

MAŁGORZATA DAREWICZ, PIOTR MINKIEWICZ, MARTA DZIUBA,
TOMASZ PANFIL

ZASTOSOWANIE DRUGICH I CZWARTYCH POCHODNYCH WIDM UV DO IDENTYFIKACJI NISKOCZĄSTECZKOWEJ FRAKCJI PRODUKTÓW HYDROLIZY KAZEINY- β PRZEZ PLAZMINĘ

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody identyfikacji frakcji niskocząsteczkowych produktów hydrolizy bydlęcej kazeiny- β przez plazminę za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC) w połączeniu ze spektroskopią w nadfiolecie (UV). Bydlęcą kazeinę- β poddano hydrolizie przez plazminę. Supernatant pozostały po wytrąceniu nierozpuszczalnej frakcji hydrolizatu rozdzielono za pomocą ultrafiltracji na retentat zawierający polipeptydy i permeat zawierający peptydy o małej masie cząsteczkowej. Do identyfikacji frakcji permeatu wykorzystano parametry charakteryzujące ilościowo drugie i czwarte pochodne widm UV. Kształt pochodnych widm permeatu wskazywał na obecność niewielkich ilości tryptofanu, który nie został wykryty metodą spektrometrii mas. Wartości parametrów charakteryzujących pochodne widm UV niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu kazeiny- β różnią się w sposób istotny statystycznie (w granicach od $p < 0,05$ do $p < 0,001$) od analogicznych parametrów dla pochodnych widm pozostałych frakcji tego hydrolizatu oraz od pochodnych widm białka nie poddanego hydrolizie. Niskocząsteczkowa frakcja hydrolizatu kazeiny- β może być zidentyfikowana metodą spektroskopii UV.

Słowa kluczowe: kazeina- β , peptydy, plazmina, spektroskopia UV, wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconymi fazami

Wprowadzenie

Bydlęca kazeina- β (β -CN) jest fosfoproteiną, która stanowi ok. 35 % zawartości kazeiny. Masa cząsteczkowa tego białka wynosi około $24 \cdot 10^3$ Da, a punkt izoelektryczny – 4,5 [13, 16, 30]. Białko to jest opisane w bazie sekwencji białek UniProt (<http://www.expasy.org>) [19] pod numerem P02666. Kazeina- β jest znana jako prekursor licznych biologicznie aktywnych peptydów [2, 18]. Białko i jego fragmenty są też

Prof. dr hab. inż. M. Darewicz, dr hab. P. Minkiewicz, prof. nadzw., dr inż. M. Dziuba, dr inż. T. Panfil, Katedra Biochemii Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

przedmiotem zainteresowania ze względu na właściwości funkcjonalne np. zdolność stabilizacji pian i emulsji [3, 5, 8], a także jako alergen (Nr 11 w bazie danych białek alergennych i ich epitopów BIOPEP – <http://www.uwm.edu.pl/biochemia> [26] oraz nr 2736 w bazie Allergome – <http://www.allergome.org/> [24]).

Jednym z rodzimych enzymów mleka jest plazmina, która podobnie jak lipaza lipoproteinowa i kwaśna fosfataza, może brać udział w przemianach związków azotowych podczas dojrzewania sera [15, 17]. Plazmina (EC 3.4.21.7) jest odnotowana w bazie BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) [12, 27] jako enzym nr 20 oraz w bazie enzymów proteolitycznych MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) [28] pod numerem S01.233. Głównymi produktami hydrolizy kazeiny- β przez plazminę są kazeiny- γ : γ_1 -CN (f 29-209), γ_2 -CN (f 106-209), γ_3 -CN (f 108-209), γ_4 -CN (f 114-209) oraz proteozo-peptony: PP5 (f 1-105/107, 5P), PP8S (f 29-105/107, 1P), PP8F (f 1-28, 4P). Po spełnieniu wymagań odnośnie czasu działania plazminy i pH środowiska reakcji, plazmina może hydrolizować wiązania peptydowe między Lys₁₁₃ i Tyr₁₁₄ oraz Arg₁₈₃ i Asp₁₈₄ [14]. Obecność fragmentu (f 29-105/107) kazeiny- β w mleku może wskazywać na zmiany proteolityczne w tym surowcu, informując jednocześnie o subklinicznych stanach *mastitis* u krów [20].

