

Karamellszínanyag frakcionálása gélszűrőssel

ÖRSI FERENC

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémiai Tanszék

Érkezett: 1968. május 31.

A nemenzimes barnulás során keletkező színanyagok (karamell, melanoidin) szerkezetét ma még nem ismerjük és ebben jelentős szerepet játszanak azok a nehézségek, amelyek ezen színanyagok elválasztását, illetve frakcionálását kísérik.

A legelőször alkalmazott lúgos-savas kioldási módszerek (1, 2) alkoholos (3, 4) vagy egyéb vegyületekkel végzett kicsapási műveletek nem vezettek egységes termékekhez (5). Adszorpciós oszlopokon (6, 7, 8) és ioncserélő oszlopokon a színanyag egy része oldhatatlanul megkötődött és így a vizsgálat számára elveszett (9, 10).

Sikerrel alkalmazta *Binkley* (11) a melaszszínanyagok izolálásában és frakcionálásában a membrándiffúziós módszert, azonban a módszer nagyon időigényes, ezért újabb és újabb módszerekkel kísérleteznek.

Biztató eredményeket hozott kezdetben az elektroforézis is, amely alkalmas a színanyag izolálására a kisebb mozgékonyaságú cukroktól. Frakcionálásra nem alkalmas, mert a töltésviszonyok ezt nem teszik lehetővé. Az e tárgyban megjelent közlemények csak különböző típusú színanyagok elválasztásáról tudósítanak (12, 13, 14, 15).

Néhány szerzőnek két különböző mólsúlyú frakcióra sikerült elválasztania a barna színanyagokat, módosított dextransz-oszlopok alkalmazásával. *Cortis – Jones* (16) a cukorgyári levek színanyagainak viselkedését vizsgálta Sephadex G 25 oszlopon eluciós kromatográfiával és megállapította, hogy két frakcióra válik szét: egy nagy mólsúlyú és egy kis mólsúlyú frakcióra. Az utóbbi a cukrokkal együtt távozik az oszlopról és feltételezik, hogy ez a nagymólsúlyú színanyag képződésének intermedierje.

Stinson és Willits (17) az oszlopméret, a felvitt oldat térfogatának és elúciósebességének szisztematikus változtatásával meghatározták a karamellszínanyag nagymólsúlyú frakciójának, a cukor és káliumklorid elválasztásának optimális körülményeit Sephadex G 25 oszlopon. Módszerekkel izolálták a juharszirup hőkezelésekor képződő barna színanyagokat (18).

Kishovszkii és mkt. (19) cukor-aminósav reakcióban keletkező barna színanyagokat a borból Sephadex G 75 oszlopon választották el eredményesen.

A cukorkulórban levő karamell színanyagokat *Rother* (20) választotta el Sephadex G 25 oszlopon. Módszerével olyan élelmiszereket vizsgált, amelyek színezésére cukorkulórt használtak és megállapította, hogy gélfiltrációval a cukorkulór nagymólsúlyú barna színanyagai elválaszthatók, meghatározhatók.

Tekintettel arra, hogy több esetben sikeresen alkalmazták a színanyagok frakcionálásában a gélszűrést, a hasonló típusba tartozó glükózhibomlás-termékek esetében is remélhető volt sikeres alkalmazása.

A szénhidrátok hibomlási kinetikájának tanulmányozása során megvizsgáltam ezért, hogy a glükózoldatban hő hatására képződő barna színanyagok hogyan választatók el gélszűrőssel.

Karamellminta készítése

Normál méretű kémcsöbe p. a. glükózból 654 mg-ot és 0,586 ml desztillált vizet mértem be, amely éppen 0,1 móltörtnek felelt meg. A kémcsövet leforrasztottam és 150 C°-ra beállított termosztátban elhelyezett 1 liter térfogatú, hőmérővel ellenőrzött hőmérsékletű olajfürdőben 20, 40, 60, 80, 100 és 110 percig hőkezelt, majd a hőkezelés befejezése után gyorsan szobahőmérsékletre hűtöttem.

A karamellminta frakcionálása: Az elválasztás céljára 1 cm átmérőjű és 50 cm hosszú oszlopot készítettem Sephadex G 25-ből (Pharmacia gyártmány „fine” minőség). A vizsgálandó mintából 0,5 ml-t az oszlop tetejére rétegeztem kb. 1 cm-es desztillált víz réteg alá, majd 5 ml/óra sebességgel desztillált vízzel eluáltam. Ezen sebességet kb. 150 vízoszlopcentiméter nagyságú levegőnyomással biztosítottam. Az előkísérletek során automata frakciószedő berendezés segítségével az eluátumot 2 ml-es részletekben fogtam fel.

