

¹ DŽULIJANA TOMOVSKA² BOGDAN BOGDANOV¹ Univerzitet „Sv. Kliment Ohridski“, Fakultet biotehničkih nauka, Bitola² Univerzitet „Sv. Ćiril i Metodij“, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Skopje

UDK 543.645:[637.12+637.146.3]:577.152.3

Enzimskom hidrolizom proteina u mleku nastaju peptidi. Količina oslobođenih α -amino grupa može se odrediti primenom reagenasa koji reaguju specifično sa amino grupom dajući derivat koji se može odrediti spektrofotometrijski. Pri ovome smo upotrebili OPA metodu: o-ftaldialdehid sa merkaptoetanolom i modifikovanu OPA metodu sa N,N-Dimetilmerkaptotel amonijum hloridom. Separacija proteina u niskomolekularne proteine i peptide izvršena je centrifugiranjem, RCF 20.000 g. Određivani su peptidi u supernatantu mleka, jogurta laboratorijski proizvedenog, i u fermentisanim mlečnim proizvodima uzetih slučajnim izborom sa makedonskog tržišta. Najveću količinu ukupnih peptida prema vrsti mleka imamo kod kravljeg mleka, a prema vrsti proizvoda kod jogurta. Prema upotrebljenim sistemima kultura imamo kod jogurta dobijenih od mikrobioloških kultura *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*.

Ključne reči: Mleko • peptidi • hidrolizati • surutka • fermentisani mlečni proizvodi

UVOD

Enzimska hidroliza proteina predstavlja degradaciju proteina dejstvom proteolitičkih enzima do peptida i/ili aminokiselina. U toku hidrolize peptidne veze se prekidaju i adicijom jednog

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE PEPTIDA MLEKA I FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA PRIMENOM (OPA) I MODIFIKOVANE OPA METODE

molekula vode oslobađaju se peptidi i/ili aminokiseline. Novoformirani peptid može da bude nov supstrat za enzime.

Ove molekulske proteolitičke promene mogu se detektovati pomoću različitih analitičkih metoda koji se reflektuju na jednoj ili više osobina molekula. U toku hidrolize sa svakom raskinutom peptidnom vezom oslobađa se nova karboksilna i nova amino grupa. Prema tome, broj hidrolizovanih peptidnih veza može se izvesti određivanjem broja novoformiranih C- i/ili N-terminalnih grupa u hidrolizatu. U zavisnosti od pH vrednosti rastvora, amino i karboksilne grupe posle hidrolize su manje ili više (de)protonovane. Količine oslobođenih α -amino grupa mogu se odrediti primenom reagenasa koji reaguju specifično sa amino grupom dajući derivat koji se može odrediti spektrofotometrijski. Reagensi koji se najviše primenuju su: ninhidrin, o-ftaldialdehid (OPA) i trinitrobenzen sulfonska kiselina (TNBS). Određivanje pomoću ova tri reagensa pokazuju da rezultati dobijeni sa OPA i TNBS dobro koreliraju, dok su rezultati dobijeni sa ninhidrinom dosta niži. Takođe, OPA metod je bolji od TNBS jer je brži i sigurniji.

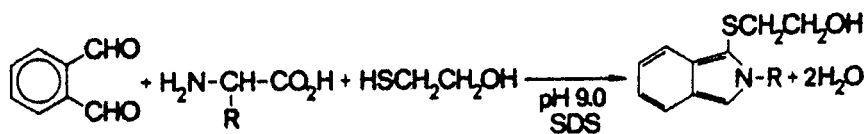
MATERIJAL I METODE

Metoda se zasniva na reakciji orto-ftaldialdehida (OPA) i β -merkaptoetanol sa primarnim aminima, pri čemu se dobija 1-alkil-2-alkil izoindol (sl. 1).

R u jednačini predstavlja reaktivnu aminokiselinu, peptid ili protein koji se sastoji od primarnog amina. OPA ima veliku apsorpciju na 340 nm, što omogućava spektrofotometrijsko određivanje aminokiselina i praćenje hidrolize u peptide. Sa izmerenom apsorbancom preračunava se količina ukupnih peptida izraženih u μ M.

