119,5
28	98,1	80	233,7	78	118,6
29	86,6	81	244,9	79	118,1
30	84,4	82	234,1	80	111,0
31	87,3	83	232,1	85	108,2
32	84,2	84	231,9	90	99,7
33	93,2	85	200,7	95	86,8
34	92,1	86	305,1	100	83,5
35	88,9	87	218,4	105	65,9
36	86,4	88	206,0	110	48,3
37	92,0	89	198,1	115	40,6
38	89,0	90	157,9	120	18,4
39	87,4	91	146,5		
40	79,4	92	123,5		
41	74,9	93	124,9		
42	70,3	94	126,6		
43	67,4	95	127,2		
44	66,2	96	120,4		
45	67,4	97	78,8		
46	65,3	98	73,3		
47	66,7	99	97,3		
48	70,9	100	101,4		
49	64,9	101	92,8		
50	42,6	102	42,7		
51	20,8	103	32,3		
52	20,2	104	23,6		
53	30,1	105	16,5		
54	61,0	106	15,1		
55	51,9	107	13,0		
56	42,5	108	28,8		
57	31,9	109	42,8		
58	26,4	110	14,5		
59	0,0	111	25,7		
60	48,6	112	27,0		
61	1,0	113-120	0,0		

* volumul eşantioanelor culese 10 ml

10.1.3. Pregătirea probelor de proteine

Soluția de proteină rezultată prin redizolvarea precipitatului de la salifierea apei uzate de la abatoare, cu un conținut de 446 mg/l proteine și 598 mg/l NH_4^+ , s-a trecut pe coloana E de gel FILTRADEX R50, s-a eluat cu apă distilată și s-a captat prima porțiune de 500 ml de eluat. Soluția astfel obținută s-a concentrat într-un rotovapor și pe baie de apă la 35 – 40 mm col Hg (30 –45°C).

Din cauză că prin concentrare conținutul de ioni amoniu a crescut la 16,8 mg/l, concentratul s-a trecut din nou pe coloana E de FILTRADEX și s-a eluat cu apă distilată. S-au captat primii 500 ml din eluat și s-a supus concentrării prin evaporare în vid. După repetarea operației și o nouă evaporare în vid s-a obținut o soluție cu conținut de 2702,0 mg/l proteine și 3,1 mg/l NH_4^+ , care s-a folosit ca adaus la furajare.

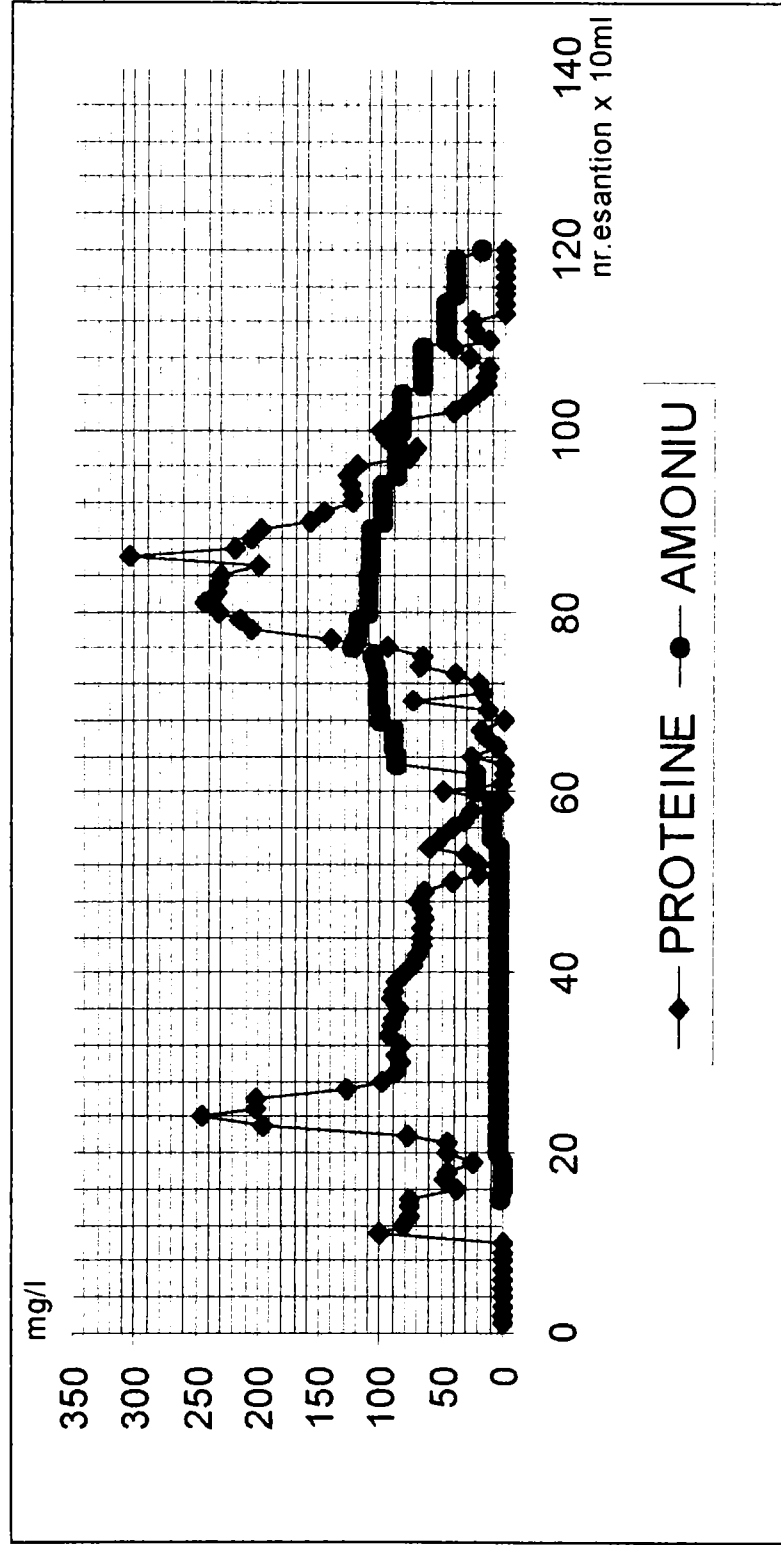
Rezultatele sunt redate în tab. 10.2.

Tab. 10.2. Pregătirea probelor de proteine

NR. CR T.	FAZA	VOLUM REZULT AT	CONȚINUT DE PROTEINE		CONȚINUT DE IONI AMONIU	
			ml	mg/l	mg	mg/l
1.	Eluare coloană	500	70,3	35,1	2,6	1,30
2.	Concentrare în vid	75	456,6	34,2	16,8	1,26
3.	Eluare coloană	500	64,5	32,2	0,4	0,20
4.	Concentrare în vid	74	428,5	31,7	2,6	0,19
5.	Concentrare în vid	11	2880,2	31,6	17,7	0,19
6.	Eluare coloană	500	60,3	30,1	0,1	0,05
7.	Concentrare în vid	73	402,1	29,3	0,6	0,04
8.	Concentrare în vid	10	2702,0	27,0	3,1	0,03

În concluzie, în produsul rezultat la concentrarea celor 500 ml eluat din coloană s-au recuperat 30,4% din proteina introdusă inițial, iar cantitatea de ioni amoniu din soluția proteică a scăzut la 0,06% din cantitatea inițială.

Fig. 10.1. Etalonarea coloanei pentru separarea ionului amoniu din proteinele precipitate prin salifiere pe ILTRADIX R25, Φ 8cm, H 18,5cm



10.2. Testarea proteinelor separate din apele uzate de la abatoare ca adaos la furajarea animalelor

Testarea a fost efectuată în colaborare cu Facultatea de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, în laboratorul de nutriție al Universității.

MATERIALE ȘI METODĂ

Testarea s-a efectuat în sistem intensiv de exploatare pe așternut permanent pe 4 loturi de câte 10 găini din rasa Sussex, notate C (lotul de control) și E₁, E₂, E₃ (loturile experimentale).

Apa și nutrețurile au fost administrate "ad libitum" și consumul mediu zilnic de nutrețuri s-a stabilit prin diferența între cantitățile administrate și resturile colectate zilnic din hrănitore. Colectarea ouălor s-a făcut în cuptoare tip "capcană".

Perioada testului a fost precedată de 14 zile de adaptare la condițiile experimentului care a durat 91 zile (14 săptămâni).

În hrana celor 4 loturi a fost folosit nutrețul combinat 2004 P specific hrănirii găinilor pentru ouă consum. Compoziția furajului combinat 2004 P și al premixului 2407 HAA care intră în compoziția lui, livrate de firma LNB Romania, recomandată pentru găini ouătoare este următoarea:

Componentă		Furaj 2004 P	Premix 2407 HAA	
Porumb		545	Proteină animală, făină de pește, proteină vegetală, fosfat dicalcic, sare, piatră de var, D- metionină, L- lizină, inhibitori fungi, vitamine, premixuri minerale	
Grâu		120		
Șrot de floarea soarelui 32%		50		
Șrot de soia 44%		110		
Calciu		75		
Premix		100		
Total		1000		
Valori compoziționale	U.M.	Minim	Minim	maxim
Proteinbrută	%	17,24	48	
Energie metabolizată	Kcal/kg	2755,8	2200	
Grăsime brută	%	3,56	5,0	
Sare	%	0,35		
Sodiu	%	0,15	1,3	1,8
Calciu	%	3,72	8,0	9,0
Fosfor	%	0,64	3,0	
Lizina	%	0,79	2,4	
Metionina și cistina	%	0,68	1,9	

La loturile E₁, E₂, E₃ s-a folosit același tip de nutreț combinat la care procentul de proteină s-a diminuat de la 17,24% la 16,74% proteină pentru lotul E₁, 16,24% la lotul E₂ și 15,74% proteină la lotul E₃ și s-a înlocuit cu produsul rezultat din apele

uzate de la abatoare prin salifiere și trecere peste coloana gelcromatografică pentru îndepărtarea ionilor anorganici.

