

Metionin és glukóz közötti Maillard-reakció vizsgálata*

DWORSCHÁK ERNŐ**, ÖRSI FERENC***
TELEGDY KOVÁTS MAGDA**

Érkezett: 1974. január 18.

A metionin a legtöbb állati fehérjében limitáló aminosav. A fehérjehiány pótlására alkalmazott növényi fehérjék többségében, például élesztő- és szójafehérjében, a metionin szintén viszonylag kis mennyiségben van jelen. Az élelmiszerfehérjéket érő károsodásokat, például hőhatást, lúgos kezelést, vagy Maillard-reakciót elsősorban a limitáló aminosavak vonatkozásában érdemes megvizsgálni, mivel ezek bomlása közvetlenül befolyásolja a fehérjék táplálkozási értékét. Metioninnal kapcsolatban az ilyen jellegű vizsgálatok száma kevés, ezért határoztuk el a metionin és glukóz között hőkezelés hatására bekövetkező Maillard-reakció tanulmányozását.

A kísérleteket vizes oldatban, 0,08 M metionin koncentráció mellett, 110–130 °C hőmérsékleti és 7–10 pH intervallumban végeztük. Nagyobb hőmérsékleten a metionin és glukóz között ömledékben végbemenő reakciót *Erdey - Paulik*-féle derivatográfon tanulmányoztuk. A metionin mennyiségét az S-CH₃ csoportra jellemző nitroprusszidnátriumos színreakcióval, valamint ninhidrines alfa-aminonitrogén meghatározással fotometriánan értékeltük. A két meghatározás eredményei között lényeges különbséget nem észleltünk. Az oldatok barnulását 465 nm-en mért extinkció segítségével jellemeztük. A Maillard-reakció alkalmával keletkezett anyagok káros hatását is megvizsgáltuk egy teljes értékű fehérje szubsztrát jelenlétében, *Tetrahymena pyriformis* W protozoa törzs szaporodásának mértékével.

Első lépésként meghatároztuk azt a glukóz és metionin koncentrációt, amely mellett a barna színanyagok képződése maximális. Ez 0,08 M metionin és 0,12 M glukóz jelenlétében következik be (1. ábra). Ebben az esetben a metionin és glukóz mól aránya 2 : 3.

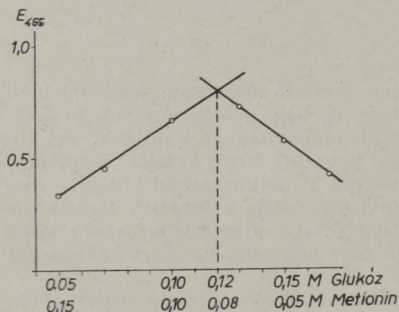
A barna színanyagok képződésének körülményeit tanulmányozva megállapítottuk, hogy az extinkció az idő logaritmusával egyenes arányban növekedett. A pH-nak nem volt befolyása a diagramon felvett egyenes iránytangensére (2. ábra), csak párhuzamosan eltolta az egyeneseket, ugyanakkor a pH csökkenésével arányosan növekvő indukciós periódus volt megfigyelhető. Amennyiben ettől a kezdeti szakasztól eltekintünk, és a későbbi egyenes szakaszt az idő tengely irányában meghosszabbítjuk, akkor az a pH csökkenésével arányosan az origótól egyre távolabb metszi az időtengelyt. Az indukciós periódus megnövekedését a savasabb tartományban azzal lehet magyarázni, hogy a szín-

* Elhangzott a KÉKI által rendezett tudományos kollokviumon 1973. december 14.

** Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet.

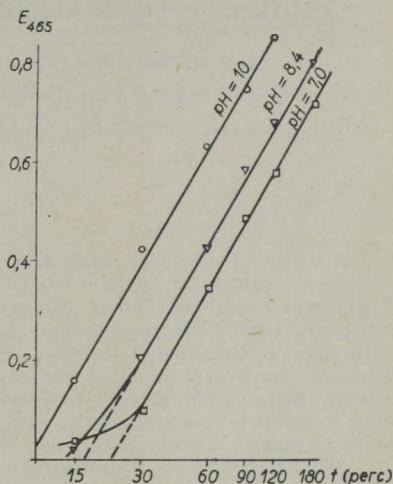
*** BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest

anyagok képződését létrehozó aldol-kondenzációs és dehidratációs folyamatok közül a pH csökkenés az előbbit gátolja és az utóbbit fokozza. Végeredményben a kevésbé lúgos pH fékezi a színyanyagok keletkezését. Amint a színyanyagok prekursorai felszaporodnak, az indukciós periódus véget ér és a színyanyag képződés megkezdődik.