Jedną z metod analitycznych stosowanych w analizie białek i peptydów jest spektroskopia w nadfiolecie. Może ona być używana jako samodzielna metoda analityczna [21, 22] albo w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową [9, 25]. W tym ostatnim przypadku widma UV są otrzymywane za pomocą detektorów fotodiodowych. Widma UV białek i peptydów charakteryzują się dużym wzajemnym podobieństwem. Fakt ten powoduje konieczność użycia w badaniach tej grupy związków pochodnych widm [9, 21, 22, 25]. Obliczenie pochodnych pozwala na uwidocznienie niewielkich różnic spowodowanych różnym składem aminokwasowym bądź zmianami struktury. Pochodne widm były stosowane między innymi jako narzędzie identyfikacji kazeiny- β oraz polipeptydów powstałych w wyniku jej hydrolizy przez plazminę [6, 7, 10, 11].

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody identyfikacji frakcji niskocząsteczkowych produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę za pomocą wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami w połączeniu ze spektroskopią w nadfiolecie.

Material i metody badań

Materiałem do badań była bydlęca kazeina- β (90 % białka w przeliczeniu na suchą substancję; 95 % białka w przeliczeniu na azot; m/m), zakupiona w firmie Eurial (Rennes, Francja). Bydlęca plazmina i aprotynina pochodziły z firmy Sigma (St. Louis USA). Do sporządzenia roztworów, stanowiących fazę ruchomą podczas rozdzielów chromatograficznych, zastosowano acetonitryl (ACN) i kwas trifluoroctowy (TFA)

o analitycznej czystości (Baker, Holandia) oraz wodę dejonizowaną (Milli-Qsystem, Millipore).

Hydrolizę kazeiny- β przeprowadzano wg metodyki opisanej przez Darewicz i wsp. [4]. Parametry reakcji były następujące: 2,5 % m/v β -CN; enzym/substrat = 1/2400 m/v; pH 6,8; temp. 40 °C; czas 5 h. Podczas hydrolizy stale tworzył się osad. Począwszy od drugiej godziny hydrolizy, osad był oddzielany przez wirowanie (1500 \times g, 10 min, 30 °C). Wirowanie powtarzano co 0,5 h, a otrzymane osady łączono razem i liofilizowano. Reakcję hamowano, dodając do hydrolizatu aprotyniny (9,7 TIU/ml w stosunku 1/200 v/v). Otrzymany supernatant poddawano ultrafiltracji (Filtron mini-ultra-set, membrana OMEGA, MWCO 5 kD; Pall Filtron Corp. USA). Frakcję permeatu otrzymaną po ultrafiltracji supernatantu liofilizowano i przechowywano w temp. -18 °C.

