

Deamination of lysine in soy sauce by reaction with active carbonyl compounds produced by Maillard reaction

Dedin F Rosida

Departement of Food Technology, UPN "Veteran" Surabaya

E-mail : dienyd.upn@yahoo.com

Abstract

The development of a brown colour during the thermal treatment of many foods, such as coffee, roasted beef, soysauce or evaporated milk, mainly originates from interaction between reducing carbohydrates and amino acids, known as the Maillard reaction. It is commonly known at present that one of the causes of changes in colour, aroma, flavor and nutritional value of food products. The Maillard reaction involves condensation, dehydration and polymerization. As a result of this complex reaction, a variety of by products, intermediates and brown pigment.

An amino-carbonyl reaction in soysauce yielded a rapid brown coloration. An apparent decrease in the free amino group, determined by the TNBS method, was observed to be associated in parallel with the brown pigment formation by UV-Vis spectrum, amino acids by HPLC, Protein content by Lowry method, pH and reducing sugar.

"Moromi", moromi with heating and soysauce were examined to effect Maillard reaction. The positive effect of sugar on browning suggested that lysine content decreased from 1.18% to 0.69%, free amino group decreased from 3.16 mg/ml to 2.27 mg/ml and their UV-Vis spectrum in range 400 nm. These results indicate that ϵ -amino group of lysine in protein could easily be determined by the amino-carbonyl reaction

Key words : Maillard reaction, soysauce, brown pigment, lysine

Penurunan kadar asam amino lisin dalam kecap manis akibat reaksinya dengan senyawa karbonil dalam reaksi Maillard

Pendahuluan

Reaksi Maillard adalah reaksi yang terjadi antara gugus amino dari suatu asam amino bebas, residu rantai peptida atau protein dengan gugus karbonil dari suatu karbohidrat apabila keduanya dipanaskan atau tersimpan dalam waktu yang relatif lama. Gugus ϵ -amino residu lisin yang terikat pada peptida dan protein berperan penting dalam reaksi disebabkan kereaktifannya yang relatif tinggi. Selain itu gugus α -amino terminal juga berperan dalam reaksi Maillard (Yokotsuka 1986).

Salah satu produk pangan yang mengandung produk reaksi Maillard adalah kecap. Kecap merupakan bahan penyedap yang disukai dan banyak digunakan dalam berbagai makanan. Secara umum, ada dua jenis kecap yang dikenal di Indonesia yaitu kecap asin dan kecap manis. Kecap manis diproduksi di Indonesia dan Malaysia. Dalam pembuatan kecap manis di Indonesia, moromi sebagai bahan baku kecap manis dimasak dengan penambahan gula merah dan bumbu, sedangkan di Malaysia menggunakan karamel dan tidak menggunakan bumbu. Dengan demikian kecap manis Indonesia memiliki warna dan flavor khas yang tidak dimiliki oleh negara lain

Pembentukan warna kecap terjadi selama fermentasi moromi dan proses pemasakan. Selama pemasakan terjadi pembentukan warna coklat disebabkan terjadinya reaksi pencoklatan non enzimatis, yaitu reaksi Maillard dan karamelisasi. Reaksi pencoklatan non enzimatis merupakan fenomena yang sering dijumpai pada penyimpanan bahan makanan maupun pengolahan makanan. Reaksi ini berkontribusi dalam pembentukan warna, flavor, aroma dan tekstur.

Metodologi Penelitian

Produk moromi dan kecap manis

Pada penelitian ini terdapat tiga produk yang diteliti: moromi (M), moromi yang dipanaskan (MP, suhu 100°C selama 65 menit) dan kecap manis (KGM). Pembuatan kecap manis dilakukan sesuai prosedur Wiratma (1995).

Dari ke tiga produk tersebut dilakukan analisis yang meliputi: kadar protein (Lowry), α -amino (TNBS), pH, gula reduksi (Lane Eynone), total padatan terlarut (refraktometer), jenis asam amino dan gula pada gula merah dianalisis menggunakan

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dan absorpsi UV-Vis dengan spektrofotometer.

Absorpsi UV-Vis

Absorpsi UV-Vis dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer (Shimadzu UV-160) pada kisaran panjang gelombang 200 – 500 nm. Sampel yang dibaca absorbansinya adalah masing-masing dari ke tiga produk (M, MP, KGM).