Condițiile experimentale sunt sintetizate în tab. 10.2.

Tab.10.3. Condițiile experimentale ale testării proteinelor din apele uzate ca adaus furajer pentru ouă consum

Specificare	Lotul C	Lotul E ₁	Lotul E ₂	Lotul E ₃
Număr de indivizi (găini)	10	10	10	10
Vârsta (săptămâni)	27	27	27	27
Durata preexperimentului (zile)	14	14	14	14
Durata experimentului (zile)	91	91	91	91
Consumul de nutrețuri combinate g/zi	124,25	125,78	126,42	127,09
Conținut de proteină în nutreț %	17,5	17,0	16,5	16
Aportul de proteine în N.C. g/zi	21,74	21,38	20,86	20,33

Pentru completarea proteinelor din loturile E₁, E₂, E₃ sunt necesare 0,36 g/zi, 0,88 g/zi și respectiv 1,41 g/zi proteine din apele uzate. S-au folosit probe de proteine pregătite așa cum s-a descris la punctul 10.1.3. Nutrețurile au fost umectate cu soluția proteică de completare, după care au fost lăsate pentru uscare la aer cu vânturare periodică.

Au fost efectuate determinări privind starea de sănătate a găinilor la încheierea testării, productivitatea în ouă și calitatea acestora. Determinările chimice, biochimice și hematologice s-au executat prin metode uzuale [120, 121], iar rezultatele au fost prelucrate statistic prin metoda Student cu P = 95% [122].

MODUL DE LUCRU [123, 124, 125]

1. **Determinarea albuminei serice** se face prin metoda biuretelui folosind un reactiv NOBIS cu conținut de 18 mmol/l iodură de potasiu, 12 mmol/l sulfat de cupru, 32 mmol/l tartrat de sodiu și potasiu și 200 mmol/l hidroxid de sodiu. Drept etalon s-a folosit o soluție de 6 g/l albumină serică bovină de la același furnizor. Citirea s-a făcut la 546 nm.
2. **Determinarea transaminazei GOT** pe cale cinetică cu citire în U.V. cu reactivi NOBIS folosește un tampon fosfat pH = 7,4 (80 mmol/l) și reactiv constituit din 200 mmol/l L-aspartat, LDH ≥ 1,2 U/ml, MDH ≥ 0,6 U/ml, NADH ≥ 0,18 U/ml și α - oxoglutarat 12 mmol/l.

Viteza de oxidare a coenzimei NADH implicate în reacție este proporțională cu activitatea GOT din probă și absorbanța pe minut citită la 334, 340 și respectiv 365 nm – scade.

Se amestecă conținutul unui flacon de tampon cu conținutul unui flacon de enzime.

În cuva de 1 cm a spectrofotometrului se pipetează 2500 μl reactiv enzimatic și 250 μl probă. Se amestecă, se fac citirile la un minut și apoi exact la 1,2 și 3 minute față de aer, la 37°C, la 334 nm, 340 nm și 365 nm.

Se calculează activitatea GOT folosind factorii F = 1780 (pentru 334 nm), 1745 (340 nm), 3235 (365 nm):

$$\Delta A/\text{min} \times F = U/l$$

unde Δ A/min este modificarea densității optice medii pe minut.

3. **Determinarea transaminazei GPT** pe cale cinetică cu citire în U.V. cu reactivi NOBIS folosește un tampon fosfat pH = 7,4 (80 mmol/l) și reactiv constituit din 800 mmol/l L- alanină, LDH ≥ 1,2 U/ml, NADH ≥ 0,18 U/ml, α - oxoglutarat 18 mmol/l.

Viteza de oxidare a coenzimei NADH implicate în reacție este proporțională cu activitatea GPT din probă și produce scăderea absorbantei pe minut, măsurată la 334 nm, 340 nm și respectiv 365 nm.

Se amestecă conținutul unui flacon de tampon cu conținutul unui flacon de enzime (raportul este de 10:1 vol).

În cuva de 1 cm se pipetază 2500μl reactiv enzimatic și 250μl probă. Se amestecă, se fac citirile la un minut și apoi exact la 1,2 și 3 minute față de aer, la 37°C, la 334 nm, 340 nm și 365 nm.

Din cele trei citiri se calculează modificarea medie a densității optice pe minut ($\Delta A/\text{min}$) și cu acesta se calculează activitatea GPT folosind factorii F 1780 pentru 334 nm, 1745 pentru 340 nm și 3235 pentru 365 nm.

$$\Delta A/\text{min} \times F = U/l$$

4. **Determinarea calcemiei** se face colorimetric și se bazează pe reacția ionului de calciu cu albastrul de bromtimol în mediu alcalin cu formarea unui colorant complex albastru. Creșterea absorbantei complexului la 578 nm este proporțională cu concentrația de calciu.

Reactivi

- un amestec format din 0,14 mmol/l albastru de timol, 16,0 mmol/l 8-hidroxichinolină și 0,1 mol/l HCl, o soluție tampon din etanolamină 2,0 mol/l de pH = 2,5 care mai conține 0,1% sulfură de sodiu;
- un lichid de calibrare cu conținut de 2,5 mmol/l calciu.

Modul de lucru

Se amestecă reactivul cu tamponul în proporție de 1:1.

În cuva de 1 cm se pipetează 10μl de probă și 1000μl reactiv, se amestecă și se citește în max 60 de minute la 578 nm față de martor.

5. **Determinarea fosfatazei alcaline** se bazează pe reacția de scindare a substratului p – nitrofenilfosfat de către fosfataza alcalină în fosfat și indicatorul p – nitrofenol de culoare galbenă. Creșterea absorbantei pe minut, măsurată la 405 nm este proporțională cu activitatea fosfatazei alcaline din probă.

Reactivi

- un tampon de pH = 9,8 cu conținut de 1,0 mol/l dietanolamină;
- un reactiv cu conținut de 10mmol/l p – nitrofenilfosfat și 0,5 mmol/l MgCl₂.

Modul de lucru

Se amestecă reactivul cu soluție tampon în proporție 1:10 vol. În cuva de 1 cm se pipetează 25μl din probă și 2500μl din reactiv, se amestecă, se citește absorbanta la 37°C la 405 nm față de aer după un minut și apoi exact după 1,2 și 3 minute.

Din cele 3 citiri se calculează modificarea medie a densității optice pe minut (A/min) care se folosește cu factorul $F = 5454$ pentru calculul activității fosfatazei alcaline:

$$A \text{ min} \times F = U I$$

6. **Determinarea proteinelor brute (P.B.)** se face prin metoda Parnas-Wagner (Micro-Kjeldahl), luându-se în lucru 0,2 g probă de analizat și lucrând după procedeul descris pentru analiza apei.

7. **Determinarea cenușii brute (C.B.)**

Într-un creuzet de porțelan se cântăresc 5 g probă, creuzetul se așează înclinat pe un triunghi și se încălzește cu flacără mică până nu se mai degajă gaze. Se calcinează apoi până se obține o cenușă liberă de cărbune. După calcinare se răcește în exicator și după o oră se cântărește:

$$\% \text{ cenușă} = \frac{M_2 \cdot 100}{M_1}$$

unde:

M_1 este masa probei supuse calcinării (g)

M_2 este masa cenușii (g)

8. **Determinarea grăsimii brute (GB)**

Reactivi

- hidroxid de potasiu;
- probă uscată.

MODUL DE LUCRU

Într-un balon de 1 l se amestecă 10 g produs de analizat uscat până la masă constantă la 105°C cu 300 ml apă în care s-au dizolvat 10 g KOH.

Se încălzește amestecul pe baia de apă până devine transparent, se adaugă 100 ml alcool etilic 96%, se acoperă gâtul balonului cu un dop de cauciuc și se continuă fierberea pe baia de apă încă 20 de minute.

După fierbere și răcire se acidifică conținutul balonului cu acid clorhidric în prezență de fenolftaleină, se filtrează printr-un filtru cutat și se spală de două ori cu alcool 96%. Filtratul și alcoolul de spălare se evaporă pe baia de apă.

Reziduul uscat se reia cu o cantitate convenabilă de eter, se centrifughează 10 minute la 3000 rot/min într-un flacon cântărit. Lichidul clar se evaporă din nou pe baie și se cântărește reziduul sec care este constituit din grăsimi și acizi grași. Rezultatul se raportează la 100g produs luat în lucru.

O alternativă a procedeului este extracția continuă în aparatul Soxhlet.

9. **Determinarea substanței uscate(S.U.)**

Într-o capsulă de porțelan se introduc în jur de 10 mg produs exact cântărit și se evaporă pe baie de apă. După evaporare, capsula se introduce în etuvă la 100°C pentru două ore și jumătate. După răcire în exicator se cântărește:

$$\% \text{ substanță uscată} = \frac{M \cdot 100}{M_1}$$

unde M este masa după uscare (g)

M_1 este masa probei inițiale (g)

REZULTATE SI DISCUTII

S-a constatat că starea de sănătate a păsărilor din loturile experimentale a fost bună, lucru dovedit prin rezultatele analizelor redată în continuare. De asemenea calitatea și producția de ouă se încadrează în limite normale.

a) Parametrii fiziologici ai păsărilor din loturile experimentale la încheierea testării

- Parametrii hematologici ai găinilor din loturile experimentale sunt redați în tab.10.3.