Próbki liofilizatu rozpuszczano w 300 μ l 0,1 M Bis-Tris, którego pH doprowadzono do 6,6 przy użyciu 0,1 M HCl, a następnie rozcieńczano za pomocą 700 μ l roztworu A (opisanego poniżej) z dodatkiem 6 M mocznika (pH = 2,2 uzyskane poprzez dodatek TFA) [29]. Końcowe stężenie liofilizatu wynosiło 3 mg/ml. Analizę metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC) prowadzono przy użyciu zestawu firmy Shimadzu składającego się z dwóch pomp LC-10AD, autosamplera SCL-10AD, kontrolera SCL-10AD, termostatu do kolumn CTO-10AS i detektora fotodiodowego SPD-M10AW. Zastosowano kolumnę Jupiter C₁₈ (Phenomenex) o wymiarach 250 \times 2,0 mm, średnicy ziaren 5 μ m i średnicy porów 300 Å. Do sterowania urządzeniem, przechowywania i przetwarzania danych zastosowano program Class-Vp 5.03 (Shimadzu). Analizy wykonywano w układzie dwóch rozpuszczalników A (ACN : H₂O : TFA; 100:900:1 v/v/v) oraz B (ACN : H₂O : TFA; 900:100:0,7 v/v/v) [29]. Do analizy stosowano następujący gradient: 10 % roztworu B w chwili startu, 30 % B po 10 min i 45 % B po 50 min. Po zakończeniu analizy stosowano następującą sekwencję płukania i równoważenia kolumny: 80 % B po 53 min, 80 % B po 58 min, 10 % B po 60 min i 10 % B po 80 min. Szybkość przepływu wynosiła 0,2 ml/min, objętość iniekcji – 50 μ l, a czas rejestracji danych – 65 min. Rejestracji danych pozyskiwanych co 1 nm dokonywano w zakresie długości fal 190 - 300 nm. W przypadku frakcji o określonym czasie retencji wyznaczano i analizowano widma UV oraz ich czwarte pochodne. Przebieg linii bazowej był obliczany automatycznie. Jako widmo tła stosowano widmo rozpuszczalnika (przy t = 0 min). Widmo to było automatycznie odejmowane od widma wierzchołka frakcji. Do opisu pochodnych widm UV kazeiny- β i składników jej hydrolizatu zastosowano parametry X, Y, Z, T [11] oraz W (nowy parametr) zdefiniowane w równaniach:

$$X = [(d^2A/d\lambda^2)_{283} - (d^2A/d\lambda^2)_{276}] / [(d^2A/d\lambda^2)_{288} - (d^2A/d\lambda^2)_{283}] \quad (1)$$

$$Y = [(d^2A/d\lambda^2)_{295} - (d^2A/d\lambda^2)_{290}] / [(d^2A/d\lambda^2)_{288} - (d^2A/d\lambda^2)_{283}] \quad (2)$$

$$Z = [(d^4A/d\lambda^4)_{284} - (d^4A/d\lambda^4)_{280}] / [(d^4A/d\lambda^4)_{291} - (d^4A/d\lambda^4)_{288}] \quad (3)$$

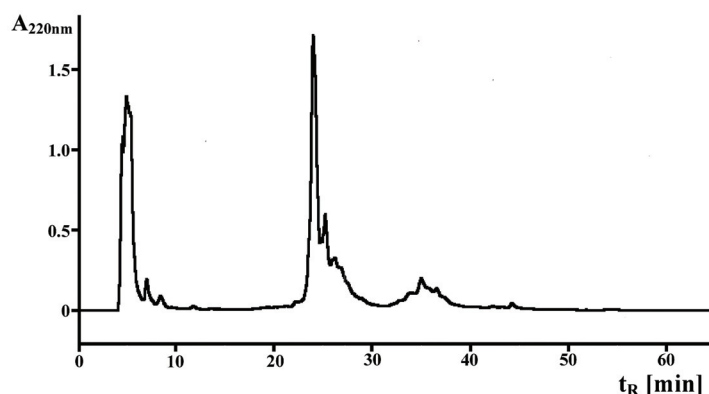
$$T = [(d^4A/d\lambda^4)_{291} - (d^4A/d\lambda^4)_{295}] / [(d^4A/d\lambda^4)_{291} - (d^4A/d\lambda^4)_{288}] \quad (4)$$

$$W = (d^4A/d\lambda^4)_{295} / (d^4A/d\lambda^4)_{291} \quad (5)$$

Statystyczną istotność różnic między wartościami średnimi poszczególnych parametrów permeatu oraz kazeiny- β , osadu i retentatu weryfikowano za pomocą testu t-Studenta (Statistica 8.0; StatSoft Inc.).

