ISSN 1392–0227 MAISTO CHEMIJA IR TECHNOLOGIJA. 2005. T. 39, Nr. 2

Mėginio paruošimo glikomakropeptidui nustatyti piene efektyviosios skysčių chromatografijos būdu tyrimas ir optimizavimas

R. Narkevičius, I. Jasutienė, G. Garmienė
KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; R.Narkevicius@lmai.lt

Patikslinta glikomakropeptido nustatymo liesame piene efektyviosios skysčių chromatografijos būdu metodika. Tirta pieno baltymų nusodinimo temperatūros ir sušaldymo temperatūros įtaka mėginyje nustatomai glikomakropeptido koncentracijai. Vietoj dviejų nuosekliai sujungų gelchromatografinių kolonėlių TSK-2000 SW naudojant vieną didesnės skiriamosios gebos kolonėlę TSK gel G 2000 SWXL, glikomakropeptidą atitinkančios chromatogramos smailės eliuavimo trukmė sumažėjo maždaug 7 min. Nustatyta, kad tiriant glikomakropeptido koncentraciją atšaldytuose (+8 °C) ar sušaldytuose (-18 °C) pieno mėginiuose, baltymus nusodinti galima ne tik 25 °C temperatūroje, kaip nurodyta metodikoje, bet ir pilant trichloracto rūgštį į atšaldytą ar sušaldytą mėginį ir po to jį pašildant iki 25 °C. Toks mėginių paruošimo režimas neturi statistiškai reikšmingos įtakos nustatomai glikomakropeptido koncentracijai piene.

Raktažodžiai: glikomakropeptidas, efektyvioji skysčių chromatografija, baltymų nusodinimo temperatūra.

Įvadas

Fermentinės pieno baltymų sutraukos susidarymas yra dviejų stadijų procesas, kurio pirmoji stadija yra pieną traukinančio fermento katalizuojama κ-kazeino proteolizė, o antroji stadija – destabilizuotų kazeino micelių agregacija esant Ca^{2+} jonams. Pirmosios fermentinio pieno sutraukinimo proceso stadijos metu nuo kazeino micelę stabilizuojančio κ-kazeino atskyla hidrofilinis glikomakropeptidas (GMP), o kazeino micelėje lieka pagrindinė hidrofobinė κ-kazeino dalis – para-κ-kazeinas. Todėl nustatant GMP koncentraciją piene galima tirti κ-kazeino hidrolizės intensyvumą, fermentinio pieno sutraukinimo proceso kinetiką. Pirmajai fermentacinės pieno sutraukinimo proceso stadijai tirti be GMP koncentracijos nustatymo gali būti taikomi ir kiti metodai, tokie kaip nebaltyminio azoto koncentracijos piene nustatymas [1], N-acetil neuramino rūgšties (kurios yra GMP sudėtyje) koncentracijos nustatymas [2], para-κ-kazeino nustatymas elektroforezės būdu [3, 4]. Šiuo metu dažniausiai fermentacinė pieno sutraukinimo proceso stadija yra tiriama nustatant GMP koncentraciją.

Išskirti GMP ir nustatyti jo koncentraciją piene galima įvairiais metodais: panaudojant efektyviąją skysčių chromatografiją, jonų mainų chromatografiją, ultrafiltraciją ir hidrofobinės sąveikos chromatografiją [5-9]. Iš visų minėtų metodų plačiausiai šiuo metu fermentacinei pieno sutraukinimo proceso stadijai tirti yra naudojamas GMP koncentracijos nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos būdu, pirmą kartą aprašytas van Hoydonko ir Oliemano [10]. Metodas pagrįstas tuo, kad, nusodinus galinčius interferuoti pieno išrūgų baltymus, GMP (kurio santykinė molekulinė masė yra apie 7000) koncentracija gali būti nustatyta efektyviosios skysčių chromatografijos būdu, panaudojant didelės skiriamosios gebos gelchromatografines kolonėles. Kadangi pieno fermentacijos proceso metu susidaręs GMP pereina į išrūgas, šio metodo pagrindu ES buvo paskelbtas ir oficialus fermentinių išrūgų aptikimo nugriebto pieno milteliuose metodas [11], kuris, nežymiai modifikuotas, įtrauktas ir į 2001 m. paskelbtą pieno ir pieno produktų analizės metodų taikymo reglamentą (EB) Nr. 213/2001 [12].