Tab.10.4 Parametrii hematologici ai găinilor la încheierea testării

Nr. Crt.	Parametrul hematologic	U.M.	Lotul	valoarea	% din lotul C	Limite fiziologice
1.	Eritrocite	Mil/mmc	C	2,70	100	2,7±0,25
			E ₁	2,80	101,8	
			E ₂	2,85	103,6	
			E ₃	2,90	105,4	
2.	Leucocite	Mii/mmc	C	26,25	100	25,0±3,0
			E ₁	25,75	98	
			E ₂	28,00	106,6	
			E ₃	27,00	102,8	
3.	Hemoglobină	G/dl	C	9,20	100	9,7±1,0
			E ₁	9,50	103,2	
			E ₂	9,70	105,4	
			E ₃	8,90	96,7	
4.	Hematocrit	%	C	31,50	100	29,0±3,5
			E ₁	32,25	102,3	
			E ₂	29,00	92,0	
			E ₃	30,75	97,6	

C = lotul de control

E₁, E₂, E₃ = loturile experimentale

Aceste rezultate sunt comparabile cu cele din literatura de specialitate [126, 127].

- Parametrii biochimici sanguini ai găinilor din loturile experimentale sunt redați în tab. 10.4

Tab.10.5 Parametrii biochimici sanguini ai găinilor la încheierea testării

Nr. Crt.	Parametrul biochimic	U.M.	Lotul	valoarea	% din lotul C	Limite fiziologice
1.	Albumina serică	g/dl	C	2,30	100	2,3±0,4
			E ₁	2,05	89,13	
			E ₂	2,20	95,65	
			E ₃	2,25	97,82	
2.	Transaminaza GOT	U/l	C	60,00	100	100,0±60,0
			E ₁	55,00	91,66	
			E ₂	62,00	103,33	
			E ₃	50,00	83,33	
3.	Transaminaza GPT	U/l	C	12,60	100	12,0±8,0
			E ₁	13,75	109,12	
			E ₂	14,30	113,49	
			E ₃	15,35	121,82	
4.	Calcemie	mg/dl	C	27,00	100	30±5,0
			E ₁	22,50	83,33	
			E ₂	24,75	91,66	
			E ₃	26,50	98,14	
5.	Fosfataza alcalină	U/100ml	C	56,00	100	41,0±30,0
			E ₁	53,75	95,98	
			E ₂	58,25	104,00	
			E ₃	57,70	103,03	

Se constată că parametrii biochimici sanguini se încadrează în limite fiziologice normale.

- Masa corporală a găinilor din cele 4 loturi a fost determinată prin cântărire individuală la începutul și la sfârșitul perioadei experimentale. Masa corporală medie pe loturi este dată în tab.10.5

Tab.10.6 Masa corporală a găinilor din loturile experimentale

Nr. Crt.	Denumirea	LOTUL			
		C	E ₁	E ₂	E ₃
1.	Masa corporală inițială $x \pm Sx$ (g)	2235±3,50	2173±11,85	2140±2,25	2125±4,75
2.	Masa corporală finală $x \pm Sx$ (g)	2825±4,75	2705±3,15	2650±3,85	2630±5,35
3.	Sporul de masă (g)	590±7,00	532±4,0	510±5,00	505±8,00
4.	Sporul procentual față de masa inițială %	26,40 100%	24,48 92,73%	23,38 88,6%	23,38 88,6%
5.	Aportul de proteine în N.C. g/zi	21,74	21,38	20,86	20,33
6.	Sporul procentual raportat la aportul de proteină din N.C. (rând 4/rând 5)	1,21 100%	1,14 94,21%	1,12 92,56%	1,15 95,04%

Sporul relativ maxim (rândul 3) s-a înregistrat la lotul C, sporul loturilor E₁ – E₃ fiind aproximativ constant, 23,38 ± 24,48 %, adică 88,6 – 92,7% din sporul relativ al lotului de control. Dacă acest spor se raportează la aportul de proteină din nutrețul combinat, sporul relativ al loturilor E₁ – E₃ este 92,56 – 95,04% din cel înregistrat la lotul de control. Diferența dintre procentajele citate (rând 4 și rând 6) se datorește aportului de proteine adăugate sub forma preparatului obținut din apele uzate.

- Starea de sănătate a găinilor s-a apreciat prin observații zilnice. În întreaga perioadă a testării nu s-a înregistrat nici un caz de îmbolnăvire.

b) Producția de ouă și calitatea acestora

- Producția procentuală de ouă este redată în tab.10.6

Tab.10.7 Producția procentuală de ouă

Nr. crt.	Lotul	Producția de ouă%	Producția ca procent din C	Proteine în N.C. g/zi	Producția de ouă la % proteine în NC (col2/col4)	Producția / % proteină ca procent din C
0	1	2	3	4	5	6
1.	C	81,5	100	21,74	3,75	100
2.	E ₁	80,5	98,77	21,38	3,77	100,5
3.	E ₂	79,95	98,10	20,86	3,82	101,9
4.	E ₃	79,35	97,36	20,33	3,90	104,0

Se constată că deși există o scădere a producției de ouă, dar, în raport cu cantitatea de proteină introdusă cu nutrețul combinat randamentul în ouă crește și această creștere este urmare a aportului extractului de proteină din apele uzate.

Producția de ouă cu coajă fisurată a fost, pe loturi, următoarea:

- lotul C: 6,29%
- lotul E₁: 7,43%
- lotul E₂: 7,96%
- lotul E₃: 7,85%

Masa oului și ale componentelor sale sunt redată în tab.10.6.

Tab.10.8 Producția medie individuală de masă-ou și structura ouălor de la loturile experimentale

Nr.Crt.	Indicatorul	Lotul	Masa medie g	% raportat la C	Proteine în N.C. g/zi	Masa medie/ proteine NC col3/col5	Masa medie/ proteine NC ca % din C
0	1	2	3	4	5	6	7
1.	Masa oului	C	64,65±0,34	100	21,74	2,97	100
		E ₁	64,93±0,45	100,43	21,38	3,04	102,4
		E ₂	63,86±0,19	98,77	20,86	3,06	103,0
		E ₃	64,35±0,26	99,53	20,33	3,16	106,4
2.	Masa Albu- șului	C	39,64±0,32	100	21,74	1,82	100
		E ₁	39,64±0,13	99,24	21,38	1,82	100
		E ₂	38,96±0,19	98,28	20,86	1,86	102,2
		E ₃	39,23±0,21	98,96	20,33	1,93	106,0
3.	Masa Găl- benuș	C	18,49±0,06	100	21,74	0,85	100
		E ₁	17,94±0,17	97,02	21,38	0,84	98,8
		E ₂	17,67±0,09	95,56	20,86	0,85	100
		E ₃	17,67±0,13	95,56	20,33	0,85	100
4.	Masa cojii	C	6,52±0,15	100,00	21,74	0,30	100
		E ₁	7,65±0,09	117,33	21,38	0,36	120
		E ₂	7,23±0,16	110,88	20,86	0,35	116,7
		E ₃	7,45±0,23	114,26	20,33	0,37	123,3

Masa medie a ouălor variază în jurul valorii înregistrate pentru lotul de control. Dacă însă se ia în considerare masa medie raportată la proteinele introduse cu nutrețul combinat, rezultă la loturile E₁ – E₃ o creștere de $2,4 \pm 6,4\%$ care este rezultatul aportului de proteine din extractul preparat din ape uzate.

Urmărind aceiași indicatori (col.6 și col.7 din tab. 10.6) pentru componentele oului rezultă că aportul da masă datorat proteinelor din apele uzate este semnificativ în cazul albușului și al cojii iar masa gălbenușului nu este influențată.

Participarea procentuală la masa totală a celor trei componente ale oului este cuprinsă în tab.10.7.

Tab.10.9 Componența procentuală a oului la cele patru loturi supuse testării

Componenta	Lotul C	Lotul E ₁	Lotul E ₂	Lotul E ₃
Albuș	61,32	60,58	61,00	60,96
Gălbenuș	28,60	27,63	27,67	27,46
Coajă	10,08	11,78	11,33	11,58

Compoziția ouălor redată în tab. 5 și 6 este comparabilă cu datele din literatura de specialitate [128,129,130,131,132].

- Compoziția chimică brută a oului întreg, a albușului și a gălbenușului este redată în tab.10.8.