Total Protein (Apriyantono et al. 1989)

Analisa protein terlarut dilakukan dengan metode Lowry. Sampel sebanyak 1 ml dengan 5,5 ml pereaksi berupa campuran larutan natrium karbonat 2% dalam larutan NaOH 0,1 N dan tembaga sulfat 0,5% dalam larutan Na-K tartarat 1% (50:1), diaduk dan dibiarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar. Kemudian dilakukan penambahan 0,5 ml pereaksi Folin-Ciocalteu, dikocok dan dibiarkan selama 30 menit. Setelah warna biru terbentuk, dibaca absorbansi larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm. Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan bovine serum albumin sebagai standar .

Kadar α -amino nitrogen (Adler-Niesen 1979)

Analisa kadar α -amino nitrogen dilakukan dengan metode TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid). Sampel sebanyak 1 ml menggunakan buffer fosfat pH 8,2. Kemudian ditambah dengan 1 ml larutan TNBS 0,1% dan dipanaskan pada penangas air pada suhu 40 °C selama 2 jam. Reaksi dihentikan dengan cara menambahkan HCl 1 N, kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 340 nm. Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan larutan leusin sebagai standar.

Komposisi asam amino

Analisis komposisi asam amino menggunakan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* dan dilakukan terhadap empat jenis produk: M, MP dan KGM. Derivatisasi sampel dilakukan dengan menambahkan HCl 6 N dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 20 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan dan diambil 30 μ l larutan derivatnya, di biarkan selama 20 menit, kemudian ditambah Na-asetat . Sampel sebanyak 2 μ l siap diinjeksikan pada *HPLC* dengan kondisi sebagai berikut: Kolom pico Tag 3.9 X 150 nm, kecepatan aliran: 2 ml/min, Tekanan 3000 psi, Fase gerak asetonitril 60%, Bufer natrium asetat pH 5.75, Detektor UV dan panjang gelombang 254 nm.

$$\% \text{ asam amino} = \frac{\text{luas area sampel} \times \text{konsentrasi standar}}{\text{luas area standar}} \times \frac{\text{BM}}{\text{konsentrasi sampel}} \times 100$$

Hasil dan Pembahasan

Kecap dihasilkan dari proses pengolahan moromi dengan pemanasan dan penambahan gula. Pada fermentasi moromi terjadi pemecahan protein, lemak dan karbohidrat oleh kapang, khamir dan bakteri menjadi fraksi-fraksi yang lebih sederhana: asam amino, asam lemak dan glukosa, demikian juga yang terjadi pada pembuatan kecap manis. Fraksi-fraksi tersebut akan menentukan rasa, aroma, warna dan komposisi kecap (Hardjo 1964). Perubahan moromi menjadi produk kecap karena proses pengolahan memberikan efek perubahan terhadap komposisinya. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Produk kecap manis KGM yang dihasilkan mempunyai kekentalan sebesar 65 % Brix . Nilai pH pada ke tiga produk tidak terdapat banyak perbedaan, yaitu pada kisaran 4.55 - 4.97. Besarnya nilai pH pada tiap produk yang relatif sama, diharapkan tidak mempengaruhi reaksi Maillard yang terjadi pada moromi dan kecap

Tabel 1. Komposisi moromi dan kecap

Komposisi	M	MP	KGM
Gula reduksi (%)	1.07	1.25	6.39
Total padatan terlarut (%)	34	36-37	65
pH	4.81	4.85	4.97

M: moromi; MP: moromi dipanaskan; KGM: kecap

Pembentukan senyawa pirazin sebagai produk reaksi Maillard dalam gula kelapa kadarnya cukup besar. Gula yang paling berperan dalam reaksi Maillard ini adalah fruktosa dan glukosa. Kadar sukrosa dalam gula merah sebesar 74.68%, fruktosa 1.9% dan glukosa 3.43%, sedangkan asam amino bebasnya adalah lisin, triptophan, asam glutamat, asam aspartat, alanin dan glisin (Jayalekshmy dan Mathew 1990).