A színanyag mennyiségi meghatározása: A vizsgálandó frakcióhoz 2 ml desztillált vizet adtam és extinkcióját meghatároztam 1 cm-es küvettában, 400 nm-en, Spektromom 360 spektrofotométerben. Mivel a színanyagok fajlagos vagy moláris extinkciós koefficiense nem ismeretes, mennyiségüket az extinkcióval jelmezem.

A különböző hőkezelési idő után képződött frakciók mennyiségének meghatározására a mintákat egyben, 50 vagy 100 ml-es mérőlombikban fogtam fel, majd desztillált vízzel jelig töltöttem és ezen oldat extinkcióját határoztam meg 1 cm-es küvettában, 400 nm-en, Spektromom 360 fotométerben.

A frakciók glükóztartalmának kimutatása: A frakciók glükóztartalmát Fehling módszerrel vizsgáltam meg.

A nagymólsúlyú frakció kinyerése: Azon frakciókat, amelyek a Sephadex G 25 oszlopról először lejöttek és glükózt nem tartalmaztak összegyűjtöttem és vízfürdőn bepároltam. További vizsgálatokhoz kb. 1 ml desztillált vízben oldottam fel.

Az így nyert nagymólsúlyú frakció ismételt elválasztását az előzőekben leírtak szerint 1 cm átmérőjű, 50 cm hosszú Sephadex G 50 oszlopon végeztem.

Karamellminta frakcionálása rétegezett Sephadex oszlopon. 1 cm átmérőjű és kb. 1 m hosszú üvegcső alsó 50 cm-es részébe Sephadex G 50-et, felső 50 cm-es részét e Sephadex G 25-öt töltöttem.

Ezen oszlop segítségével 1 ml karamellmintát az előzőekben leírtak szerint megvizsgáltam.

Eredmények és értékelés

Az elővizsgálatokhoz a kísérleti részben leírtak szerint 150 C°-on 110 percig hőkezelt sötétbarna, de lebegő részeket nem tartalmazó glükózoldatot használtam fel. 0,5 ml minta elválasztása után nyert frakciók extinkcióját az 1. sz. ábrán rajzoltam fel a frakciószám függvényében.

Az oszlopról a karamellminta tökéletesen eltávozott és két frakcióra vált szét. A kismólsúlyú rész együtt távozott az oszlopról a glükózzal, míg a nagymólsúlyú rész tisztán kinyerhető.

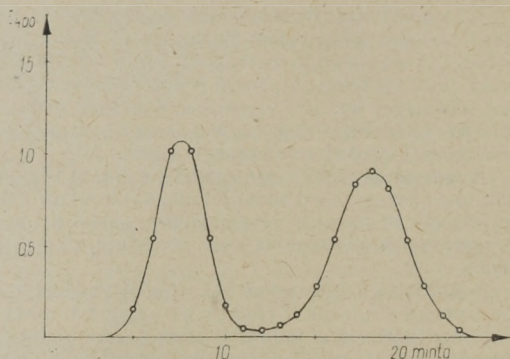
A tisztán kinyert nagymólsúlyú frakciók esetében megkíséréltem további elválasztást Sephadex G 50 oszlopon. Az elválasztás után nyert frakciók extinkcióját a frakciószám függvényében a 2. sz. ábra mutatja.

Látható, hogy a nagymólsúlyú barna színanyag ismét két frakcióra vált szét, de a kismólsúlyú rész most jóval kevesebb. Annak eldöntésére, hogy ez a rész valóban a nagymólsúlyú színanyag alkotórésze volt, vagy megegyezik a Sephadex G 25-ön kapott kismólsúlyú frakcióval, egy rétegezett oszlopot készí-

tetem és 0,5 ml – előzőkben is vizsgált – 150 C°-on 110 percig hőkezelt glükóz-
oldatot vittem erre fel. Az eredmény a 3. sz. ábrán látható.