Tab.10.10 Compoziția chimică brută a ouălor de la loturile experimentale și a componentelor lor

Nr. crt.	Indicatorul	UM	Lotul	Valoarea $x \pm Sx$	% din SU	Proteine în nutreț g/zi	Componen- ta pe conținutul NC de proteină (col.4/col.6)
0	1	2	3	4	5	6	7
1.	A. Oul întreg Substanța uscată (SU)	%	C	34,65±0,10		21,74	1,59
			E ₁	34,98±0,20		21,38	1,64
			E ₂	34,23±0,15		20,86	1,64
			E ₃	33,89±0,06		20,33	1,67
2.	Cenușa brută (CB)	%	C	4,90±0,25	14,14	21,74	0,23
			E ₁	4,60±0,16	13,15	21,38	0,22
			E ₂	3,50±0,13	10,22	20,86	0,17
			E ₃	4,31±0,09	12,71	20,33	0,21
3.	Proteina brută (PB)	%	C	18,15±0,15	52,38	21,74	0,83
			E ₁	17,83±0,12	50,97	21,38	0,83
			E ₂	17,65±0,20	51,56	20,86	0,84
			E ₃	17,15±0,05	50,60	20,33	0,84
4.	Grăsime brută (GB)	%	C	8,95±0,13	25,82	21,74	0,41
			E ₁	9,30±0,16	26,59	21,38	0,43
			E ₂	9,55±0,09	27,90	20,86	0,46
			E ₃	9,45±0,25	27,88	20,33	0,46
5.	Substanțe extractive neazotate (SEN)	%	C	2,65±0,15	7,65	21,74	0,12
			E ₁	3,25±0,20	9,29	21,38	0,15
			E ₂	3,53±0,06	10,31	20,86	0,17
			E ₃	2,98±0,19	8,79	20,33	0,15

6.	B. <u>Albușul</u> Substanță uscată (SU)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	15,75±0,18 14,93±0,13 14,56±0,05 15,05±0,12		21,74 21,38 20,86 20,33	0,72 0,70 0,70 0,74
7.	Cenușa brută(CB)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	0,75±0,13 0,80±0,09 0,83±0,17 0,95±0,05	4,76 5,35 5,70 6,31	21,74 21,38 20,86 20,33	0,03 0,04 0,04 0,05
8.	Proteina brută (PB)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	13,65±0,20 12,53±0,12 12,21±0,07 12,40±0,15	86,48 83,92 83,85 82,39	21,74 21,38 20,86 20,33	0,63 0,59 0,59 0,61
9.	Grăsimi brută (GB)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	0,40±0,13 0,47±0,06 0,37±0,20 0,52±0,15	2,54 3,15 2,54 3,45	21,74 21,38 20,86 20,33	0,02 0,02 0,02 0,03
10.	Substanțe extractive neazotate (SEN)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	0,95±0,11 1,13±0,07 1,15±0,15 1,18±0,20	6,03 7,57 7,90 7,84	21,74 21,38 20,86 20,33	0,04 0,05 0,05 0,06
11.	C. <u>Gălbenușul</u> Substanța uscată (SU)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	56,93±0,35 57,69±0,23 57,93±0,16 57,16±0,08		21,74 21,38 20,86 20,33	2,62 2,70 2,78 2,81
12.	Cenușa brută (C.B.)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	1,63±0,13 1,75±0,07 1,65±0,19 1,70±0,03	2,86 3,03 2,84 2,97	21,74 21,38 20,86 20,33	0,07 0,08 0,08 0,08
13.	Proteină brută (P.B.)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	19,36±0,23 18,56±0,17 19,13±0,09 18,89±0,13	34,00 32,17 33,02 34,04	21,74 21,38 20,86 20,33	0,89 0,87 0,92 0,93
14.	Grăsimi brută (G.B.)	%	C E ₁ E ₂ E ₃	32,56±0,35 34,23±0,11 33,98±0,06 33,65±0,23	57,19 59,33 58,65 58,87	21,74 21,38 20,86 20,33	1,50 1,60 1,63 1,65
15.	Substanțe extractive		C	3,38±0,25	5,93	21,74	0,16

neazotate (SEN)	E ₁	3,15±0,13	5,46	21,38	0,15
	E ₂	3,17±0,07	5,47	20,86	0,15
	E ₃	2,92±0,18	5,11	20,33	0,14

Din analiza datelor cuprinse în tab.10.8 se constată următoarele:

- Rezultatele sunt comparabile cu cele citate în literatură [133, 134, 135, 106]
- Variația indicatorilor de la un lot la altul este în general mică și adesea în limita erorii mijlocii a mediei S_x;
- Conținutul de substanță uscată al oului întreg variază în jurul valorii pentru lotul de control; raportarea valorilor la aportul de proteină al nutrețului combinat duce la creșteri de la lotul C la lotul E₃, ceea ce demonstrează aportul proteinelor din apele uzate, administrate alături de nutrețul combinat. Pentru albuș valorile oscilante sunt mai caracteristice dar pentru gălbenuș este caracteristică creșterea conținutului de substanță uscată (col.4) cât și a aportului proteinelor din apele uzate (col.7);
- Conținutul de cenușă brută al oului întreg este mai mic în loturile E₁, E₂, E₃ decât în lotul de control C, atât ca procent din total, cât și ca procent din substanța uscată și ca efect al proteinelor din apele uzate (col.4, 5 și 7), dar nu există o liniaritate în raport cu loturile E₁, E₂ și E₃. În albuș conținutul de cenușă crește de la lotul C spre lotul E₃ iar în gălbenuș tendința este de oscilare în jurul valorii pentru lotul C;
- Proteina brută conținută în oul întreg se găsește pentru loturile E₁ și E₂ la valori apropiate de lotul de control doar lotul E₃ conține proteine ceva mai puține. Dacă însă parametrul se raportează la total S.U. așa cum se obișnuiește, diferențele sunt mici, iar valorile corelate cu proteinele din nutreț indică o ușoară creștere de la lotul C la E₃, creștere datorită aportului de proteine din apele uzate. Aceleași constatări sunt valabile și pentru conținutul de proteină brută din gălbenuș, iar pentru albuș se constată o scădere de la lotul C la loturile E₁, E₂ și E₃;
- Conținutul de grăsime brută din oul întreg ca și din componentele sale este mai mare în loturile E₁, E₂ și E₃ decât în lotul C;
- Substanțele extractive neazotate apar în proporție mai mare în oul întreg și în albuș și în proporție mai mică în gălbenuș la loturile E₁, E₂ și E₃.

CONCLUZII

Rezultatele testării proteinelor separate din apele uzate de la abatoare permit următoarele concluzii:

- Starea de sănătate a găinilor s-a menținut corespunzătoare ceea ce s-a reflectat în rezultatele observațiilor zilnice și în rezultatele analizei parametrilor hematologici și biochimici sanguini care se încadrează în limitele fiziologice normale;
- Sporul de masă, un indicator mai puțin important la găinile ouătoare, raportat la masa inițială și la aportul de proteină din nutrețul combinat este mai mic cu câteva procente (1,92÷3,02) decât la lotul de control, dar aportul pozitiv al proteinelor din apele uzate este prezent și în acest caz;
- Producția procentuală de ouă este apropiată de valorile lotului de control (97,36÷98,77% din valorile lotului de control)iar raportat la cantitatea de proteină care s-a administrat odată cu furajul rezultă un ușor spor, datorită proteinelor din apele uzate;
- Structura ouălor (albuș, gălbenuș, coaja) și masa acestora a avut valori apropiate pentru loturile experimentale și lotul de control, iar dacă se

corelează cu aportul de proteină din nutreț rezultă o ușoară îmbunătățire a indicatorilor datorită aportului de proteine din apele uzate;

- Compoziția chimică brută a ouălor este apropiată la cele 4 loturi experimentale. La indicatori semnificativi cum sunt conținutul de substanță uscată și conținutul de proteină brută, valorile corelate cu cantitatea de proteină introdusă cu nutrețul, arată influența pozitivă a proteinelor din apele uzate.

11. CONSIDERAȚII PRIVIND INFLUENȚA SEPARĂRII PRIN SALIFERE A PROTEINELOR ASUPRA CALITĂȚII APELOR UZATE EVACUATE.

Apele uzate evacuate de la abatoare sau alte unități de prelucrare a cărnii sunt importante surse de poluare a apelor datorită încărcării lor organice. Eliminarea și valorificarea unei părți din substanțele organice care sunt conținute în apele uzate, chiar înainte de a ajunge în efluentul general, are efect pozitiv asupra calității apelor uzate evacuate.

Pentru a pune în evidență efectul asupra efluentului, ape recoltate în condițiile descrise la cap.7.au fost analizate privind conținutul de proteine, dar și privind indicatorii uzuali folosiți pentru caracterizarea apelor uzate, aceleași analize fiind efectuate și asupra apelor rămase după salifierea la 30% și 60%. Rezultatele acestor analize sunt redată în tab. 11.1.

Tab.11.1. Rezultatele analizelor privind efectul depoluant al salifierii apelor uzate de la abatoare

Indicatorul	U.M.	Apa inițială	Apa după salifiere la 30%	Apa după salifiere la 60%
Proteine	mg/l	997	179	169
CBO ₅	mg/l	4470	461	454
CCO – Mn	mg/l	7176	508	449
NH ₄ ⁺	mg/l	100	29500	74500

Din datele experimentale rezultă că, odată cu eliminarea proteinelor , are loc și o importantă reducere a încărcării organice a apelor uzate. Cei doi indicatori care caracterizează încărcarea organică – consumul biochimic de oxigen, CBO₅, și consumul chimic de oxigen, CCO – Mn, - au scăzut la 10,3% și 10,1% din valoarea inițială în cazul CBO₅ și la 7.1% și 6,2% în cazul CCO – Mn, la cele două trepte de salifiere.

Se remarcă și faptul că, din acest punct de vedere, trecerea de la salifierea la 30% la salifierea la 60% nu a produs o îmbunătățire semnificativă; pentru obținerea unui efect de reducere a poluării nu este necesară atingerea saturației de 60% la salifiere.