Wyniki i dyskusja

Przykładowy chromatogram permeatu zawierającego fragmenty kazeiny- β o małej masie cząsteczkowej przedstawiono na rys. 1. Piki o czasach retencji między 30 i 40 min odpowiadają proteozo-peptonom: PP5 (f 1-105/107) i PP8S (f 29-105/107), które są głównymi składnikami retentatu [10]. We frakcji permeatu wymienione polipeptydy stanowiły zanieczyszczenie. Czasy retencji kazeiny- β niepoddanej hydrolizie oraz osadu, oznaczane metodą RP-HPLC, są dłuższe niż czas retencji permeatu [6, 7, 10]. Gradient acetonitrylu stosowany w poprzednich eksperymentach [6, 7, 10] nie pozwalał na analizę niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu. Frakcja o najkrótszych czasach retencji zawierała wówczas składniki retentatu.

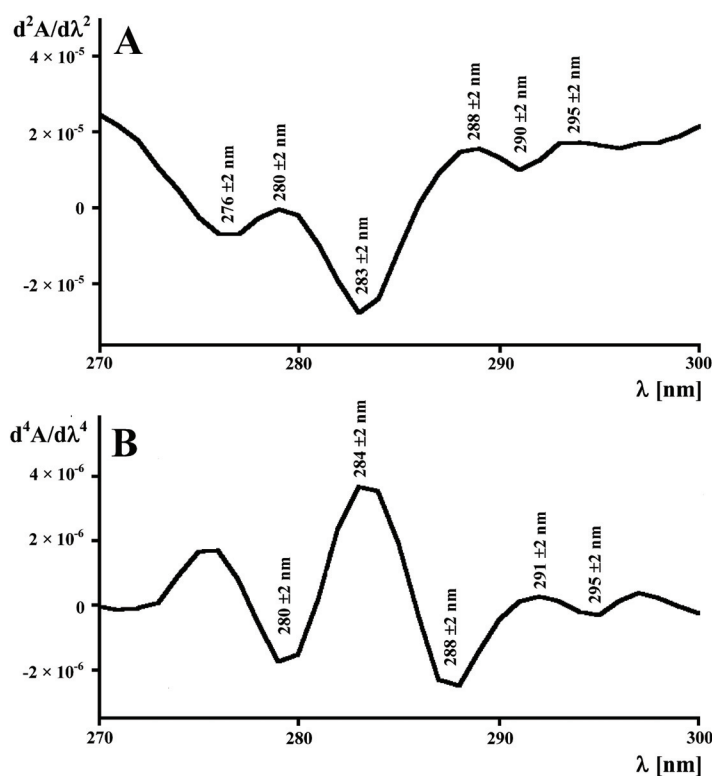


Rys. 1. Chromatogram niskocząsteczkowej frakcji hydrolizatu kazeiny- β otrzymanego po działaniu plazminy (permeatu). Analizowano widmo najwyższego piku ($t_R = 23,8$ min).

Fig. 1. Chromatogram of low-molecular weight fraction of β -casein plasmin-released hydrolysate (permeate). The spectrum of the highest peak ($t_R = 23.8$ min) was analyzed.

Przykładowe pochodne widm UV niskocząsteczkowych produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę przedstawiono na rys. 2. Zakres 270 - 300 nm jest polecany do identyfikacji analizowanych substancji, ponieważ widmo w tym zakresie nie zmienia się wraz z zawartością acetonitrylu i TFA [11, 25]. W tym zakresie można porównywać widma otrzymane za pomocą różnych gradientów stężenia acetonitrylu oraz

zmiennego składu fazy ruchomej. Kształt pochodnych widm UV wskazywał na obecność tyrozyny i tryptofanu w próbce. O obecności tryptofanu świadczyła obecność minimum przy długości fali 290 ± 2 nm w drugiej pochodnej widma UV oraz maksimum przy długości fali 291 ± 2 nm w czwartej pochodnej widma. Wymienione ekstrema nie występują w pochodnych widm peptydów, które nie zawierają tego aminokwasu [10, 25]. O obecności tyrozyny świadczyło minimum przy długości fali 283 ± 2 nm w drugiej pochodnej widma UV oraz maksimum przy długości fali 284 ± 2 nm w czwartej pochodnej widma [25].