Gerrard dan Brown (2002) mereaksikan gliadin, sebagai model protein dengan glutaraldehid, formaldehid dan gliseraldehid. Glutaraldehid yang merupakan senyawa dikarbonil dengan dua bagian yang reaktif bereaksi sangat cepat dengan gliadin dibandingkan dengan formaldehid dan gliseraldehid yang hanya mempunyai satu gugus karbonil yang reaktif. Hasil reaksi Maillard ini memberikan efek penurunan terhadap kadar lisin . Hal ini memperlihatkan suatu protein dengan reaksi cross linking dalam reaksi Maillard dalam sistem pangan memberikan efek yang cukup besar

Demikian juga rasio gula terhadap asam amino sangat berpengaruh terhadap reaksi pembentukan warna. Makin meningkat jumlah asam aminonya, makin banyak terjadi pembentukan warna. Gugus karbonil dari gula pereduksi dengan gugus amino asam amino bebas merupakan komponen penting dalam reaksi Maillard

Beberapa penelitian reaksi Maillard hasil reaksi protein dan gula reduksi menunjukkan “blocking” terhadap asam amino lisin. Menurunnya kadar asam amino lisin dari moromi (1.18%) ke produk kecap (0.69%, Tabel 2) karena deaminasi gugus ϵ -amino lisin dalam proses reaksi Maillard dalam kecap yang akan membentuk warna coklat (melanoidin). Reaksi deaminasi amino-karbonil tersebut berbeda dengan reaksi deaminasi gugus α -amino dari suatu asam amino melalui reaksi degradasi Strecker (Namiki et al . 1983). Asam amino lisin paling cepat menghasilkan warna yang disebabkan oleh gugus ϵ -amino tersebut yang sangat reaktif. Sistein paling lambat menghasilkan warna. Oleh karena itu bahan pangan yang mengandung asam amino lisin sangat mudah menjadi coklat.

Residu lisin protein pada awal reaksi berikatan dengan gula pereduksi membentuk senyawa turunan deoksiketosil-lisin sebagai laktulosil-lisin. Pada tahap reaksi lebih lanjut, senyawa laktulosil-lisin terdekomposisi menghasilkan pramelanoidin yang dapat bereaksi dengan asam amino lain pada rantai samping protein yang berakibat terhadap kerusakan beberapa jenis asam amino esensial dan terbentuknya ikatan silang antar rantai protein (Hurrell et al, 1979).

Tabel 2 . Kadar asam amino produk moromi dan kecap (%)¹⁾

Asam amino	M	MP	KGM
Asam aspartat	1.55	1.46	1.06
Asam glutamat	3.23	2.96	2.27
Serin	0.32	0.32	0.20
Glisin	0.57	0.58	0.38
Histidin	0.36	0.39	0.23
Arginin	0.39	0.30	0.78
Treonin	0.90	0.84	0.64
Alanin	0.60	0.65	0.45
Prolin	0.39	0.40	0.47
Tirosin	0.87	0.82	0.45
Valin	0.67	0.67	0.45
Metionin	0.39	0.39	0.30
Sistein	1.23	1.17	0.21
Isoleusin	1.34	1.28	1.04
Leusin	1.04	0.96	0.82
Phenilalanin	0.68	0.61	0.49
Lisin	1.18	0.89	0.69

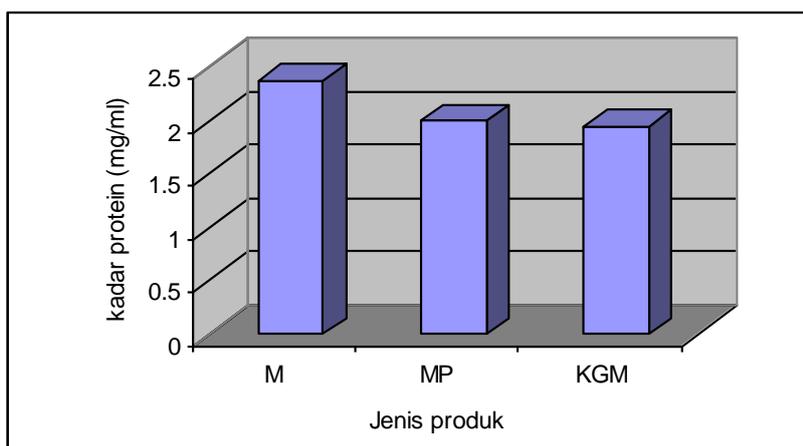
M: moromi; MP: moromi dipanaskan; KGM: kecap manis

Assoumani et al (1994) mendapatkan bahwa lisin yang hilang selama berlangsungnya reaksi Maillard dipengaruhi oleh jenis gula. Fruktosa adalah gula yang sangat reaktif, sehingga memberikan efek kehilangan lisin yang cukup besar dibandingkan jenis gula lainnya. Setelah fruktosa, sifat kereaktifan gula selanjutnya diikuti oleh glukosa, galaktosa, mannose, arabinosa, xilosa dan ribosa

Asam amino hidrofobik (Valin, leusin, isoleusin), asam amino hidrofilik (glutamate, glisin, aspartat) dan asam amino aromatik (fenilalanin) cenderung meningkat kadarnya dari produk moromi menjadi produk kecap. Hal ini diduga karena adanya panas, protein yang terdapat pada moromi mengalami degradasi atau denaturasi sehingga terurai menjadi asam-asam aminonya.