Analizele au pus în evidență și o creștere semnificativă a conținutului de săruri anorganice de amoniu în apa uzată care se evacuează. Astfel, are loc, de fapt înlocuirea unui poluant organic labil, susceptibil de a se descompune imediat, cu efecte negative asupra mediului, populației și instalațiilor de canalizare, cu unul mineral, stabil, fără efectele enumerate. Din acest punct de vedere soluția propusă, pe lângă recuperare are și rolul unei stații de epurare clasice deoarece, de fapt, stațiile de epurare mecano - biologice care funcționează conform cu tehnologiile uzuale astăzi, de exemplu epurarea cu nămol activ, nu fac altceva nici ele, decât să transforme compuși organici labili în compuși minerali stabili.

Totuși, un bilanț al azotului pentru salifierea la 30%, efectuat pe baza datelor de mai sus, arată că tratarea unui metru cub de apă uzată înseamnă introducerea în

proces, odată cu apa, a 0,237kg azot, din care 0,159kg azot organic și evacuarea odată cu apa tratată a 22,973kg azot, din care 0.028kg azot organic.

Din această cauză salifierea apelor uzate nu este o metodă care să poată fi recomandată doar ca metodă pentru epurarea apelor uzate, dar, pe lângă și împreună cu avantajele recuperării proteinelor apar și avantaje ale reducerii încărcării organice a apelor uzate evacuate. Din punct de vedere al protecției mediului apare avantajul că apele uzate rezultate în urma salifierii, fără un conținut important de substanțe organice ușor degradabile, nu mai necesită o tratare imediată, într-o stație de preepurare amplasată alături de instalațiile tehnologice, așa cum se impune în prezent, ci apele uzate, fiind stabile, pot fi transportate prin canalizare la stația de epurare a localității, unde epurarea se poate face de către personal de specialitate, în condiții bine controlate și economice.

În stațiile de epurare orășenești mari și moderne, unde se creează prin salifiere posibilitatea să fie transferată sarcina epurării cel puțin a unei părți a apelor uzate de la abatoare, există posibilitatea continuării transformării azotului până la starea finală de oxidare, ca azotați, și a evacuării în emisarii naturali în această stare spre a-și relua circuitul natural, sau chiar de denitrificare și eliminare a azotului sub formă moleculară și evitarea încărcării suplimentare a emisarului.

12. CONCLUZII

1. Datele din practica industrială și cele din literatură au găsit confirmare în cadrul prezentei lucrări care au arătat că apele uzate de la abatoare sunt puternic încărcate cu substanțe organice, chiar dacă sunt preepurate. Indicatorii urmăriți în mod curent, consumul chimic și biochimic de oxigen, CCO-Mn sau CCO-Cr și CBO₅ nu dau indicații cu privire la natura poluanților organici. Fără însă a cunoaște natura poluanților, recuperarea lor eficientă este imposibilă. Faptul că materia primă prelucrată – carnea – este în principal de natură proteică, sugerează că poluanții organici din apele uzate sunt de natură proteică, de aceea, în cadrul lucrării de față s-a urmărit și s-a realizat punerea în evidență și dozarea cantitativă a proteinelor din apele uzate de la abatoare, apoi separarea și caracterizarea lor și final testarea proteinelor separate pentru utilizarea ca adaos la furajarea animalelor.
2. Metodele analitice pentru dozarea proteinelor, încercate în condițiile în care s-au desfășurat ulterior experimentele, atât pe extracte de carne preparate în laborator cât și pe ape uzate reale au fost metoda Gornall, metoda Lowry, metoda prin absorbție cantitativă în ultraviolet și electroforeza. Metodele Gornall și Lowry s-au dovedit a fi potrivite pentru dozarea proteinelor în condițiile în care au fost tratate apele uzate. Metoda Gornall a fost utilizată cu precădere pentru soluțiile mai concentrate în proteine, iar metoda Lowry în cazul soluțiilor diluate care rezultă la eluarea coloanelor cromatografice de gel permeabil. Electroforeza și metoda prin absorbție cantitativă în ultraviolet au servit pentru verificarea rezultatelor cromatografiei pe gel permeabil și respectiv pentru a verifica lipsa interferenței ionilor amoniu la dozarea proteinelor. Rezultatele acestor metode de analiză au fost concordante între ele și cu datele din literatură.
3. Determinările de conținut de proteine au fost și ele efectuate atât pe extracte de carne preparate în laborator cât și pe eșantioane de ape uzate reale. A existat o concordanță între ordinul de mărime al conținutului de proteine din extractele de carne și cel din apele uzate reale. Extractele de carne obținute cu soluții cu tărie ionică mică și cele cu tărie ionică mare au conținut cantități asemănătoare de proteine ceea ce permite presupunerea că extractele preparate în laborator conțin ambele categorii de proteine: albumine și globuline. În toate apele uzate reale, atât în cele colectate de la diferite faze tehnologice ale producerii și prelucrării cărnii cât și în efluentul general s-au găsit cantități însemnate de proteine și s-a constatat că unele faze, cum este fierberea, produc concentrații deosebit de mari de proteine, motiv pentru care atenția a fost concentrată în continuare asupra acestor faze. Recoltarea apei uzate din faza de fierbere a prezentat și avantajul că oferă garanția unei ape proaspete și lipsite de infestare microbiologică. Analize privind indicatorii de poluare urmăriți curent la apele uzate (CBO₅, CCO-Cr, CCO-Mn), efectuate cu metodele standardizate și folosite în mod obișnuit, în paralel cu analize ale conținutului de proteină au demonstrat că efluenții de la abatoare bogăți în substanțe organice, sunt bogăți de fapt în proteine.

În paralel cu determinările de proteine, au fost urmăriți și alți indicatori importanți din punctul de vedere al prelucrării și utilizării viitoare a apelor uzate, cum sunt pH-ul, conținutul de ioni amoniu și conținutul de cloruri. Analizele efectuate cu metodele standardizate cunoscute, au arătat că pH-ul, indicator care influențează extractibilitatea proteinelor, este mai mare la apele uzate reale decât la extractele de carne preparate în laborator. Diferența se poate explica prin procesele postsacrificare suferite integral de carnea supusă extracției și mai puțin de carnea prelucrată direct în procesul tehnologic. Diferențele de pH pot produce diferențe în procesul de recuperare a proteinelor.

În apele uzate reale, concentrația ionilor amoniu a fost în general mai mare decât în extractele preparate, ajungând în apele puternic încărcate de la fierbere la peste 150-200mg/l, ceea ce înseamnă că are loc hidroliza proteinelor, dar concentrațiile NH_4^+ se găsesc sub limita pentru care s-a făcut verificarea lipsei unei influențe asupra determinărilor de proteine prin metoda Gornall.

În apele uzate reale provenite de la fierbere, clorurile au avut concentrații cuprinse între 312-7000 mg/dm³, corespunzător unor tării ionice cuprinse între 0,005 și 0,12, dar tăria ionică reală a apelor respective ar fi putut fi crescută de prezența și a altor electroliți proveniți din carne și din alte materiale folosite în tehnologie.

4. Pentru separarea proteinelor din apele uzate de la abatoare au fost aplicate precipitarea la punctul izoelectric, separarea și fracționarea prin salifiere și precipitarea cu ajutorul solvenților organici.

Precipitarea la punctul izoelectric s-a dovedit a fi o metodă aplicabilă pentru separarea proteinelor din apele uzate. Precipitarea s-a produs cu cele mai bune randamente în domeniul de pH cuprins între 3,2 și 3,6 care corespunde aproximativ punctului izoelectric al mioalbuminelor, dar precipitarea de proteine s-a produs și în domeniul 4,3-4,6 .

Randamentele de separare a proteinelor, înregistrate experimental, au fost de până la 92% în cazul extractelor de carne și de 56-70% la apele reale.

Dezavantajele precipitării la punctul izoelectric constau în formarea, în cazul unora din apele uzate, a unor precipitate greu separabile și în precipitarea uneori ireversibilă, cu formarea de proteine denaturate insolubile în apă.

Precipitarea cu solvenți organici a dus la randamente uneori mai scăzute decât salifierea, dar într-un domeniu încă acceptabil, 62-74%, uneori și 90%, iar precipitatele sunt mai ușor separabile prin filtrare decât la salifiere.

Denaturarea proteinelor sub influența alcoolului a fost ireversibilă. Pentru a evita sau a micșora denaturarea ar trebui lucrat la temperaturi scăzute, ceea ce complică tehnica și economia procesului. Un dezavantaj major al procedurii este că trebuie să se folosească alcool în raport de cel puțin 1:1 față de apa uzată, motiv pentru care procedeul se consideră recomandabil numai dacă utilizarea ulterioară a proteinelor recuperate este foarte pretențioasă.

5. Metoda precipitării prin salifiere a dat randamente maxime de separare de 70,7 ÷ 77,6 % pentru extractele de carne și de 67,5 ÷ 75,7% pentru apele uzate reale, randamente obținute în domeniul de pH=3,6 ÷ 5,5. Domeniul optim de pH pentru salifiere se suprapune cu bună aproximație peste domeniul optim găsit în cazul precipitării la punctul izoelectric.

Deși rezultatele reflectă o diversitate corespunzătoare diversității inerente a materiilor prime prelucrate, se poate constata că în cazul extractelor de carne randamentul maxim de separare apare în majoritatea cazurilor la 30% saturație ceea ce denotă ponderea mai mare a globulinelor iar în cazul majorității probelor din ape uzate reale randamentul maxim este înregistrat la saturația de 60% ceea ce denotă preponderența moleculelor mai mici, cum sunt albuminele.