Rys. 2. Pochodne widm UV niskocząsteczkowej frakcji produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę odnoszące się do wierzchołka najwyższego piku na chromatogramie (rys. 1): A) druga pochodna widma UV; B) czwarta pochodna widma UV. Na rysunku zaznaczono długości fal odpowiadające wartościom drugich i czwartych pochodnych widm wykorzystanym do obliczania parametrów ilościowych charakteryzujących widma (p. Materiał i metody badań).

Fig. 2. Derivatives of UV spectra of low-molecular weight fraction of β -casein plasmin hydrolysate referring to the apex of the highest peak at the chromatogram (Fig. 1.): A) the second derivative of UV spectrum; B) the fourth derivative of UV spectrum. IN this Fig., there are marked the wavelengths corresponding to the values of the second and fourth derivatives of spectra applied to calculate quantitative parameters that characterise spectra (vide Section 'Materials and Research Methods').

W efekcie analizy metodą spektrometrii mas (jonizacja za pomocą desorpcji laserowej w matrycy MALDI-MS) zidentyfikowano we frakcji permeatu peptydy pozbawione aminokwasów aromatycznych (fragmenty 1-28, 106-113 oraz 170-176 kazeiny- β) [10]. Jednak wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że permeat zawierał peptydy, których nie udało się wykryć i zidentyfikować tą metodą. Taki rezultat może być wyjaśniony na podstawie wniosków, które przedstawili Mallick i wsp. [23]. Wymienieni autorzy stwierdzili, że za pomocą różnych typów spektrometrów masowych (MALDI bądź spektrometrii mas z jonizacją za pomocą elektrorozpylania – ESI-MS), można wykryć różne zestawy peptydów w tej samej próbce, ale nie istnieje technika jonizacji gwarantująca identyfikację wszystkich składników dowolnej mieszaniny peptydów. Prawdopodobnie część peptydów zawartych w permeacie jest trudna do wykrycia za pomocą MALDI-MS. Chociaż spektrometria mas jest obecnie podstawową metodą identyfikacji peptydów (m.in. pochodzących z żywności) [1], to może być uzupełniona innymi metodami identyfikacji, takimi jak spektroskopia UV, mimo że ta ostatnia nie pozwala na identyfikację poszczególnych peptydów wchodzących w skład badanej frakcji.

Wartości poszczególnych parametrów charakteryzujących pochodne widm UV poszczególnych frakcji hydrolizatu kazeiny- β , a także białka niepoddanego hydrolizie przedstawiono w tab. 1. Wartości parametrów X, Y, Z i T permeatu są najbardziej zbliżone do analogicznych wartości uzyskanych we wcześniejszym eksperymencie [11] w przypadku kazeiny- κ , co sugeruje, że permeat będący mieszaniną peptydów charakteryzuje się stosunkiem zawartości Trp/Tyr zbliżonym do stosunku zawartości tych aminokwasów w powyższym białku. Wartość parametru W rośnie wraz ze stosunkiem Trp/Tyr. Najniższą wartość tego parametru wykazuje frakcja retentatu składająca się z polipeptydów niezawierających tryptofanu [6, 7, 10], natomiast najwyższą – frakcja osadu, w której stosunek Trp/Tyr wynosi 1/3. Wartość parametru W permeatu sugeruje małą zawartość tryptofanu.