Nustatant GMP efektyviosios skysčių chromatografijos būdu, pieno baltymai yra nusodinami trichloracto rūgštimi (TCA) 25 °C arba 30 °C temperatūroje [10, 11]. Tačiau κ-kazeino hidrolizė chimozinu gali vykti ir žemoje temperatūroje (0–10 °C) ar net pieną sušaldant [13, 14]. Tiriant fermentinio pieno sutraukinimo proceso kinetiką žemų temperatūrų intervale, mėginio pašildymas iki metodikoje nurodytos pieno baltymų nusodinimo temperatūros, gal būt, galėtų iškreipti tyrimų rezultatus. Be to, priklausomai nuo fermentacijos proceso žemoje temperatūroje intensyvumo, pašildymo metu destabilizuoti pieno

baltymai dažnai koaguliuoja, kas taip pat gali žymiai paveikti tyrimo rezultatus. Tikslingiausia būtu nusodinti pieno baltymus toje temperatūroje, kurioje vykdomas fermentacijos procesas, o po to mėginius pašildyti iki metodikoje nurodytos temperatūros ir tada juos analizuoti. Norint nustatyti, ar nusodinimas TCA žemoje temperatūroje neturi įtakos mėginyje aptinkamai GMP koncentracijai, būtina atlikti papildomus tyrimus. Todėl šiame darbe buvo siekiama ištirti, kokią įtaką pieno baltymų nusodinimo temperatūra turi mėginyje nustatomai GMP koncentracijai, ir optimizuoti mėginio paruošimo GMP nustatyti sąlygas.

Tyrimų metodai

Darbe vartotas liesas pienas, gautas separuojant pašildytą iki 40 °C temperatūros šviežią rytinio melžimo karvės pieną, kurio rodikliai buvo: rūgštingumas – 18 °T, aktyvusis rūgštingumas – pH 6,68, riebalų kiekis – 4,12 %, baltymų kiekis – 3,84 %, laktozės kiekis – 4,58 %, užšalimo taškas – minus 0,550 °C, inhibitorių piene nerasta. Tyrimams vartoti fermentinių išrūgų milteliai, gauti iš AB „Pieno žvaigždės“.

GMP koncentracija mėginiuose nustatyta efektyviosios skysčių chromatografijos metodu [10]. Metodo aprašyme yra nurodoma, kad GMP nustatyti naudojamos 2 nuosekliai sujungtos TSK 2000 SW kolonėlės (ilgis 30 cm, vidinis skersmuo 0,75 cm). Įvertinant tai, kad metodas buvo parengtas palyginus seniai (1982 m.) ir chromatografinė įranga gerokai patobulėjo, vietoj dviejų nuosekliai sujungtų kolonėlių naudota viena firmos TOSOH BIOSCIENCE gelchromatografinė kolonėlė TSK gel G 2000 SWXL (ilgis 30 cm, vidinis skersmuo – 0,78 cm) ir prieškolonė TSK gel SWXL Guardcolumn (ilgis 4 cm, vidinis skersmuo – 6 mm). Eliuentas – fosfatinis buferis pH 6,0, jo tekėjimo greitis – 1ml/min. UV detektorius L-7400 La Chrom Merck Hitachi (λ 190–600 nm, plyšio plotis – 10 nm), siurbliai L-7100 La Chrom Merck Hitachi, integratorius D-7500 Merck Hitachi. Mėginiai analizuoti chromatografu įšvirkščiant 20 µl nufiltruoto tirpalo. Matuota kambario temperatūroje, esant bangos ilgiui 205 ir 280 nm. GMP kiekis įvertintas pagal smailės plotą.