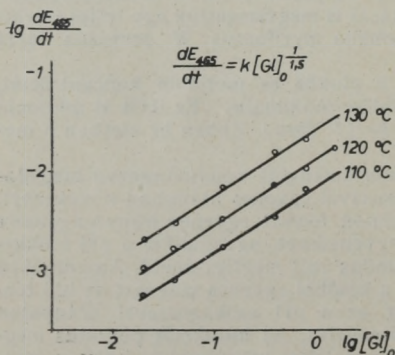
1. ábra

Glukóz és metionin koncentrációk változtatásának hatása a barna színyanyagok képződésére (130 °C 2 óra hevítés, pH = 7)



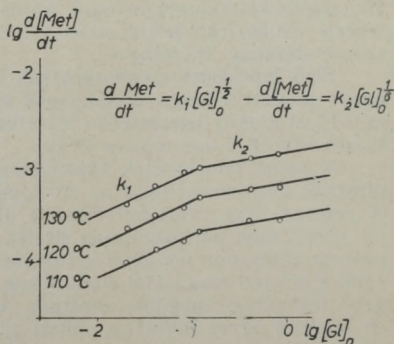
2. ábra

Barna színyanyagok képződése 0,08 M metionin + 0,12 M glukóz oldatból 130 °C-os hőkezeléskor



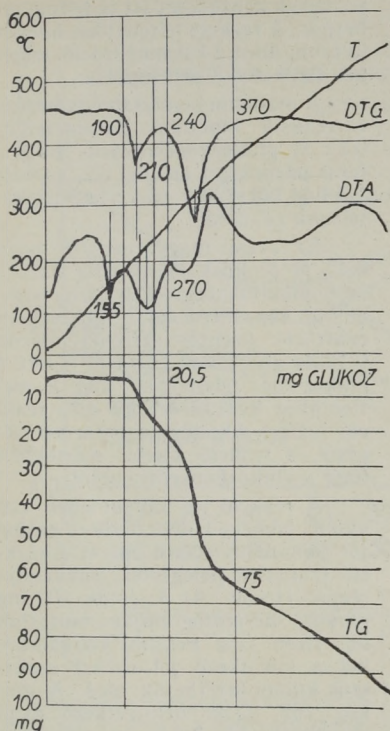
3. ábra

Barna színyanyagok képződési sebességének logaritmususa a kezdeti glukózkoncentráció logaritmusának függvényében (pH = 10)

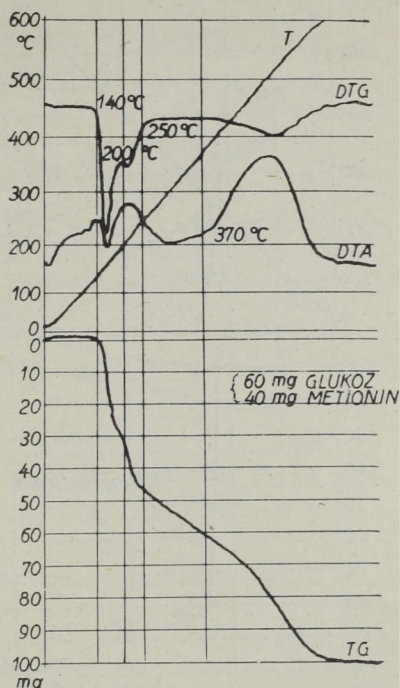


4. ábra

Metionin bomlási sebességének logaritmususa a kezdeti glukózkoncentráció logaritmusának függvényében (pH = 10)



5. ábra
Glukóz nyitott térben felvett
derivatogramja



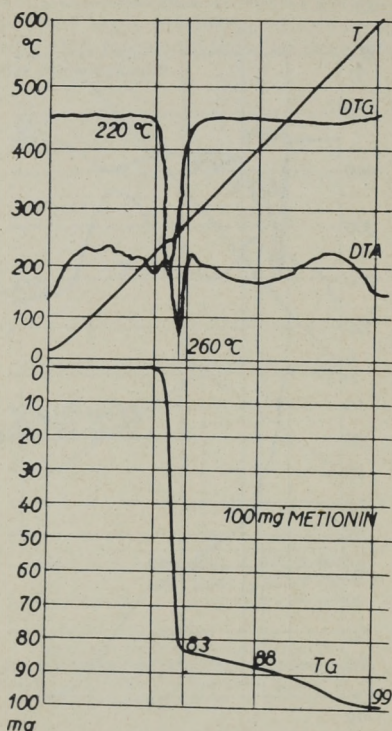
6. ábra
60 mg glukóz + 40 mg metionin nyitott
térben felvett derivatogramja