Statystyczna istotność różnic pomiędzy wartościami parametrów X, Y, Z, T i W frakcji niskocząsteczkowych produktów hydrolizy kazeiny- β i wartościami powyższych parametrów innych badanych frakcji przedstawiono w tab. 2. Z przedstawionych danych wynika, że zastosowanie parametrów Y, Z, T i W pozwala na rozróżnienie widm UV poszczególnych frakcji plazminowego hydrolizatu kazeiny- β przy wyższym poziomie istotności statystycznej różnic niż zastosowanie parametru X. Strategia poszukiwania sposobów interpretacji widm UV powinna obejmować porównanie różnych algorytmów i wyboru najkorzystniejszego z nich. W niniejszej pracy użytym kryterium jest statystyczna istotność różnicy między wartościami poszczególnych parametrów charakteryzujących widma różnych frakcji hydrolizatu. Niniejsze wyniki są potwierdzeniem wcześniejszych rezultatów opisujących możliwość identyfikacji białek i peptydów rozdzielanych za pomocą RP-HPLC na podstawie pochodnych ich widm

Tabela 1

Wartości parametrów charakteryzujących drugie i czwarte pochodne widm UV (X, Y, Z, T, W) odnoszące się do permeatu zawierającego niskocząsteczkowe produkty hydrolizy kazeiny- β przez plazminę, a także osadu i retentatu oraz kazeiny- β niepoddanej hydrolizie.

Values of parameters to characterise the second and fourth derivatives of UV spectra (X, Y, Z, T, W) referring to the permeate containing low-molecular weight products of β -casein plasmin hydrolysate as well as to the sediment and retentate, and intact (non-hydrolyzed) β -casein.

Próbka / Sample	X \pm s / SD	Y \pm s / SD	Z \pm s / SD	T \pm s / SD	W \pm s / SD
Permeat / Permeate n = 4	0,1701 \pm 0,1211	0,2934 \pm 0,0349	1,7073 \pm 0,1749	0,2376 \pm 0,1998	-0,0541 \pm 0,1470
Kazeina- β / β -Casein n = 9	0,1117 \pm 0,0326 ^a	0,7383 \pm 0,0786 ^a	0,9332 \pm 0,0986 ^a	0,8006 \pm 0,0576 ^a	0,5708 \pm 0,0079 ^b
Osad / Sediment n = 9	0,0618 \pm 0,0864 ^a	0,9546 \pm 0,0318 ^a	0,6795 \pm 0,0287 ^a	0,8582 \pm 0,026 ^a	0,7454 \pm 0,0049 ^b
Retentat / Retentate n = 12	0,3177 \pm 0,0533 ^a	-0,3709 \pm 0,1327 ^a	5,8909 \pm 0,9579 ^a	-3,2379 \pm 0,5224 ^a	-0,2238 \pm 0,0377 ^b

Objaśnienia: / Explanatory notes:

n – liczba pomiarów / number of measurements; s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

^a – dane z publikacji Dziuby i wsp. [10] / data from the paper by Dziuba and co-authors [10]; ^b – obliczone na podstawie danych uzyskanych w wyniku eksperymentu opisanego w pracy Dziuby i wsp. [10] / Calculated based on the data resulting from the experiment as described by Dziuba and co-authors [10].

Tabela 2

Wyniki statystycznej istotności różnic między parametrami X, Y, Z, T, W odnoszące się do kazeiny- β i składników jej hydrolizatu otrzymanego w wyniku działania plazminy.

Results of statistical significance of the differences between X, Y, Z, T, W parameters; those results refer to the β -casein and components of its plasmin-released hydrolysate.

Próbka Sample	Permeat Permeate	Kazeina- β β -Casein	Osad Sediment	Retentat Retentate
Permeat Permeate	–	X Y**** Z**** T**** W***	X Y**** Z**** T**** W****	X**** Y**** Z**** T**** W*
Kazeina- β β -Casein	X Y**** Z**** T**** W***	–	X**** Y**** Z**** T** W****	X**** Y**** Z**** T**** W****
Osad Sediment	X Y**** Z**** T**** W****	X**** Y**** Z**** T** W****	–	X**** Y**** Z**** T**** W****
Retentat Retentate	X**** Y**** Z**** T**** W*	X**** Y**** Z**** T**** W****	X**** Y**** Z**** T**** W****	–

Objaśnienia: / Explanatory notes:

Różnice statystycznie istotne przy: * p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,01; **** p < 0,001 / Statistically significant differences at: * p < 0.05; ** p < 0.02; *** p < 0.01; **** p < 0.001.

w nadfiolecie [6, 7, 9, 10, 11, 25]. Ograniczeniem opisywanej metody jest konieczność stosowania do interpretacji pochodnych widm UV parametrów, które nie są uwzględnione w programie oferowanym przez producenta, a także możliwa zmiana wartości parametrów w zależności od programu użytego do obliczeń [25].