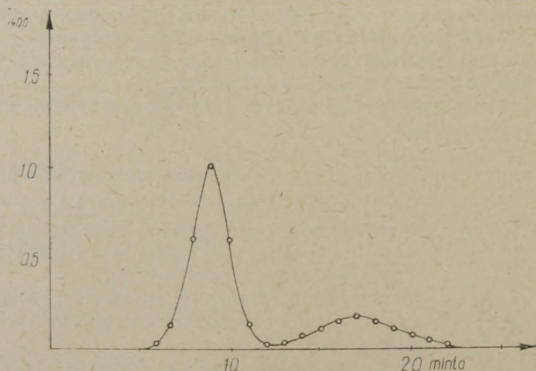
A rétegezett oszlopon csak két frakció tapasztalható, tehát a Sephadex G 50
oszlopon kapott kismólsúlyú frakció megegyezik a Sephadex G 25 oszlopon ka-
pott kismólsúlyú frakcióval. Tekintve, hogy az elválasztás megfelelőnek látszik
Sephadex G 25 oszlopon, feltehetőleg a bepárlásnál képződhetett a nagymólsúlyú
barna színanyag bomlása révén.

1. sz. ábra
Glükóz-karamell elválasztása
Sephadex G 25 oszlopon



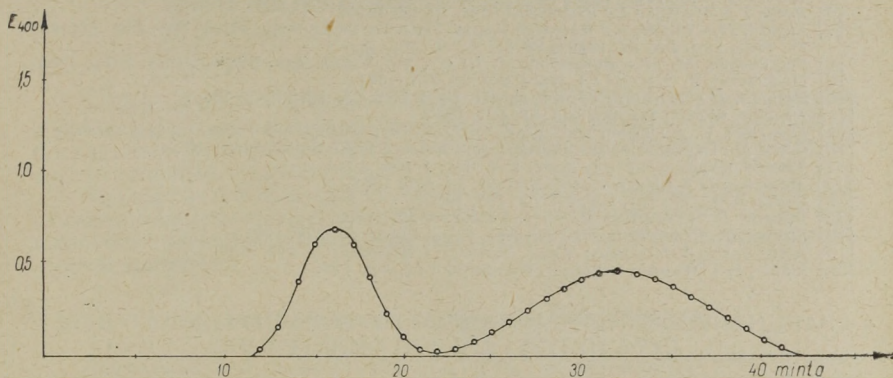
A továbbiakban a Sephadex G 25 oszlopon nyerhető két frakció mennyisé-
gének változását vizsgáltam meg, a hőkezelési idő függvényében. A 0,5 ml hő-
kezelt mintából képződött és 100 ml desztillált vízben felfogott frakció 400 nm-en
1 cm-es küvettában mért extinkcióját a 4. sz. diagramon ábrázoltam.

2. sz. ábra
A glükóz-karamell nagy-
mólsúlyú frakciójának
elválasztása Sephadex
G 50 oszlopon



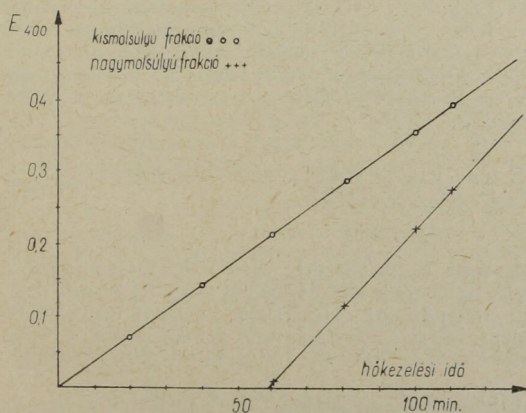
Az eredmények azt mutatják, hogy a keletkező színanyagok mennyisége a
hőkezelési idő függvényében, a vizsgált tartományban lineárisan változik. Amíg
azonban a kismólsúlyú frakció mennyisége az időtengely 0-pontjába extrapolál-
ható, a nagymólsúlyú frakció mennyiségét megadó extinkció a 60 percnél már nul-
la. Ez a megállapítás tipikus lépcsőzetes reakció képét adja, amely szerint fel-

tételezhető, hogy a kismólsúlyú frakció, mely a nagymólsúlyú frakció intermedierje, a vizsgált körülmények között indukciós periódus nélkül képződik. Ebből egy lassabb reakcióban (melynek észlelhető indukciós periódusa van) épül fel a nagymólsúlyú színanyag.



3. sz. ábra
Glükózkaramell elválasztása Sephadex G 25 és G 50-ből készített rétegezett oszlopon

Az a tény, hogy a nagymólsúlyú színanyag oldatának bepárlásakor ismét keletkezett kismólsúlyú komponens, a nagymólsúlyú színanyag felépülésénél feltételezett kondenzációs reakciót – amely megfelelő körülmények között megfordítható – még valószínűbbé teszi.



4. sz. ábra.
Glükózkaramell Sephadex G 25-ön kapott kis- és nagymólsúlyú frakciójának változása a hőkezelési idő függvényében

A következő feladat a barna színanyag megtalált intermedierjének és a belőle felépült nagymólsúlyú komponensnek izolálása, amelyek tiszta formában a színanyag szerkezetének megállapításához az eddiginél biztosabb segítséget nyújthatnak.