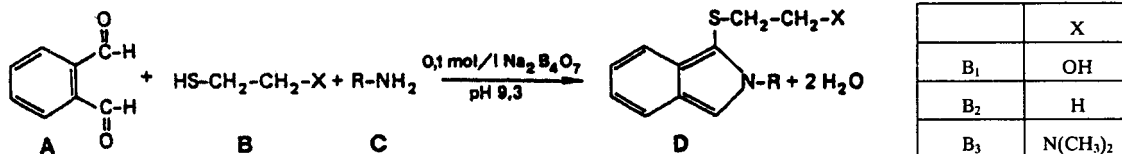
Princip merenja OPA metodom sastoji se u formiranju 1-alkil-2-alkilizoindola (D na slici 2) koji se dobija reakcijom primarne amino grupe i o-ftaldialdehid (A) u prisustvu tiol komponentenata (B). Najčešće upotrebljavana tiol komponenta je merkaptoetanol (B₁).

Međutim, primena merkaptoetanol je ograničena zbog veoma brzog opadanja ekstinkcije. Ovo smanjenje dolazi najviše primenom bis-alkiliran izoindola u 2,3-dehidro-1N-izoindol-1-on (E na slici 3).



Slika 1. REAKCIJA O-FTALDIALDEHIDA SA MERKAPTOETANOLOM
Figure 1. REAKTION O-PHTALDIALDEHYDE WITH MERCAPTOETHANOLE

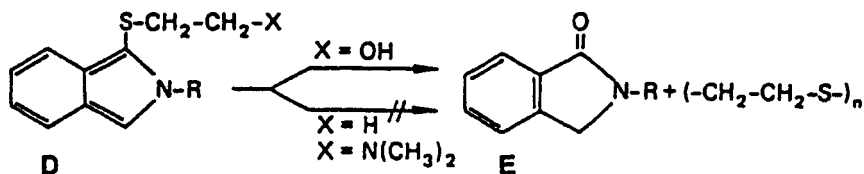
Adresa autora: Džulijana Tomovska, Univerzitet „Sv. Kliment Ohridski“, Fakultet biotehničkih nauka, Bitola, tel: 99389 47 238 276; 226-220



Slika 2. FORMIRANJE 1-ALKILTIO-2-ALKILIZOINDOLA
Figure 2. FORMATION OF 1-ALKYL-2-ALKYLISOINDOLE

Formiranje izoindolona je inducirano intramolekularnim nukleofilnim napadom na C1 atom pirolovo sistema sa hidroksilnom grupom merkaptoetanol. Pri tome dolazi do pogrešnih vrednosti ekstinkcije, jer izoindoloni nemaju apsorpcioni maksimum od 340 nm. Supstitucija merkaptoetanol sa etantolom (B₂ na sl. 2) onemogućava prelazak alkiltiolalkilindola, i daje stabilnu vrednost ekstinkcije na duži vremenski period. Najpogodnija modifikacija na OPA metodi je primena N,N-dimetil-2-merkaptoetilamonium hlorida (B₃ na slici 2); to je prašak koji nema neprijatan miris. Ova tiol komponenta kada se upotrebljava za određivanje OPA senzitivne amino grupe daje stabilnu ekstincionu vrednost u toku dužeg vremenskog perioda (više od jednog časa). Ovakva stabilnost potvrđena je na smeši aminokiselina.

Separacija niskomolekularnih proteina i peptida je izvršena centrifugom IEC Micromax, pri RCF = 20.000 g. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih peptida bilo je izvedeno sa spektrofotometrom Specol 1200. Za mlečno-kiselu fermentaciju upotrebljene su mikrobiološke kulture (Chr. Hansen's Laboratories) i smeše kultura prikazane u tabeli 1.



Slika 3. FORMIRANJE IZOINDOLONA
Figure 3. FORMATION OF ISOINDOLONE

Priprema uzoraka mleka i mlečnih proizvoda

Priprema uzoraka jogurta

Uzorci jogurta bili su pripremljeni od kravljeg, ovčjeg i kozjeg mleka. U sterilnim erlenmajerima stavlja se 200 mL mleka i 2-3% inokoluma (20-30 mL), meša se 10 minuta, dok se smeša homogenizuje, inkubira se na 38°C ili na drugoj temperaturi u zavisnosti od kulture. Vreme trajanja fermentacije iznosi od 4-6 časa, u zavisnosti od vrste kultura. Tok fermentacije je praćen pH metrom; smatra se da je fermentacija završena kada pH dostigne vrednost od 4,6. Zatim se smeša hladi na 5-22°C, u zavisnosti od tipa proizvoda, i meša. Proizvod se čuva u frižideru na temperaturi 5°C da bi se usporila fizička, hemijska i mikrobiološka degradacija.