Podsumowanie

Podjęte w niniejszej pracy badania dotyczyły możliwości zarekomendowania parametrów spektroskopowych umożliwiających identyfikację kazeiny- β i składników jej hydrolizatu powstałych po działaniu plazminy. Uzyskane wyniki wskazują, że identyfikacja kazeiny- β i jej fragmentów peptydowych na podstawie parametrów spektroskopowych, charakteryzujących czwarte pochodne widm, jest korzystniejsza niż identyfikacja białek/hydrolizatów/peptydów tylko na podstawie czasów retencji.

Drugie i czwarte pochodne widm UV mogą służyć do rozróżniania poszczególnych produktów hydrolizy bydlęcej kazeiny- β przez plazminę różniących się stosunkiem zawartości tryptofanu do zawartości tyrozyny. Spektroskopia UV nie pozwala na identyfikację poszczególnych peptydów wchodzących w skład niskocząsteczkowej frakcji produktów hydrolizy kazeiny- β przez plazminę, ale może służyć jako uzupełnienie spektrometrii mas.

Niniejsza praca była finansowana w ramach tematu statutowego UWM w Olsztynie nr 528-0712-809.

Literatura

- [1] Contreras M.D.M., López-Expósito I., Hernández-Ledesma B., Ramos M., Recio I.: Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food-derived bioactive peptides. *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 981-994.
- [2] Darewicz M., Dziuba B., Minkiewicz P., Dziuba J.: The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments. *Food Rev. Int.*, 2011, **27**, 357-388.
- [3] Darewicz M., Dziuba J.: Struktura a właściwości funkcjonalne białek mleka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43)**, 47-60.
- [4] Darewicz M., Dziuba J., Caessens P.W.J.R., Gruppen H.: Dephosphorylation-induced structural changes in β -casein and its amphiphilic fragment in relation to emulsion properties. *Biochimie*, 2000, **82**, 191-195.
- [5] Darewicz M., Dziuba J., Dziuba M.: Functional properties and biological activities of bovine casein proteins and peptides. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2006, **15/56 (Suppl. 1)**, 79-86.
- [6] Darewicz M., Dziuba J., Minkiewicz P., Panfil T.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second derivative ultraviolet spectroscopy as a tool for the identification of β -casein. *Milchwissenschaft*, 2005, **60**, 14-17.
- [7] Darewicz M., Dziuba J., Panfil T.: Application of the second derivatives of UV spectra for the identification of β -casein hydrolysate components. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, 127-132.