Creșterea gradului de saturație la 90% nu aduce în majoritatea cazurilor o creștere substanțială a randamentului de separare, de aceea este recomandabilă numai în cazul că recuperarea maximă a proteinelor este importantă sau epurarea avansată a apelor uzate o impune.

Produsul obținut prin salifiere este puternic impurificat cu agentul de salifiere ceea ce impune operații de purificare în vederea utilizărilor ulterioare.

Modul în care decurge salifierea depinde în mare măsură de compoziția apei supuse tratamentului care la rândul ei depinde de compoziția și calitatea cărnii prelucrate și de tehnologia aplicată. Astfel, apele uzate provenite de la o șarjă de fierbere foarte bogată în părți anatomice cu conținut de colagen, la prima treaptă de salifiere (30% saturație), au depus o masă gelatinoasă care s-a putut separa prin decantare și care s-a redizolvat numai parțial în apă. Este probabil că în acest caz a avut loc separarea unor scleroproteine din apă. La analiza comportamentului deosebit al acestora trebuie luată în considerație și contribuția miozinei, proteina cu cea mai mare pondere procentuală în țesutul muscular.

Influența naturii apei uzate este ilustrată și de probe în care s-a încercat precipitarea și fracționarea proteinelor din apele de la fierberea salamurilor, o fază considerată înainte de începerea lucrărilor ca fiind poluantă și sursă de proteine. În realitate proteinele au fost prezente în aceste ape doar în concentrații mici, iar sulfatul de amoniu nu a produs precipitarea la nici una din concentrațiile și pH-urile testate. Explicația poate fi aceea că la fierberea salamului trecerea compusului organic în apă are loc printr-o membrană semipermeabilă prin care pot trece doar moleculele mai mici, rezultate prin scindarea moleculelor de proteine. Aceste molecule conțin legături peptidice care se pun în evidență cu reactivul Gornall dar sunt prea mici pentru a fi precipitate prin salifiere.

O influență importantă asupra comportării la salifiere are și vechimea apei. De obicei extractele preparate în laborator și apele recoltate din abatoare au fost prelucrate în stare proaspătă. Dacă totuși, proba de apă brută a fost prelucrată după două zile, ea a avut un conținut mai ridicat de ioni amoniu, un pH mai ridicat și salifierea a lăsat în soluție o cantitate mai mare de proteine, ceea ce se poate pune pe seama procesului de degradare, moleculele proteice suferind degradări la fragmente mici și mai greu precipitabile.

Rezultatele salifierii au fost verificate și prin electroforeză. S-a constatat un conținut ridicat de albumină, în special la saturația de 30%, iar între globuline un procent mai mare al fracțiunii β care conține și lipoproteinele.

6. Produsul salifierii este impurificat cu agentul de salifiere, astfel că este necesar, în funcție de utilizarea care i se va da, un proces de purificare.

Dializa, deși s-a găsit că este o metodă viabilă de purificare a proteinelor separate prin salifiere, aplicabilă eventual împreună cu separarea pe coloană cromatografică cu gel permeabil, are dezavantajul că este lentă și că duce la diluarea produsului

Purificarea, însă, pe coloană cromatografică cu gel permeabil a dus la eliminarea avansată a ionului amoniu, făcând produsul apt pentru utilizări mai sensibile. Gelul SEPHADEX G50 a dat rezultate bune din acest punct de vedere.

7. Fraționarea și determinarea masei moleculare a produsului separat prin salifiere realizată prin cromatografie pe gel permeabil au arătat că din extractele de carne s-au separat la saturație 30% cel mai pregnant proteine cu masa moleculară în jur de 160.000 daltoni, care corespunde domeniului albuminelor. Frațiunile cu mase moleculare mari (380.000 – 1.250.000) au fost mai mici. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele electroforezei care indică un conținut ridicat de albumine și unul mai mic de diferite globuline.

Fraționarea și determinarea maselor moleculare ale proteinelor separate la saturație 60% din extractele de carne au arătat o varietate mai mare de mase moleculare, practic fiecare fracțiune conținând proteine. Față de un câmp de valori relativ uniform, există câteva vârfuri pregnante de concentrație și anume corespunzător maselor moleculare 199.000-263.000, 66.100 și 45.800-43.700 daltoni. Primele corespund probabil unor proteine globulare, a căror prezență a fost semnalată și prin electroforeză, iar ultimele se găsesc în domeniul albuminelor.

Determinările similare efectuate pe proteinele separate la 30% saturație din apele uzate reale au dus la rezultate concordante cu cele înregistrate în cazul extractelor de carne, în sensul că, pe lângă molecule mici de albumine s-au găsit și molecule cu mase moleculare mari. Moleculele mici au mase moleculare mai mici decât la extracte, probabil din cauza hidrolizei în timpul fierberii în procesul tehnologic.

La determinarea maselor moleculare ale proteinelor separate din ape uzate de la abatoare salifiate la 60% saturație, cel mai pregnant maxim s-a înregistrat în domeniului albuminelor (65.000÷130.000 daltoni). Au mai apărut maxime care corespund unor mase moleculare mai mari ($M \sim 500.000$ daltoni, globuline). Din literatură rezultă că această masă moleculară este egală cu aceea a miozinei. Un domeniu bine reprezentat a fost acela al unor mase moleculare foarte mari, de ordinul de mărime 10^6 daltoni. Deși s-au înregistrat diferențe față de masele moleculare înregistrate în cazul extractelor de carne, există și o caracteristică comună, constând în faptul că și în acest caz se confirmă prezența albuminelor precum și a unor molecule cu masă moleculară mare.

8. Amestecul de proteinele recuperate din apele uzate de la abatoare, care conține, așa cum au arătat determinările de masă moleculară, o mare varietate de globuline și în special de albumine, a sugerat posibilitatea utilizării ca adaos la furajarea animalelor. Testele au fost efectuate cu găini ouătoare, folosindu-se proteinele separate prin salifiere la saturație 60%.

Proteinele obținute prin salifiere au fost purificate înainte de testare în vederea eliminării ionilor anorganici, în special a ionilor amoniu și clor care sunt contraindicați în furajele găinilor. Separarea s-a făcut prin cromatografie pe gel permeabil, folosind FILTRADEX R50 produs de Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași.

În urma testelor s-a constatat că starea de sănătate a găinilor s-a menținut corespunzătoare ceea ce s-a reflectat în rezultatele observațiilor zilnice și în rezultatele analizei parametrilor hematologici și biochimici sanguini care se încadrează în limitele fiziologice normale.

Deși este un indicator mai puțin important la găinile ouătoare, s-a urmărit, pentru eventualitatea folosirii și la alte categorii de păsări sau, în general, la alte animale, și sporul de masă; raportat la masa inițială și la aportul de proteină din nutrețul combinat acesta a fost mai mic cu câteva procente ($1,92 \div 3,02$) decât la lotul de control, dar aportul pozitiv al proteinelor din apele uzate este prezent și în acest caz.

Producția procentuală de ouă a fost apropiată de valorile lotului de control ($97,36 \div 98,77\%$ din valorile lotului de control) iar raportat la cantitatea de proteină care s-a administrat odată cu furajul rezultă un ușor spor, datorită proteinelor din apele uzate;

Structura ouălor (albuș, gălbenuș, coaja) și masa acestora a avut valori apropiate pentru loturile experimentale și lotul de control, iar dacă se corelează cu aportul de proteină din nutreț rezultă o ușoară îmbunătățire a indicatorilor datorită aportului de proteine din apele uzate.

Compoziția chimică brută a ouălor a fost apropiată la cele 3 loturi experimentale și la lotul de referință. La indicatori semnificativi cum sunt conținutul de substanță uscată și conținutul de proteină brută, valorile corelate cu cantitatea de proteină introdusă cu nutrețul, au demonstrat influența pozitivă a proteinelor din apele uzate.

9. Alături de avantajele recuperării proteinelor, tratarea prin salifiere a apelor uzate puternic încărcate prezintă și avantajele reducerii încărcării organice a apelor uzate evacuate. Din punct de vedere al protecției mediului apare avantajul că apele uzate rezultate în urma salifierii, nu mai necesită o tratare imediată, într-o stație de preepurare amplasată alături de instalațiile tehnologice, așa cum se impune în prezent, apele uzate fiind stabile. Ele pot fi transportate prin canalizare la stația de epurare a localității, unde epurarea se poate face de către personal de specialitate, în condiții bine controlate și economice.

În concluzie, separarea proteinelor din apele uzate de la abatoare s-a dovedit a fi posibilă în condiții bune prin aplicarea procedurii salifierii cu sulfat de amoniu. Fraționarea și determinările de masă moleculară, dublate de determinări prin electroforeză au arătat că precipitatul obținut este echilibrat, albuminele fiind prezente în toate fracțiunile, iar globulinele mai ales în fracțiunea precipitată la 30% saturație a agentului de salifiere. Această compoziție echilibrată face posibilă utilizarea precipitatului de proteine recuperate ca adaos la furajarea animalelor ceea ce deschide perspectiva utilizării pe scară largă a rezultatelor cercetării. Rezultatele lucrărilor permit re folosirea unei părți din proteinele care în prezent constituie poluanți ai apelor, cu efect direct de reducere a poluării. Cercetările și rezultatele experimentale obținute în cadrul lucrării ar putea contribui la scurtarea procesului de reintegrare a componentelor organice a apelor uzate într-un circuit util, la reducerea presiunilor asupra factorilor de mediu și la protejarea resurselor.