Priprema uzoraka sira za analizu

Dobro isitnjeno 10 g sira stavlja se u menzuru, rastvara sa 50 ml dejonizovane vode. Homogenizuje se sa Ultra-Turrax blenderom brzinom 20.500 obrtaja u minuti, 15 do 20 min. Zatim se prebacuje u sud (tikvica) od 100 ml i dopunjuje do markice sa dejonizovanim vodom. Dalji postupak za dobijanje mlečnog seruma isti je kao kod tečnog i čvrstog jogurta. Naime, pipetira se homogeni rastvor sira u 10 centrifugalnih kiveta od 2 ml, centrifugira se 2 puta po 10 minuta pri RCF = 20.000g. Zatim se u bistrom serumu određuju ukupni peptidi pomoću dve metode za određivanje peptida.

Priprema uzoraka mleka za analizu

Direktni postupak sa centrifugiranjem homogenizovanog sterilizovanog mleka ne dovodi do razdvajanja visokomolekularnih od niskomolekularnih proteina i peptida. Da bi se dobio bis-

Tabela 1. SMEŠE KULTURA UPOTREBLJENIH ZA MLEČNOKISELU FERMENTACIJU
Table 1. MIXTURE OF CULTURE USED FOR LACTIC ACID FERMENTATION

Smeša	Kultura
a*	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> i <i>Streptococcus thermophilus</i>
b	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> i <i>Streptococcus thermophilus</i>
c	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> i <i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
d*	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> i <i>Streptococcus thermophilus</i>
e*	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> i <i>Streptococcus thermophilus</i>
f	<i>Rhizomucor miehei</i>
g	<i>Aspergillus niger</i>

Smeša	Kultura
h	c+d
i	a+c
j	b+d
k	a+b
l	c+e
m	b+c

* razlikuju se u međusobnim odnosima.

tar rastvor mlečnog seruma, neophodan je dalji tretman mleka. Za ovo je upotrebljeno nekoliko termičkih i netermičkih postupaka sa reagensima u odnosu 1:1 i bez reagensa:

1. Čisto homogenizovano sterilizovano mleko grejano na temperaturu od 90°C
2. Homogenizovano sterilizovano mleko tretirano sa rastvorom SDS-1
3. Homogenizovano sterilizovano mleko grejano na 90°C tretirano sa SDS1
4. Homogenizovano sterilizovano mleko grejano na 90°C tretirano sa SDS2
5. Homogenizovano sterilizovano mleko grejano na 90°C tretirano sa SDS3
6. Homogenizovano sterilizovano mleko tretirano sa SDS-2
7. Homogenizovano sterilizovano mleko tretirano sa SDS-3

SDS (Sodium Dodecil Sulfat) reagensi:

SDS-1 – 25 ml 100 mM (0,1M) dinatrium tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), meri se 1,970 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ i rastvara u vodi u odmernoj tikvici od 50 mL, (rastvor I); – 2,5 ml 20% SDS (Sodium Dodecil Sulfat). Meri se 2 g SDS i rastvara se u vodi u tikvici od 10 ml (rastvor II). U odmernoj tikvici od 100 mL stavlja se 25 ml rastvora I i 2,5 ml rastvora II i dopunjava se deionizovanom vodom do markice.

SDS-2 – 2,5 ml 30% SDS. Meri se 3g SDS i rastvara u vodi u tikvici od 10 mL. (rastvor III). U odmernoj tikvici od 100 mL stavlja se 25 mL rastvora I i 2,5 mL rastvora III i dopunjava se deionizovanom vodom do markice.

SDS-3 – 2,5 ml 40% SDS. Meri se 4g SDS i rastvara u vodi u tikvici od 10 mL. (rastvor IV). U odmernoj tikvici od 100 mL stavlja se 25 mL rastvora I i 2,5 mL rastvora IV i dopunjuje se deionizovanom vodom do markice.

8. Homogenizovano sterilizovano mleko tretirano sa 2 N HCl i 1 N NaOH
9. Homogenizovano sterilizovano mleko tretirano sa 0.75 N CCl_3COOH

Separacija niskomolekularnih proteina i peptida

Uzorak jogurta (ili komercijalni jogurti, odnosno kisela mleka) promeša se, homogenizuje, stavlja u 10 kivetu od 2 mL za centrifugiranje. Centrifugira se 10 minuta sa RPM 14.600 i RCF 20.000 g, izdvaja se supernatant i po-

novu centrifugira pod istim uslovima. Dobijeni bistri mlečni serum je spreman za analizu. Čuva se u frižideru na +4°C.