- [8] Dickinson E.: Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 305-312.
- [9] Dziuba J., Darewicz M., Minkiewicz P., Dziuba B.: Milk Proteins. In: *Handbook of Dairy Foods Analysis*. Nollet L., Toldrá F., Eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London 2010, pp. 79-107.
- [10] Dziuba J., Darewicz M., Minkiewicz P., Panfil T.: Application of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivatives UV spectroscopy in identification of β -casein and its peptide fractions. *Milchwissenschaft*, 2002, **57**, 497-502.
- [11] Dziuba J., Nałęcz D., Minkiewicz P.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivative ultraviolet spectroscopy as a tool for identification of milk proteins. *Anal. Chim. Acta*, 2001, **449**, 243-252.
- [12] Dziuba M., Dziuba B.: Bazy danych białek i bioaktywnych peptydów BIOPEP. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Red. J. Dziuba J., Ł. Fornal. WNT, Warszawa, 2009, ss. 141-175.
- [13] Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E.: Nomenclature of the proteins of cow's milk - sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 1641-1674.
- [14] Fox P.F., Law J.: Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.*, 1991, **5**, 239-262.
- [15] Fox P.F., Stepaniak L.: Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.*, 1993, **3**, 509-530.
- [16] Imafiodon G.I., Farkye N.Y., Spanier A.M.: Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, **7**, 663-689.
- [17] Ismail B., Nielsen S.S.: Plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.*, 2010, **93**, 4999-5009.
- [18] Iwaniak A., Dziuba J.: Bioaktywne sekwencje w białkach żywności. W: *Biologicznie aktywne peptydy i białka żywności*. Red. J. Dziuba i Ł. Fornal. WNT, Warszawa, 2009, ss. 176-270.
- [19] Jain E., Bairoch A., Duvaud S., Phan I., Redaschi N., Suzek B.E., Martin M.J., McGarvey P., Gastegger E.: Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinform.*, 2009, **10**, Article no. 136.
- [20] Kim Y., Atalla H., Mallard B., Robert C., Karrow N.: Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Res.*, 2011, **7**, Article no. 51.
- [21] Mach H., Arvinte T.: Addressing new analytical challenges in protein formulation development. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, 2011, **78**, 196-207.
- [22] Mach H., Middaugh C.R.: Ultraviolet spectroscopy as a tool in therapeutic protein development. *J. Pharm. Sci.*, 2011, **100**, 1214-1227.
- [23] Mallick P., Schirle M., Chen S.S., Flory M.R., Martin D., Ranish J., Raught B., Schmitt R., Werner T., Kuster B., Aebersold R.: Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nature Biotechnol.*, 2007, **25**, 125-131.
- [24] Mari A., Rasi C., Palazzo P., Scala E.: Allergen databases: current status and perspectives. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2009, **9**, 376-383.
- [25] Minkiewicz P., Dziuba J., Darewicz M., Nałęcz D.: Application of high-performance liquid chromatography on-line with ultraviolet/visible spectroscopy in food science. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2006, **15/56 (Suppl. 1)**, 145-153.
- [26] Minkiewicz P., Dziuba J., Gładkowska-Balewicz I.: Update of the list of allergenic proteins from milk based on local amino acid sequence identity with known epitopes from bovine milk proteins – a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2011, **61**, 153-158.

- [27] Minkiewicz P., Dziuba J., Iwaniak A., Dziuba M., Darewicz M.: BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 965-980.
- [28] Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A.: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 2010, **38**, D227-D233.
- [29] Visser S., Slangen C.J., Rollema H.S.: Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1991, **548**, 361-370
- [30] Wong D.W.S., Camirand W.M., Pavlath A.E. Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1996, **36**, 807-844.

APPLICATION OF SECOND AND FOURTH DERIVATIVES OF UV SPECTRA TO IDENTIFY LOW MOLECULAR WEIGHT PRODUCTS OF β -CASEIN HYDROLYSIS BY PLASMIN

S u m m a r y

The objective of the present research study was to develop a method to identify low-molecular weight fraction of bovine β -casein hydrolysis products by plasmin using a reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method on-line with an ultraviolet (UV) spectroscopy method. The bovine β -casein was hydrolysed by the plasmin. The supernatant left over after the precipitation of hydrolysate was separated *via* ultra-filtration into a retentate containing polypeptides and a permeate containing low molecular weight peptides. To identify the fraction of permeate, those parameters were used, which quantitatively characterised the second and fourth derivatives of UV spectra. The shape of the permeate derivatives indicated the presence of low amounts of tryptophane, which was not detected when using a mass spectrometry method. The values of parameters characterising the derivatives of UV spectra of low-molecular weight fraction of β -casein hydrolysate differ significantly (from $P < 0.05$ to $P < 0.001$) from the analogous parameters determined in respect to the derivatives of spectra of other fractions of hydrolysate and from the derivatives of spectra of intact (non-hydrolyzed) protein. Using the UV spectroscopy method, it is possible to identify the low-molecular weight fraction of β -casein hydrolysate.

Key words: β -casein, peptides, plasmin, UV spectroscopy, reversed-phase high-performance liquid chromatography 