Bandymų kartotinumas – 4. Apskaičiuotas tiriamojo parametro vidurkis, standartinis nuokrypis ir tarpgrupinių skirtumų patikimumo koeficientas, kuris lygintas su Studento kriterijaus t reikšmėmis.

Rezultatai ir jų aptarimas

Kaip nurodyta metodikoje, įvairių mėginio komponentų sulaikymo trukmei turi įtakos kolonėlių kokybė, todėl pirmajame darbo etape buvo patikslinta, kokią įtaką GMP eliuavimo trukmei turi dviejų nuosekliai sujungtų kolonėlių pakeitimas viena TSK gel G 2000 SWXL kolonėle. Paruošti pieno mėginiai: į 100 g lieso pieno 25 °C temperatūroje nuolat maišant pridėta nuo 2 iki 5 g fermentinių išrūgų miltelių. Ištirpinus miltelius, į 20 g mėginio įpilta 10 ml TCA ir išlaikius 60 min centrifuguota bei filtruota per popierinį filtrą. Filtratas analizuotas chromatografiškai esant bangos ilgiui 205 nm. 1 paveiksle pateikiamos lieso pieno (a) ir lieso pieno su 2 g išrūgų miltelių priedu (b) mėginių chromatogramos.

GMP nustatymo metodikoje nurodoma, kad naudojant dvi TSK-2000 SW kolonėles, GMP atitinkančios trečiosios chromatogramos smailės eliuavimo trukmė yra (15,5±1,0) min. Kaip matome iš pateiktos 1 pav. chromatogramos, mūsų eksperimento sąlygomis, GMP atitinkančios trečiosios smailės eliuavimo trukmė buvo trumpesnė. Norėdami įsitikinti, ar ši smailė tikrai atitinka GMP, papildomai matuota esant bangos ilgiui 280 nm. Kadangi GMP nėra aromatinių amino rūgščių, tai jis neabsorbuoja UV spindulių esant bangos ilgiui 280 nm. Šis papildomas tyrimas patvirtino, kad trečioji chromatogramos smailė tikrai yra GMP. Lieso pieno chromatogramoje (1a pav.) matome, kad arti GMP smailės yra nedidelė smailė, kurios eliuavimo trukmė yra 9,20 min. Literatūros duomenimis [15], tai yra neidentifikuota fono smailė („background peak“), visada aptinkama liesame piene. Šios fono smailės nepavyksta eliminuoti, keičiant GMP nustatymo sąlygas [15], todėl apskaičiuojant GMP koncentraciją būtina įvertinti šios smailės plotą. Iš nustatytos GMP smailės ploto atimtas fono smailės plotas.