Standardni rastvori aminokiselina

1. **Glicin**, molekulska masa = 75.07 g mol^{-1}
Osnovni rastvor: 0,005 M, meri se 0.0375 g glicin rastvora u 100 mL vode.
2. **Glicil-glicin**, molekulska masa = 132.12 g mol^{-1}
Osnovni rastvor: 0,005 M, meri se 0.06606 g glicil glicina u 100 mL vode.
3. **Glicil-glicil-glicin**, molekulska masa = 189.17 g mol^{-1}
Osnovni rastvor: 0,005 M, meri se 0.0945 g glicil-glicil-glicina u 100 mL vode.
4. **L-leucil-glicin**, molekulska masa = 188.2 g mol^{-1}
Osnovni rastvor: 0,005 M, meri se 0.0941 g L-leucil-glicina u 100 mL vode.
5. **L-leucil-L-alanin**, molekulska masa = 202,3 g mol^{-1}
Osnovni rastvor: 0,005 M, meri se 0.1013 g L-leucil-L-alanina u 100 mL vode.

Priprema smeše standardnih rastvora aminokiselina:

Od svih standardnih rastvora sa koncentracijom od 0.0025M uzima se po 1 mL u odmernu tikvicu od 5 mL i od nje se pripremaju standardni rastvori sa koncentracijama od 10, 20, 30, 40, 80 i 100 μM , čita se apsorbancija i konstruiše standardna kriva za određivanje ukupnih peptida u uzorcima.

Priprema modifikovanog OPA reagensa:

U odmernoj tikvici od 50 mL stavlja se 25 mL rastvora (I), 40 mg OPA (o-phthalaldehid) rastvorenog u 1 mL

metanola i 100 mg N,N-dimetilmerkaptotetil amonijum hlorida dopunjava se deionizovanom vodom do markice.

Određivanje ukupnih peptida

Postupak za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih peptida OPA reagensom i merkaptotetanolom:

1ml OPA reagens i 0,1 mL rastvora od smeše aminokiselina pipetira se u usku kivetu od 1 mL, promeša se okretanjem kivete nekoliko puta, sačekava 2 minuta da bi se izvršila reakcija i očitava se apsorbancija na 340 nm. Isti je postupak za sve uzorke za analizu.

Postupak za određivanje ukupnih peptida sa modifikovanim OPA reagensom sa N,N-dimetilmerkaptotetil amonijum hloridom je isti kao postupak sa OPA reagensom i merkaptotetanolom.

REZULTATI I DISKUSIJA

U toku rada analizirano je 119 uzoraka mleka i mlečnih proizvoda (tab. 2). Predmet ispitivanja bili su različiti tipovi mlečnih proizvoda: jogurt, kiselo mleko, sir i kačkavalj. Sa druge strane, insistiralo se da budu od osnovnih tipova mleka: kravljeg, ovčjeg i kozjeg. Veći deo proizvoda je uzet iz trgovačke mreže, dok je 27 uzoraka jogurta bilo laboratorijski pripremljeno koristeći originalne kulture: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis*., *Rhezymucor miehei* i *Aspergillus niger*.

Ukupni peptidi u komercijalnim i laboratorijskim uzorcima dati su u sledećem pregledu:

Tabela 2. ISPITIVANJE UZORAKA MLEKA I MLEČNIH PROIZVODA
Table 2. INVESTIGATION OF MILK AND MILK PRODUCTS SAMPLES

Tip proizvoda	Tip mleka				Ukupno
	Kravlje	Ovčje	Kozje	Mešano	
Jogurt	40	7	7	–	54
Kiselo mleko	14	3	–	–	17
Mleko	10	–	–	–	10
Sir	7	9	1	3	20
Kačkavalj	15	1	–	2	18
Ukupno	86	20	8	5	119

Ukupni peptidi (μM) u komercijalnim uzorcima iznosili su:

	min.	max.
Jogurt od kravljeg mleka	13.06	34.95
Kiselo mleko od kravljeg mleka	13.38	24.85
Jogurt od ovčjeg mleka	20.56	26.46
Sir od kravljeg mleka	12.92	35.63
Kačkavalj od kravljeg mleka	11.07	36.52

Na osnovu ovih podataka konstatujemo da su najbolje komercijalne starter kulture one koje omogućavaju najveću količinu ukupnih peptida: YC 380 i R 704.

Rezultati ispitivanja ukupnih peptida prema tipu mlečnih proizvoda prikazani su u tabeli 3, a statistički prikazani na slici 4.