Hampir semua macam asam amino terdapat pada kecap. Sejumlah pentosa seperti xilosa dan arabinosa yang terdapat pada kecap mampu membentuk senyawa Amadori dengan asam amino tersebut. Hashiba (1978) mendapatkan total konsentrasi senyawa Amadori pada kecap sebanyak 4,5 mM.

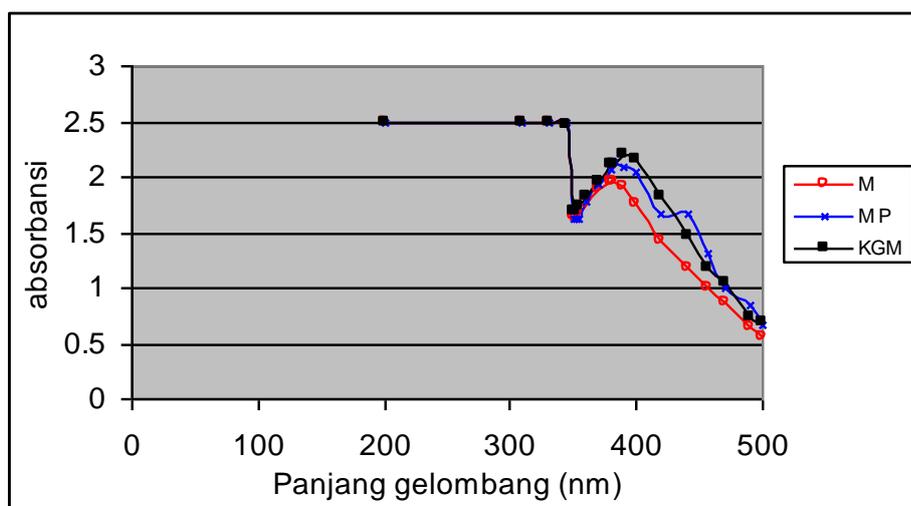
Jika dilihat kadar protein dan α -amino nitrogen masing-masing produk menunjukkan bahwa produk moromi memiliki kadar protein tertinggi 2.37 mg/ml, kemudian berturut-turut menurun pada produk MP dan KGM sebesar 1.99 mg/ml dan 1.94 mg/ml (Gambar 1). Kadar protein yang besar merupakan substrat untuk terjadinya reaksi Maillard, sehingga diduga penurunan kadar protein dalam produk kecap disebabkan proses denaturasi dan digunakan dalam reaksi Maillard.



Gambar 1. Kadar protein pada masing-masing produk

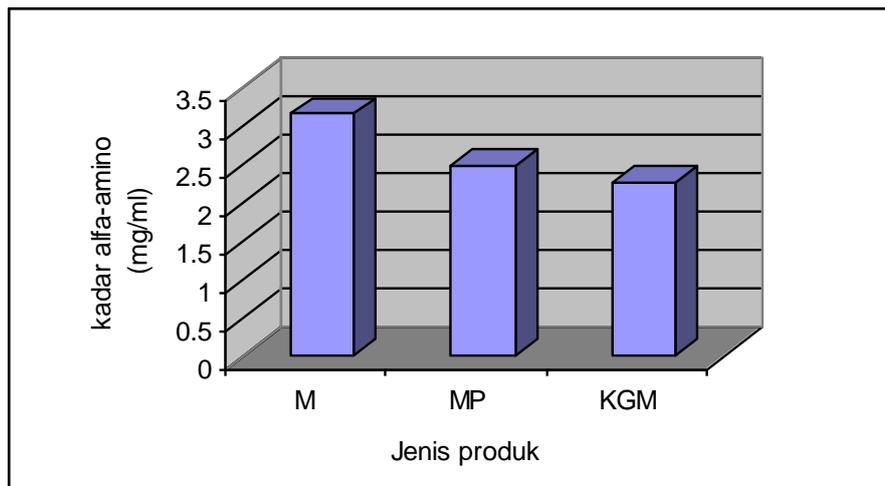
Terjadinya reaksi Maillard yang terjadi pada produk kecap dapat dilihat dari intensitas pembentukan warna pada produk. Hal ini dapat dilihat pada serapan UV-Vis pada kecap (Gambar 2). Serapan maksimal pada semua produk terjadi pada kisaran panjang gelombang 400 nm - 420 nm, yang merupakan karakteristik serapan dari