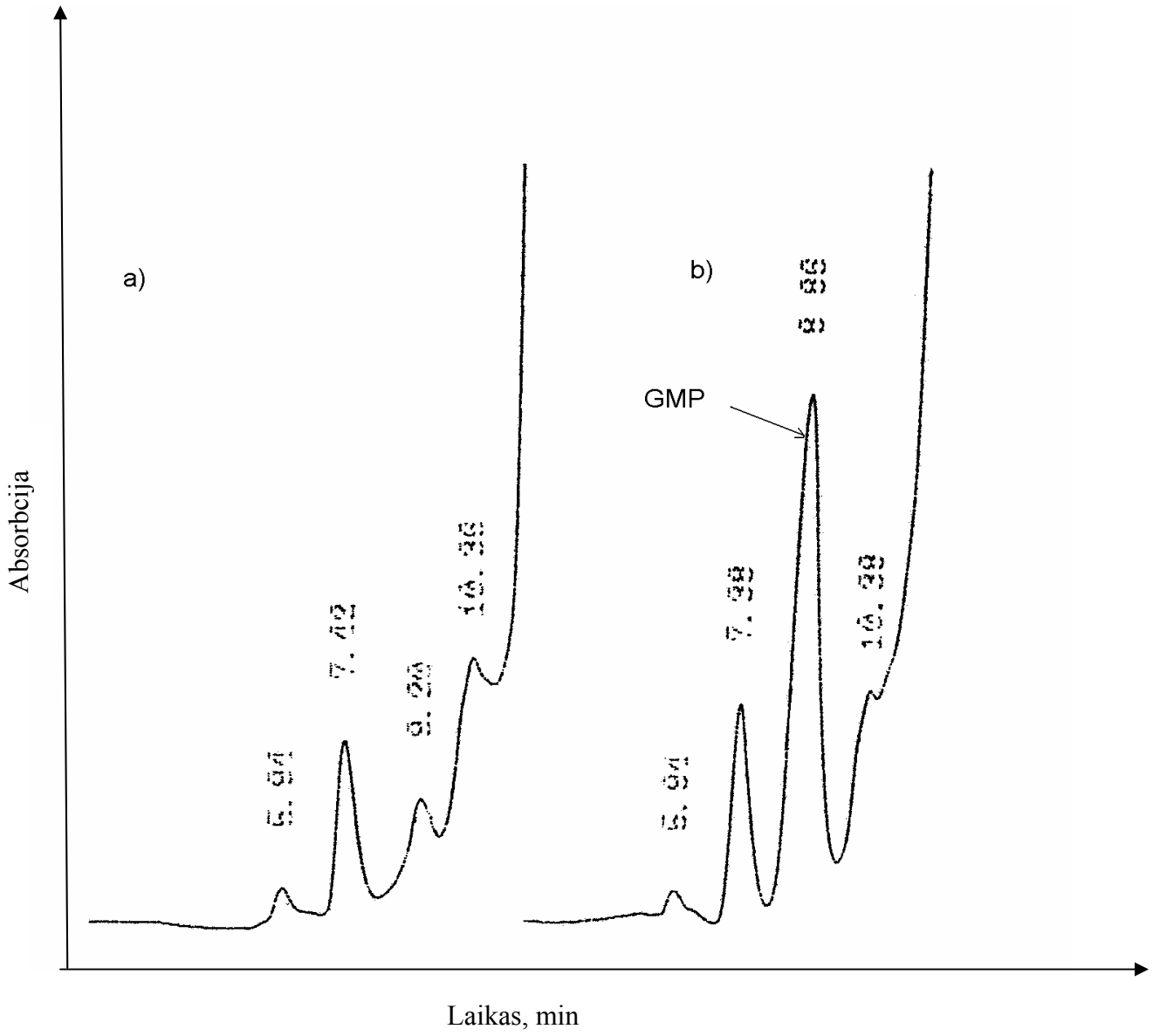
Kitame darbo etape, siekiant nustatyti baltymų nusodinimo temperatūros įtaką GMP išskyrimui, analizuoti sušaldyto lieso pieno su išrūgų miltelių priedu mėginiai. Buvo palyginti trys sušaldytų iki -18 °C temperatūros pieno mėginių baltymų nusodinimo būdai:

1 – mėginys 70 °C temperatūros vandens vonioje pašildomas iki 25 °C, baltymai nusodinami TCA (kontrolė);

2 – mėginys 70 °C temperatūros vandens vonioje pašildomas iki 8 °C, baltymai nusodinami TCA ir pašildoma iki 25 °C;

3 – mėginys užpilamas TCA ir 70 °C temperatūros vandens vonioje pašildomas iki 25 °C, taip nusodinant baltymus.

Tyrimų rezultatai pateikiami 1 lentelėje.