Rezultati ispitivanja ukupnih peptida prema tipu mleka prikazani su u Tabeli 4, a statistički prikazani na Slici 5.

Ukupni peptidi (μM) u laboratorijskim uzorcima iznosili su:

	min.	max.
Jogurt od kravljeg mleka (e)	17.36	36.34
Jogurt od kozjeg mleka (a+b)	8.91	23.97
Jogurt od kozjeg mleka (c)	5.89	15.2

Tabela 3. STATISTIČKI PODACI UKUPNIH PEPTIDA (μM) DOBIJENIH IZ RAZLIČITIH TIPOVA MLEČNIH PROIZVODA

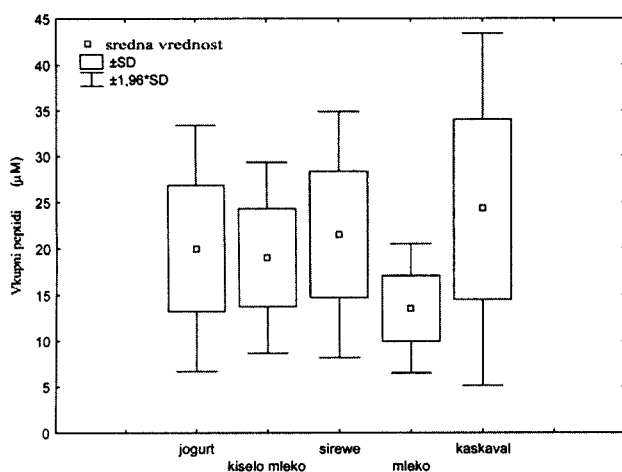
Table 3. STATISTICAL DATA OF TOTAL PEPTIDES (μM) OBTAINED FROM DIFFERENT TYPE OF MILK PRODUCTS

Tip proizvod	Ukupan broj uzoraka	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Standardna devijacija
Jogurt	54	20,02	5,89	36,34	6,81
Kiselo mleko	17	19,00	8,44	27,67	5,27
Mleko	10	13,50	6,71	18,65	3,57
Sir	20	21,54	10,47	35,63	6,81
Kačkavalj	18	24,27	11,07	36,52	9,76

Tabela 4. STATISTIČKI PODACI UKUPNIH PEPTIDA (μM) DOBIJENIH MLEČNIH PROIZVODA OD RAZLIČITIH TIPOVA MLEKA

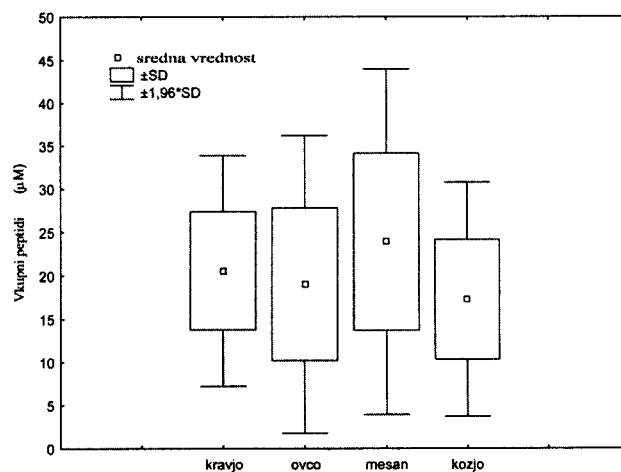
Table 4. STATISTICAL DATA OF TOTAL PEPTIDES (μM) OBTAINED FROM DIFFERENT TYPE OF MILK PRODUCTS FROM DIFFERENT MILK TYPES

Tip mleka	Ukupan broj uzoraka	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Standardna devijacija
Kravlje	86	20,57	6,71	36,52	6,80
Ovčje	20	19,00	5,89	36,34	8,78
Kozje	8	17,24	8,91	23,97	6,90
Mešano	5	23,94	10,47	35,98	10,22



Slika 4. PRIKAZ STATISTIČKIH PODATAKA REZULTATA UKUPNIH PEPTIDA DOBIJENIH NA RAZLIČITIM TIPOVIMA MLEČNIH PROIZVODA

Fig. 4. REVIEW OF STATISTICAL DATA OF TOTAL PEPTIDES OBTAINED FROM DIFFERENT TYPE OF MILK PRODUCTS



Slika 5. PRIKAZ STATISTIČKIH PODATAKA REZULTATA UKUPNIH PEPTIDA DOBIJENIH MLEČNIH PROIZVODA OD RAZLIČITIH TIPOVA MLEKA

Fig. 5. REVIEW OF STATISTICAL DATA OF TOTAL PEPTIDES OBTAINED FROM DIFFERENT TYPE OF MILK PRODUCTS FROM DIFFERENT MILK TYPES