produk reaksi Maillard. Serapan tertinggi terjadi pada produk kecap (KGM) dimana warnanya lebih coklat kehitaman, diikuti oleh MP. Hal ini diduga pada KGM terjadi reaksi Maillard yang lebih intens dan juga karena gula reduksi (Tabel 1) menunjukkan bahwa pada KGM terdapat gula reduksi yang lebih besar 6.39%, dengan kadar fruktosa dari gula merah yang cukup besar 1.90%. Fruktosa bersifat lebih reaktif dibandingkan dengan glukosa. Gugus karbonil dari gula reduksi ini jika bertemu dengan gugus amina akan mudah terjadinya reaksi Maillard.



Gambar 2. Serapan UV-Vis pada masing-masing produk

Kadar alfa-amino nitrogen semakin menurun dengan perubahan moromi menjadi produk kecap (KGM), yaitu dari 3.16 mg/ml menjadi 2.27 mg/ml (Gambar 3). Pereaksi TNBS bereaksi secara lambat dengan ion hidroksil (Adler-Niesen 1979). Kedua puluh asam amino penyusun protein mengandung ion hidroksil sebagai bagian dari gugus karboksil. Asam amino serin, treonin, asam aspartat dan asam glutamat juga mengandung gugus hidroksil tambahan pada rantai sampingnya. Oleh karena itu kadar α -amino tiap fraksi juga ditentukan oleh perbedaan konsentrasi ke empat asam amino tersebut.



Gambar 3. Kadar alfa-amino pada masing-masing produk

Semua asam amino bebas dapat berpartisipasi dalam reaksi Maillard disebabkan gugus amino bebasnya. Kebanyakan asam amino bahan pangan terdapat dalam suatu rangkaian peptida, dimana hanya pada gugus terminal dan rantai samping yang reaktif dari residu asam amino yang terlibat dalam reaksi Maillard

Simpulan

Menurunnya kadar asam amino lisin dari moromi ke kecap dari 1.18% menjadi 0.69% karena deaminasi gugus ϵ -amino lisin dalam proses reaksi Maillard dalam kecap manis yang akan membentuk warna coklat (melanoidin). Serapan maksimum dengan UV-Vis pada masing-masing produk moromi (M) moromi dipanaskan (MP) dan kecap (KGM) mempunyai pola yang hampir sama. Produk kecap memiliki intensitas warna coklat yang lebih besar, dibandingkan produk moromi

Pustaka

- Adler, Niesen. 1979. Determination of degree of hidrolisis of food protein hidrolisat by trinitrobenzene sulfonic acid. *J. Agric. Food. Chem.* 27: 1256 – 1262
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1984. *Officia Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14 th ed. AOAC. Virginia : Inc. Arlington
- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budijanto S. 1989. *Analisa Pangan*. Bogor: PAU IPB
- Assoumani MB, Maxime D dan Nguyen NP. 1994. Evaluation of a lysine-glucose Maillard model system using three rapid analytical methods. *Food Chem.*46:383-387
- Gerrard JA dan Brown PK. 2002. Protein crosslinking in food: mechanisms, consequences, applications. *International congress series* 1245: 211-215

- Hardjo S. 1964. Pengolahan dan Pengawetan Kedelai untuk Makanan Manusia. Bogor
- Hashiba H. 1978. Isolation and identification of Amadori compounds from soy sauce. Agric. Biol Chem. 42(4): 763-768
- Hurrell RF, Lerman P dan carpenter KJ. 1979. Reactive lysine in foodstuffs as measured by a dye-binding procedure. J.Food Sci. 44:1221-1227
- Namiki M, Terao A, Ueda S dan Hayashi T. 1983. Deamination of lysine in protein by reaction with oxidized ascorbic acid or active carbonyl compounds produced by Maillard reaction. Agric.Biol.Chem.47.106-114
- Wiratma E. 1995. Analisis komponen flavor kecap manis [skripsi]. IPB ,Fateta
- Yokotsuka T. 1986. Soy sauce biochemistry. Adv. Food. Res. (30): 195-329