BIBLIOGRAFIE

1. Beaton R., Maser Chr., "Reuniting Economy and Ecology in Sustainable Development", Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London, Washinton D.C., 1999.
2. Pumnea C. și colab., "Tehnologie industrială", Vol.I, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1992.
3. * * "Anuarul statistic al României 1998", Comisia Națională pentru statistică.
4. Bezdadea M., Grigoriu R., Rev. Chimie, 41 (10), 809-812, 1990.
5. Banu C., Oprea Al, Dănicel Gh., "Îndrumător în tehnologia produselor din carne", Ed. Tehnică, București, 1995.
6. Dinu V., Truția E., Popa-Cristea E., Popescu A., "Biochimie medicală, mic tratat", Ed. medicală, 1966.
7. Belitz H.D., Grosch W., "Lehrbuch der Lebensmittelchemie", Ed. 4, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
8. Zubay G., "Biochemistry", Mc.Graw Hill, Boston, 1998
9. Banu C., Alexa P., Vizireanu C., "Procesarea industrială a cărnii", Ed. Tehnică, București, 1997.
10. Andersen E., Industry and Environment (USA), 18 (1), 19-22, 1995.
11. Negulescu M. și colab., "Epurarea apelor uzate industriale", Vol. I, Ed. Tehnică, București, 1987.
12. * * "Environmental Handbook II. Trade and Industry: Slaughterhonses and Meat Processing", Vol. II, 1995.
13. Allard P.Y., UNEP Industry and Environment, Vol. XVIII/1, p. 32-46, ianuarie-martie 1995.
14. Walsh I.L., Water Environment Research (USA), 65(4), 402-407, 1993.
15. Chiriac V., Gherim V., Ionescu-Sisești V.L., Negulescu C.A.L., "Epurarea apelor uzate și valorificarea reziduurilor din industria alimentară și zootehnice", Ed. Ceres, București, 1977.
16. Teodorescu I., Antoniu R., "Evacuarea și epurarea apelor uzate din industria alimentară", Ed. Tehnică, București, 1979.
17. Alfons H., Wasser, Luft und Boden, 20(5), 18-20, 1990.
18. Constantinescu Gh., Hidrotehnica, 30(2), 65-68, 1985.
19. Ilișescu A., Eminovici A., Ognean T., Mediul Înconjurător 3(3), 17-25, 1992.
20. Sievers I., Korrespondenz Abwasser, 42(8), 1315-23, 1995.
21. Șoldea V., Hidrotehnica, 35(8), 341-344, 1990.

22. Jacangelo I.G., I.A.W.W.A. (USA) LXXX III/9, 97-107, 1991.
23. Knoblock M.D., Sutton P.M., Mishra P.N., Gupta K., Janson A., Water Environ. Res., 66(133), 133-138, 1994.
24. Braun R., Wenger-Oehn H., Fuchs W., Danner H., Industrial Waste Management Austria, 8, 735-744, 1992.
25. Henck M., Industrial Waste Management Austria, 8, 327-334, 1992.
26. Dumitru I.F., Iordăchescu D., "Introducere în enzimologie", Ed. Medicală, București, 1981.
27. Iordăchescu D., Dumitru I.F., "Biochimie practică", Partea I, Universitatea București, Facultatea de biologie, 1980.
28. Lehninger A., Nelson D., Cox M., "Prinzipien der Biochemie", 2. Auflage, Herausgegeben von H. Tschesche, Spektrum Akademischer Verlag 1998
29. Streyer L., "Biochemie", 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
30. Methews C.K., von Holde K.E., "Biochemistry" 2nd ed., Benjamin Cummings Publishing Co Ltd, California, 1996.
31. Garrett R.H., Grisham C.M., "Biochemistry" Saunders College Publishing, USA, 1995.
32. Robyt J.F., White B.J., "Biochemical Tehniques. Theory and Practice", Waveland Press Inc., Prospect Hights, Illinois, 1990.
33. Liteanu C., Gocan S., Bold A., "Separatologie analitică", Ed. Dacia Cluj-Napoca, 1981.
34. * * "Affinity Chromatography Principles and Methods", Pharmacia Uppsala, Suedia.
35. * * "Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods", Pharmacia Uppsala Suedia.
36. Atkins P.W., "Tratat de chimie fizică", ed.5, Ed. Tehnică, București, 1994.
37. Bryjak M., Trochimczuk A., Environmental Protection Engineering, 20, 43-51, 1994.
38. Uglea C., "Cromatografie pe gel permeabil", Ed. Academiei, București, 1976.
39. Flodin P., J. Chromatogr., 5, 103, 1961.
40. Flodin P., "Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration", Pharmacia Uppsala-Suedia.
41. * * "Sephadex Gel Filtration in Theory and Practice", Pharmacia Uppsala-Suedia.
42. Schöneich Chr., Hühmer A.Fr., Rabel Sh.R., Stobaugh J.F., Jois S.D.S., Larive C.K., Siahaan T.J., Squier T.C., Bigelow D.J., Williams T.D., Anal. Chem. 67, 155 R-175R, 1995.

43. Chang S.K.C., Holm E., Schwarz J., Rayas-Duarte P., *Anal. Chem.*, 67, 127R-153R, 1995.
44. Nubbe M.E., *Research Journal of the Water Pollution Control Federation (USA)*, Alexandria, 62(4), 359-383, 1995.
45. Nubbe M.E., *Research Journal of the Water Pollution Control Federation (USA)*, Alexandria, 63(4), 338-361, 1996.
46. Blanton C.T., *Waterworld News (USA)*, 7(1), 10-13, 1991.
47. Müller G., *Korrespondenz Abwasser*, 43(5), 785-795, 1996.
48. Mihele D., Pavlovici M., "Biochimie clinică. Metode de laborator", Ed. Medicală, București, 1996.
49. Mănescu S., Dumitrescu H., Bărduța Z., Diaconescu M.L., "Chimia sanitară a mediului", Ed. Medicală, București, 1982
50. Dumitrescu H., Dumitrescu C.R., Ciubotaru-Bordeianu A., Albulescu V.L., "Controlul fizico-chimic al alimentelor", Ed. Medicală, 1997.
51. Ho C.L., *J. Test Eral*, 12(2), 100-106, 1984, *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
52. Reichardt W., *Nahrung* 37(5), 484-493, 1993, *C.A.* 120(19), 242724c, 1994.
53. Manta I., Cucuieru M., Benga G., Hodărnău A., "Metode biochimice în laboratorul clinic", Ed. Dacia Cluj-Napoca, 1976.
54. * * "The SAN Plus Segmented Flow Analyzer and Its Applications", *Scalar Anal.* S.V. Breda, the Netherlands, 1993.
55. Ramachadran M., Grover A., Banerjee B.D., Hussain O.Z., *J. Food Sci. Technol*, 22(2), 99-100, 1984, *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
56. Jenzano J.W., Hogan S.L., Noyes C.M., Featherstone G.L., Lundlad R.L., *Anal. Biochem.*, 159(2), 370-376, 1986; *Anal. Abstr.*, 1/80-12/95.
57. Matsui H., Kurosaki T., Tokuda M., Hatase O., *Acta Med. Okayama*, 37(2), 125-129, 1983; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
58. Matsui T., Kitagawa H., *Kagawa-Daigaku-Nagakubu-Gakuatsu-Hokoku*, 43(1), 51-56, 1991; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
59. Sargent M.G., *Anal Biochem.*, 163(2), 476-481, 1987; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
60. Makar H.P.S., Sharma O.P., Dawra R.K., Nagi S.S, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 20(5), 306-308, 1983; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
61. Jacangelo J.G., Olivieri V.P., Kawata K., *Water Res.*, 21(9), 1143-1144, 1987; *Anal. Abstr.* 1/80-12/85.
62. Shakir F.K., Andilet D., Drake A.J., Shakir K.M.M., *Anal. Biochem. Biophys.*, 20(5), 306-308, 1985; *Anal. Abstr.* 1/80-12/9
63. Larsson E., Howlett B., Jagendorf A., *Anal. Biochem.*, 155(2), 243-248, 1986; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.