ZAKLJUČAK

1. Uveden je postupak za određivanje ukupnih peptida sa orto-ftalaldehidom primenjujući merkaptometanol i N,N-dimetilmerkaptometil amonijum hlorid. Konstatacija je da je reproducibilan postupak sa N,N-dimetilmerkaptometil amonijum hloridom.
2. Prilikom određivanja ukupnih peptida u nefermentisanom mleku konstatovano je da vrednosti mogu biti povećane najverovatnije zbog delimične hidrolize u toku tretmana.
3. Peptidi su najviše zastupljeni kod jogurta kravljeg mleka, zatim kod kozjeg i najmanje kod ovčjeg mleka.
4. U odnosu na kulture konstatovali smo da smeša kulture (e) (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* i *Streptococcus thermophilus* YC 380) u kozjem i kravljem mleku pokazuje najveće peptide, dok u ovčjem mleku pokazuje sistem kulture (c) (*Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* i *Lactobacillus lactis* ssp. *Lactis* R 704).

LITERATURA

1. Yamamoto, N.; Akino, A.; Takano, T.: ANTIHYPERTENSIVE EFFECT OF THE PEPTIDES DERIVED FROM CASEIN BY AN EXTRACELLULAR PROTEINASE FROM *Lactobacillus helveticus* CP790; J. Dairy Sci. 77, 917 (1994).
2. Nielsen, P.M.: FUNCTIONALITY OF PROTEIN HYDROLYSATES. IN FOOD PROTEINS AND THEIR APPLICATIONS; Dama-doran, S., Paraf, A., Eds.; Marcel Dekker: New York, pp. 443 (1997).
3. Camacho, F.; Gonzalez Tello, P.; Paez Duenas, M.P.; Guadiz, E.M.; Guadix, A.: CORRELATION OF BASE CONSUMPTION WITH THE DEGREE OF HYDROLYSIS IN ENZYMIC PROTEIN HYDROLYSIS. J. Dairy Res. 68, 251 (2001).
4. Panasiuk, R.; Amarowicz, R.; Kostyra, H.; Sijtsma, L.: DETERMINATION OF ALPHA-AMINO NITROGEN IN PEA PROTEIN HYDROLYSATES: A COMPARISON OF THREE ANALYTICAL METHODS. Food Chem. 62, 363 (1998).
5. Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. Catignani G.L.: SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY USING o-PHTHALDEHYDE FOR DETERMINATION OF PROTEOLYSIS IN MILK AND ISOLATED MILK PROTEIN. J. Dairy Sci. 66, 1219 (1983).
6. Frister H., Maisel H., Schlimme E. Fresenius Z.: OPA METHOD MODIFIED BY USE N,N- 2- MERCAPTOETHYLAMMONIUM CHLORIDE AS THIOL COMPONENT. Anal. Chem. 330, 631 (1988).

SUMMARY

SPECTROFOTOMETRIC RESEARCH OF PEPTIDES IN MILK AND FERMENTED DAIRY PRODUCTS BY USING OPA AND MODIFIED OPA METHOD

¹Džulijana Tomovska, ²Bogdan Bogdanov

¹„Sv. Kliment Ohridski“ University, Faculty of Biotechnical Science, Bitola, ²„Sv. Ćiril i Metodij“ University, Faculty of Science, Institute of Chemistry, Skopje

Enzymatic hydrolysis of proteins in milk produces peptides. Amount of the α -amino-group released can be determined by applying a reagents that reacts only with amino groups creating a product that can be determined spectrophotometrically. We used OPA methods: o-Phtahaldialdehyde with merkaptometanol and a modification of the OPA method with N,N- Dimetilmerkaptometil amonijum hlorid. Separation of proteins into low molekula proteins and peptides was done by centrifuging with RCF 20.000 g. In clear milk serum we determined peptides. We also determined peptides in milk and yogurt prepared in laboratory conditions from seven different microbiological culture systems and in fermented dairy products taken randomly from the Macedonian market. Largest amount of peptides according to the type of milk was obtained from cow milk, according to the type of yogurt production.

Key words: Milk • peptides • hydrolysates • rennet • fermented milk products