A következő egyenlet bemutatja a barnulást jellemző extinkció, a H^+ -ion koncentráció és cukorkoncentráció tényezők közötti összefüggést, amelyet a pontokhoz illesztett egyeneseknek a legkisebb négyzetek módszerével meghatározott egyenleteiből kaptunk.

$$E_{465} = 1,132 \cdot 10^8 (\lg t - 2,51 \cdot [H^+]^{0,040}) (46,50) [Gl] + 4,940) \cdot e^{-\frac{12960}{1,98 T}}$$

Az egyenletben a H^+ -ion koncentrációt tartalmazó negatív előjelű tag az indukciós periódus pH függését fejezi ki. Az egyenletből az is látható, hogy az extinkció értéke a glukóz kezdeti koncentrációval egyenes arányban változik.

Ha az indukciós periódustól eltekintünk és a barnulás, illetve a metionin bomlás kezdeti sebességének logaritmusát a kiindulási glukóz koncentráció logaritmusfüggvényében ábrázoljuk, akkor a kapott egyenesek iránytangense megadja a glukózra vonatkoztatott reakció részrendeket. Barnulás esetében (3. ábra) $1/1,5$ törtrendet találtunk, amely közel áll a glukóz karamellizációjánál kapott $1/2$ rendhez, amelynek magyarázatára a három szénatomszámú bomlás-



7. ábra

Metionin nyitott térben felvett derivatogramja

A 6. ábrán 60 mg glukóz és 40 mg metionin keverékének derivatogramját mutatjuk be. A glukóz olvadáspontja jelentősen kisebb, 140 °C-on már bekövetkezik a megolvadás és 140–200 °C között a bomlás jelentősen meggyorsul, amelyet a DTG görbe nagyobb csúcsa is mutat. A derivatogramon 200 °C felett a glukózhoz hasonló szakaszok figyelhetők meg. A különböző hőmérsékleteken gyorsan lehűtött minták elemzése alapján 200–250 °C tartományban a képződött színyanyagok oldhatatlanná válnak. Ezt 250–370 °C tartományban a színyanyagok pirólízise, majd elégeése követi, ha a vizsgálatot levegő jelenlétében végezzük.

Érdekes, hogy a metionin felesleget tartalmazó minták derivatogramján 260–280 °C tartományban megfigyelhető a metionin szublimációja is. Ezt a tiszta metioninnak a 7. ábrán bemutatott derivatogramja is alátámasztja.

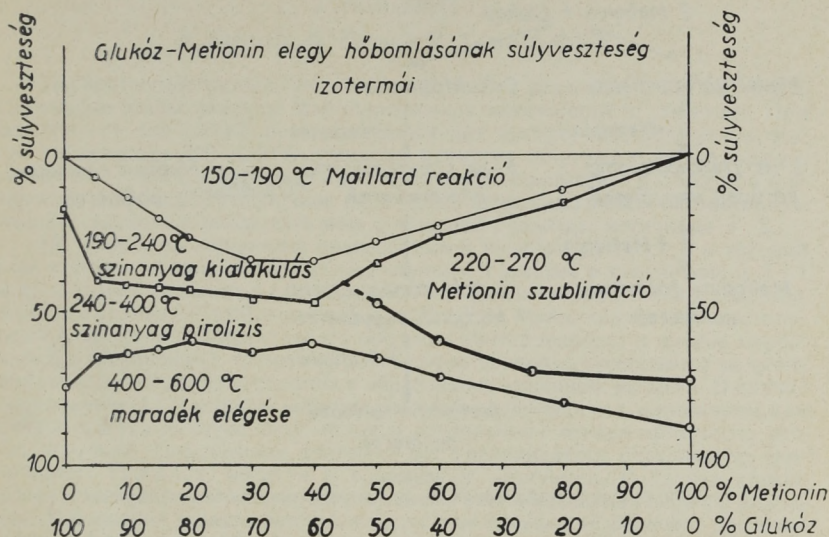
Ha különböző súlyarányú glukóz metionin elegyek derivatogramjairól az azonos hőmérsékletekhez tartozó súlyvesztéseket ábrázoljuk, a 8. ábrán bemutatott görbesereget nyerjük. Ezen ábra egyes izotermák által határolt területei a bomlás különböző lépcsőinek felelnek meg. A Maillard-reakció szempontjából leglényegesebb a 200 °C-os izoterma által meghatározott terület. Ha 200 °C-ig mért súlyvesztéset nem a 8. ábrának megfelelően az elegy súlyára, hanem

termékek képződését itt is feltételezhetjük. A reakció feltehetően bonyolultabb, mint a karamellizáció esetében (erre utal a törtrend is).