64. Sebercic B., *Nahrung*, 31(8), 817-823, 1987; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
65. Nishi H.H., Kestner J., Elin R.J., *Clin. Chem. (Winston-Salem N.C.)* 31(1), 95-98, 1985; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
66. Zaia D.A.M., Rockenbach S.R., Obara M.M., Barreto W.J., Arizawa S., Curi R., Lichtig J., *Anal. Lett.* 25(7), 1225-1234, 1992; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
67. Meyer F., Van Haeringen N.J., *Clin Chim. Acta*, 209(3), 204-214; 1992; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
68. Barreto W.J., De Aquino M., Zaia D.A.M., *Anal. Lett.*, 23(7), 1279-1290, 1990; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
69. Iskander M.L., Medien H.A.A., *Microchem J.*, 41(2), 172-182, 1990; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
70. Mohamed H.Z., El-Sayed L., El-Khateeb S.Z., Wahbi A.A.M., *Egypt. J. Pharm. Sci.*, 30(1-4), 51-60, 1989; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
71. Zaia D.A.M., Barreto W.J., Santos N.J., Endo A.S., *Anal Chim. Acta*, 277(1), 89-95, 1993; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
72. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., *Anal. Biochem.*, 150(1), 76-85, 1985, *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
73. Davis L.C., Radke G.A., *Anal. Biochem.*, 161(1), 152-156, 1987; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
74. Fountoulakis M., Juranville J.F., Mauneberg M., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 24 (3-4), 265-274, 1992; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
75. Serra S., Morgante L., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 56(2), 160-165, 1980; *Anal. Abstr.* 1/80-12/95.
76. Schöneich Ch., Kwok S.K., Wilson G.S., Rabel S.R., Stobaugh J.F., Williams T.D., VanderVelde D.G., *Anal. Chem.* 65, 67R-84R, 1993.
77. Adrews A.T. "Electroforeza. Teorie, tehnici și aplicații biochimice și clinice", Ed. Tehnică, București, 1996.
78. Hajos G., *Élelmiszervizsgálati Közl.* 39(1), 6-25, 1993; *C.A.* 119(7), 70633 h, 1993.
79. Kaszuta I., *Seibutru Butsuri Kagaku*, 37(5), 319-323, 1993; *C.A.* 120(3), 26829 y, 1994.
80. Jemmi T., Schlosser H., *Fleischwirtschaft*, 73(5), 600-602, 1993; *C.A.* 120(5), 52944 b, 1994.
81. Mercante E., Ortin F.J., *Alimentaria (Madrid)*, 244, 65-67, 1993; *C.A.* 120(1), 6993 u, 1994.
82. Ortin F.J., Merchante E., Ortin I., *Alimentaria (Madrid)*, 233, 33-38, 1998; *C.A.* 118(11), 100584 s, 1993.
83. Al. de Lamos S.C., Morales M.A.C., *Aliment. Nutr.*, 4, 57-63, 1992; *C.A.* 119(3), 137722 u, 1993.

84. Confer D., Logan B.E., Aiken B.S., Kirchman D.L., *Water Environment Research* 67(1), 118-125, 1995.
85. Kirchbaum J., Luckas B., Beinert W., *J. Chromatogr.*, 661(1-2), 193-199, 1994.
86. Turula V.E., de Haseth J.A., *Anal. Chem.*, 68, 629-638, 1996.
87. Jonscher K.R., Yates J.R., *Anal. Chem.*, 68, 659-667, 1996.
88. Kinter M., *Anal. Chem.*, 67, 493R-508R, 1995.
89. Doroshenko V.M., Cotter J.R., *Anal. Chem.*, 67, 2180-2187, 1995.
90. Smith I.C.P., Blandford D.E., *Anal. Chem.*, 67, 509R-511R, 1995.
91. Montanda G., *Anal. Chem.*, 67, 412A, 1995.
92. Biemann K., Zaia J., *Am. Soc. Mass Spectrum*, 6, 428-436, 1995; *Anal. Chem.*, 68, 412A, 1996.
93. Orlando R., Kumer Kolli V.S., *J. Am. Soc. Mass Spectrum*, 6, 234-241, 1995; *Anal. Chem.*, 68, 411A, 1996.
94. Moore S., Spackman D.H., Stein W.H., *Anal. Chem.*, 30, 1185, 1958.
95. Woodward C., Gilman L.B., Engelhart W.G., *Int. Laborat.* 20(7), 40-46, 1990.
96. Carr P.W., Mc Neff C., *Anal. Chem.*, 68, 404A, 1996.
97. Martin S.A., *Anal. Chem.*, 68, 629-638, 1996.
98. Rodgers A.H., Khaledi M.G., *Anal. Chem.*, 66, 327-334, 1994.
99. Purcell A.W., Aquilar M.I., Hearn M.T.W., *Anal. Chem.*, 65, 3038-3047, 1993.
100. Andrews P., *Biochem J.*, 91, 222-233, 1964.
101. Andrews P., *Biochem J.*, 96, 595-605, 1965.
102. Fischer L., "An Introduction to Gel Chromatography", North Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1971.
103. Popa O., Miloş M., Halga P., Bunicelu El., "Alimentația animalelor domestice", Ed. Didactică și Pedagogică 1980.
104. Nichita G., "Cantitate și calitate în nutriția animalelor", Ed. Ceres, București, 1984.
105. Nichita G., "Nutriția, factor fundamental în rentabilizarea producției animalelor", Ed. Facla, Timișoara, 1984.
106. Whitehead C., Nutritional factors and Bone Structure in Laying Hens, Proc. 9th European Poultry Conf. Glasgow, vol. II, 129-131, 1994.
107. Barton N.E., Breeding Meat Type Poultry for the Future Targets for Selection. Limits to Performance and Market Requirement for Chicken. Proc. 9th European Poultry Conf. Glasgow, vol. I, 33-36, 1994.
108. Bar A., Striens S., Rosenberg J., Aunwitz S., *J. Nutr.* 118(8), 1018-1023, 1988.

109. Jensen F., Choise Feeding in Practice, Proc. 9th European Poultry Conf. Glasgow, vol. II, 223-226, 1994.
110. Mateuți M., Petrescu C., Ivașcu A., “Producerea și abatorizarea cărnii de pasăre”, Ed. Eurobit, Timișoara, 1996.
111. Bălășescu M., Băltan Gh., Dascălu Al., Vancea I., “Avicultura”, Ed. Didactică și Pedagogică 1980.
112. Dumescu F., Klein L., Ban. A., Consfătuirea de ecologie, Herculane, 1988.
113. Felföldy L., “Determinarea biologică a calității apei”, Inst. pentru Gospodărirea Apelor, Budapesta, 1992.
114. Klein L., Ilisie M., Simpozion “Economia. Prezent și viitor”, Univ. A. Vlaicu Arad, Univ. de Vest Timișoara, Univ. E. Murgu Reșița, Arad, 214-218, 1998.
115. Klein L., Ilisie M., Studia Universitas V. Goldiș Arad, 8, 56-60, 1998.
116. Klein L., Ilisie M., Studia Universitas V. Goldiș Arad, 9, Seria A, 470-476, 1999.
117. Klein L., Lupea A. X., Ilisie M., Matiuți M., Analele Universității “Aurel Vlaicu” din Arad, Seria Chimie, 113-116, 2000
118. Klein L., Lupea A.X., Ardelean D, Ilisie M., EURECO 99, VIII European Ecological Congress, Halkidiki, Greece, Sept. 18-23, 1999, pag. 446.
119. Klein L., Lupea A.X., Ilisie M., Popescu D., Lucrările Simpozionului “Mediul și Industria”, Inst. Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Ecologie Industrială, București, 1999, p.214-223.
- 120 Burlacu G. “Metode și tehnici pentru măsurarea valorii nutritive a nutrețurilor”, Ed. Ceres București 1991
- 121 Ruschkowski S.R., Robinson F.E., Cheng K.M., Hart L.E., Poult. Sci., 72(1), 172-184, 1993.
- 122 Sandu Gh., “Modele experimentale în zootehnie”, Ed. Coral Sanvet, București, 1995.
- 123 * * NOBIS- Manual Procedures 1999
- 124 Dumitrescu H., Milu C., “ Controlul fizico-chimic al alimentelor”, Ed. Medicală București, 1997.
- 125 Dimitriu C., “Metode și tehnici de control al produselor alimentare și de alimentație publică”, Ed. Ceres București 1980.
- 126 Bârza H., May J., Ghergariu S., Hagi V., “Patologie și clinică medicală veterinară”, Ed. Știința Chișinău, 1992.
- 127 Matiuți M., Moț M., Lucr. Șt. TPA, USAMVB Timișoara, 57-60, 1996.
- 128 Bar A., Strien S., Rosenberg J., Auwitz S., J. Nutr, 118(8), 1018-1023, 1988
- 129 Cuca G.M., Avik E.G., “Alimentacion de las aves Champingo”, Ed. de Mexico, Mexico City, 1990

- 130 Ensminger M.E., "Feed and nutrition", Ed. Ensminger Publ. Comp., New York 1999
- 131 Hunton P., Poultry International, 35(5), 72-76, 1996.
- 132 Houssein S.M., Harms R.H., Ianky D.M., Poult. Sci., 72(1), 168-172, 1993.
- 133 Jaffe M., Schutz H.S., Stone J., Zeichlerg S, Poult. Sci., 70(1), 88-190, 1991.
- 134 Larbier M., Leclercq B., "Nutriția și alimentația păsărilor", Ed. Alutus, București, 1994
- 135 Matiuți M., Radbea L., Lucr. șt. TPA, USAMVB Timișoara, 55-57, 1996.
- 136 Matiuți M., Crăiniceanu E., Klein L., Petroman C., Petroman I., Matiuți C., Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, Cercetări Științifice, Procese și Tehnologii Agroalimentare, 295-300, Ed. EUROSTAMPA Timișoara, 2000
- 137 Klein L., Lupea A.X., Matiuți M., Ilisie M., Popescu D., Buletinul Științific al Universității "POLITEHNICA" Timișoara, Seria Hidrotehnica, 191-196, 2000
- 138 Crăiniceanu E., Mațiuți M., Klein L., Petroman C., Mațiuți C., Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, Lucrări Științifice Medicină Veterinară, vol. XXXIII, 429-432, 2000
- 139 Crăiniceanu E., Mațiuți M., Klein L., Petroman C., Mațiuți C., Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, Lucrări Științifice Medicină Veterinară, vol. XXXIII, 432-437, 2000
- 140 Klein L., Lupea A.X., Ilisie M., Revue Roumain de Chimie, acceptat pentru publicare, 2001
- 141 Klein L., Lupea A.X., Studia Universitatis , V.Goldiș Arad, 11, 2001 (în curs de publicare)