1 pav. Lieso pieno (a) ir lieso pieno su 2 g išrūgų miltelių priedu 100 g pieno (b) mėginių chromatogramos

1 lentelė. Baltymų nusodinimo būdo įtaka sušaldytuose pieno mėginiuose nustatomai GMP koncentracijai

Baltymų nusodinimo būdas	Mėginyje nustatyta GMP koncentracija, proc. nuo kontrolinio				
	1	2	3	4	vidurkis
1 (kontrolinis)	100	100	100	100	100
2	103,7	103,2	99,7	98,1	101,2±0,9
3	95,0	96,8	99,6	97,6	97,3±0,6

Įvertinant tyrimų rezultatus, kontrolinio mėginio, kuriame baltymai buvo nusodinti 25 °C temperatūroje, GMP atitinkančios smailės plotas buvo prilygintas 100. Bandomųjų mėginių GMP atitinkančių smailių plotai buvo apskaičiuoti procentais nuo kontrolinių mėginių smailių plotų. Kaip matome iš 1 lentelėje pateikiamų duomenų, nusodinant sušaldytų pieno mėginių baltymus 8 °C temperatūroje, bandomuose mėginiuose aptinkama GMP koncentracija beveik nesiskiria nuo nustatomos kontroliniuose mėginiuose. Nusodinant sušaldytų pieno mėginių baltymus būdu, kai mėginiai užpilami

TCA ir pašildomi iki 25 °C, pastebima nežymaus GMP koncentracijos sumažėjimo tendencija, lyginant su kontrole, nors statistiškai skirtumai tarp bandomųjų ir kontrolinių mėginių ir nėra patikimi (P<0,005). Šią tendenciją galima paaiškinti tuo, kad įpilant TCA ir po to sušaldytą mėginį pašildant iki 25 °C momentinė TCA koncentracija tam tikrą laiką, kol visas mėginys ištirpsta, būna aukštesnė nei kontroliniame. Tuo tarpu yra žinoma, kad didėjant TCA koncentracijai, GMP tirpumas mažėja [10], todėl tai gali turėti įtakos nustatomai GMP koncentracijai.

Apibendrinant galima padaryti išvadą, kad, nustatant GMP koncentraciją atšaldytuose (+8 °C) ar sušaldytuose (-18 °C) pieno mėginiuose, ruošiant juos tyrimui baltymus nusodinti galima ne tik 25 °C temperatūroje, kaip nurodyta metodikoje, bet ir pilant TCA į atšaldytą ar sušaldytą mėginį, o po to jį pašildant iki 25 °C. Toks mėginių paruošimo režimas neturi statistiškai patikimos įtakos nustatomai piene glikomakropeptido koncentracijai.

Norint patikslinti, ar neturi įtakos GMP koncentracijai nustatyti mėginio sušaldymo temperatūra, buvo palyginti lieso pieno su išrūgų miltelių priedu (2g/100g) mėginiai, sušaldyti -12 °C, -18 °C ir -24 °C temperatūroje. Mėginiai tirti, atitinkamoje temperatūroje pilant į juos TCA ir, pašildžius iki 25 °C, nusodinant baltymus. Statistiškai patikimų skirtumų tarp GMP koncentracijos skirtingoje temperatūroje sušaldytuose mėginiuose nebuvo nustatyta.

Išvados

Nenustatyta statistiškai patikimų skirtumų (P<0,05) tarp glikomakropeptido koncentracijos sušaldytuose pieno mėginiuose, kuriuos ruošiant tyrimui baltymai buvo nusodinami trim skirtingais būdais (pilant trichloracto rūgštį į sušaldytus, pašildytus iki 8 °C arba 25 °C mėginius). Temperatūrų intervale nuo -12 °C iki -24 °C nenustatyta statistiškai reikšmingos pieno mėginių sušaldymo temperatūros įtakos glikomakropeptido koncentracijai piene.