- [1] Beckley, V. A.: J. Agr. Sci. 11, 66, 1921.
- [2] Pavlas, P.—Melounova, O.: Listy Cukrovar. 73, 177, 1957.
- [3] Pictet, A.—Andrionoff, N.: Helv. Chim. Acta 7, 703, 1924.
- [4] Leuck, G. J.: U. S. szabadalom. 2375546 (1945). Ref. CA. 39, 4508, 1945.
- [5] Sweitzer, A.: Tijdschr. Algem. Tech. Ve. Beet Wortel suikerfabr. Raffinadeurs, 33, 17, 1937. Ref. CA. 31, 8979, 1937.
- [6] Bérés T.—Maczelka L.: Élelmzési Ipar. 10, 72, 1956.
- [7] Suzuki, H.—Mulai, K.: Research Repts. Institute Technology, Ferm. Res. Inst. (Japan) 77, 1957, Ref. CA. 52, 13294, 1958
- [8] Poljacsenko, M. M.—Baratonov, M. I.: Izv. Vis. Uceb. Zav. Pisch. Techn. 5, 52, 1963.
- [9] Underwood, C. O.—mkt.: J. Food Sci. 26, 397, 1961.
- [10] Pospisil, F.: Rostlinná Výroba, 8, 171, 1964. Ref. CA. 65, 17643, 1966.
- [11] Binkley, W. W.: Int. Sugar J. 62, 187, 1960.
- [12] Szmirnov, V. A.: Trudy Leningrad. Tekhnol. Inst. Pishchevoj. Prom. 12, 213, 1955.
- [13] Gross, D.: Degradation des sucres C. R. 10, Ass. CITS London. 121, 1957.
- [14] Telegdy Kováts L.—Rajky A-né: Nahrung, 2, 938, 1958.
- [15] Vestermark, A.: Naturwissenschaften. 54, 470, 1967.
- [16] Cortis-Jones, B.: Int. Sugar J. 64, 133, 1962.
- [17] Stinson, E. E.—Willits, C. O.: J. AOAC 46, 329, 1963.
- [18] Stinson, E. E.—Willits, C. O.: J. Agr. Food. Chem. 13, 294, 1965.
- [19] Kishkovskii, Z. N.—mkt.: Prikl. Biokhim. i Mikrobiol. 2, 447, 1966.
- [20] Rother, H.: Deutsch. Lebensm. Rundschau. 62, 108, 1966.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КАРАМЕЛЬНОГО ОКРАСИТЕЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА ПУТЕМ ГЕЛЕВОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Ф. Ерши,

После элюации дистиллированной водой на колонне Сефадекса Г 25, коричневое окрасительное вещество, образованное в 0,1 м растворе глюкозы после термической обработки при температуре 150°C, разделилось на две фракции, первая из которых имела высокий молекулярный вес, а вторая — низкий. При выпаривании чисто полученного водного раствора фракции высокого молекулярного веса образуется опять фракция низкого молекулярного веса.

Прямо, приближающее к количеству фракции низкого молекулярного веса может быть экстраполировано в времени 0, а компонент высокого молекулярного веса образуется только в более позднем этапе реакции.

На основе вышесказанных предлагается, что компонент высокого молекулярного веса построить из компонента низкого молекулярного веса в рамках конденсационной реакции.

FRAKTIONIERUNG VON KARAMELLFARBSTOFF VERMITTELS GELFILTRATION

F. Örsi

Eine Glucoselösung mit dem Molbruch 0,1, bei 150°C hitzebehandelt, liefert einen braunen Frabstoff, welcher an der Sephadex G 25 Säule mit dest. Wasser eluiert auf zwei Fraktionen getrennte wurde: eine Fraktion mit kleinem und eine mit grossem Molgewicht. Bei der Eindampfung der wässerigen Lösung der Fraktion mit grossem Molgewicht, entsteht die Fraktion mit kleinem Molgewicht von neuem.

Die die Menge der Fraktion mit kleinem Molgewicht annähernde Gerade kann auf den Zeitpunkt 0 extrapoliert werden, die Komponente mit grossem Molgewicht hingegen entsteht nur in einer späteren Phase der Reaktion.

Auf Grund dieser Erfahrungen kann angenommen werden, dass die Komponente mit grossem Molgewicht aus der Komponente mit kleinem Molgewicht durch eine Kondensationsreaktion aufgebaut wird.