Literatūra

1. **Alais C., Mocquot G., Nitschmann H., Zahler P.** Rennet and its action on casein of milk. VII. On the splitting of nonprotein nitrogen from casein by rennet and its action during the primary reaction of the renneting of milk // Helvetica Chim. Acta. 1953. Vol. 34. P. 1955–1968.
2. **Koning P. J. De, Elisses J., Vries M. De.** A method for the detection of small percentages of whey powder in milk powder // Netherlands Milk and Dairy Journal. 1966. Vol. 20. P. 203–212.
3. **Dalgleish D. G.** Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin // Journal of Dairy Research. 1979. Vol. 46. P. 653–661.
4. **Carpenter D. F.** Estimation of para-κ-casein by separation on polyacrilamide gel // Journal of Dairy Science. 1981. Vol. 64, Suppl. 1. P. 63–70.
5. **Kawasaki I.** et all. pH-dependant changes of κ-casein and its preparation by ultrafiltration // Milchwissenschaft. 1993. Vol. 48, No. 4. P. 191–196.
6. **Nakano T., Ozimek L.** Gel chromatography of glycomacropeptide from sweet whey on Sephacryl S-200 at different pH and on Sephadex G-75 in 6 M guanidine hydrochloride // Milchwissenschaft. 1998. Vol. 53, No. 11. P. 629–633.
7. **Nakano T., Ozimek L.** Purification of glycomacropeptide from dialyzed and non-dialyzed sweet whey by anion exchange chromatography at different pH values // Biotechnol. Letters. 2000. Vol. 22. P. 1081–1086.
8. **Nakano T., Ozimek L.** Purification of glycomacropeptide from non-dialyzable fraction of sweet whey by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-agarose // Biotechnol. Letters. 2000. Vol. 22. P. 413–416.
9. **Tek H. N., Turchan K. N., Etzel M. R.** Effect of conductivity, pH and elution buffer salinity on glycomacropeptide recovery from whey using anion exchange chromatography // Journal of Food Science. 2005. Vol. 70, No. 4. P. E296–E300.
10. **Van Hoydonk A. C. M., Olieman C.** A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk // Netherlands Milk and Dairy Journal. 1982. Vol. 36. P. 153–158.
11. Detection of rennet whey in skimmed milk powder for public storage by determination of glycomacropeptide with the high-performance liquid chromatography procedure (HPLC) // Official Journal of the European Community. No. L 342/11. 05.12.1986.
12. Commission Regulation (EC) No 213/2001 of 9 January 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products // Official Journal of the European Community. No. L 37/1. 07.02.2001.
13. **Berridge N. J.** The second phase of rennet coagulation // Nature. 1942. Vol. 149. P. 194–195.
14. **Narkevičius R.** Fermentacijos žemesnėje nei 0 °C temperatūroje įtaka pieno baltymų stabilumui // Maisto chemija ir technologija. 2003. T. 37, Nr. 1. P. 94–97.
15. **Olieman C., van den Bedem J. W.** A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder // Netherlands Milk and Dairy Journal. 1983. Vol. 37. P. 27–36.

Pateikta spaudai 2005-07

R. Narkevičius, I. Jasutienė, G. Garmienė

INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF SAMPLE PREPARATION FOR THE DETERMINATION OF GLYCOMACROPEPTIDE IN MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Summary

A high-performance liquid chromatography method for determination of glycomacropeptide in skim milk was improved. The effects of milk proteins precipitation temperature and freezing temperature of the samples were investigated. The use of TSK gel G 2000 SWXL column, instead of two TSK 2000 SW columns in series, reduced glycomacropeptide peak eliution time in HPLC chromatogram by 7 min. No statistically significant differences were observed in the concentrations of glycomacropeptide in frozen milk samples during the preparation of which proteins were precipitated by different methods (trichloracetic acid was added to the frozen, warmed to 8 °C or 25 °C samples).

Keywords: glycomacropeptide, high-performance liquid chromatography, milk proteins, precipitation temperature.

Р. Наркявичюс, И. Ясутене, Г. Гармене

ИССЛЕДОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОБРАЗЦА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКОМАКРОПЕПТИДА В МОЛОКЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

Модернизирована методика определения гликомакропептида в обезжиренном молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изучено влияние температуры замораживания и осаждения белков молока на содержание гликомакропептида в образце. Применение одной колонки TSK gel G 2000 SWXL вместо двух параллельно соединенных колонок TSK 2000 SW способствовало сокращению продолжительности времени элюции пика хроматограммы, соответствующего гликомакропептиду, примерно на 7 мин. Не установлено статистически достоверных различий между концентрацией гликомакропептида в замороженных образцах молока, осаждение белков которых проводилось при разных температурах.