A metionin bomlásából számítva a reakció kinetikus paramétereit, 0,12 M glukózkoncentráció alatt a fenti jelenséggel analóg 1/2, e fölött 1/6-hoz közel álló reakciórendet találtunk (4. ábra).

Ez azzal magyarázható, hogy 0,12 M glukózkoncentráció alatt a metionin bomlása és a barna színyanyag képződésében a glukózkoncentráció jelentős szerepet játszik; 0,12 M glukózkoncentráció felett a glukóz már feleslegben van a metioninhoz képest és így más reakció válik sebességhatározó lépéssé, a reakció kisebb mértékben függ a glukózkoncentrációtól.

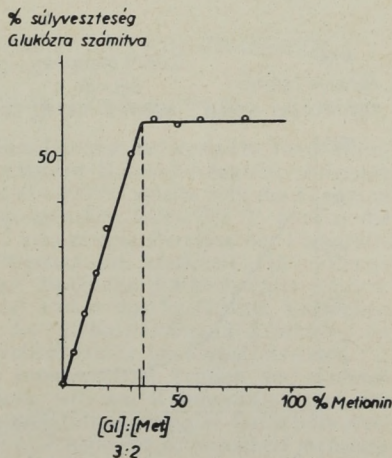
A reakció víz távollétében nagyobb hőmérsékleten derivatogramon jól tanulmányozható, mivel a reakció szakaszai jellegzetes súlyvesztéssel járnak. Az 5. ábrán 100 mg glukóz derivatogramját mutatjuk be. Ezen Őrsi korábbi vizsgálataiból a következők jól ismert szakaszok különböztethetők meg. A glukóz 165 °C-on bekövetkező megolvadását 240 °C-ig a színyanyag kialakulása, majd 300 °C-ig a színyanyag oldhatatlanná válása követi.



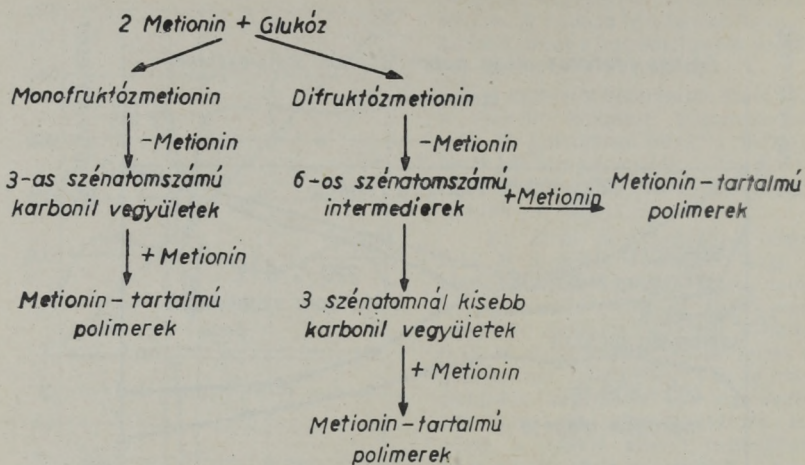
8. ábra
Glukóz + metionin elegy hőbomlásának súlyvesztéség izotermája

a glukóz mennyiségére vonatkoztatjuk (lásd 9. ábra), a metionin mennyiségével 35% eléréséig nő, majd nem változik, ami azt mutatja, hogy 35% metionint és 65% glukózt tartalmazó elegyben a metionin és glukóz optimálisan reagál, de több metionin a glukózzal reakcióba lépni nem tud, sőt 260 °C-on el is szublimál a reakcióelegyből. Ez a kapcsolódási arány jól egyezik a vizes közegben megfigyelt 3:2 optimális mól aránnyal.

A kísérletek és az irodalmi adatok alapján a metionin és glukóz Maillardreakciójának jellemző fontosabb reakciót a 10. ábrán vázoltuk fel. Ezek szerint a metionin és a glukóz közel fele részben 1:1 illetve 1:2 mól arány szerint reagál egymással. 1:1 arányú reakció esetén monofruktóz-metionin Amadori termék keletkezik. Ebből a vegyületből a metionin újból szabaddá válik,



9. ábra
A derivatográfiai vizsgálatokkal kapott, a glukózára vonatkoztatott súlyvesztéségek a glukóz + metionin súlyarányának függvényében



10. ábra

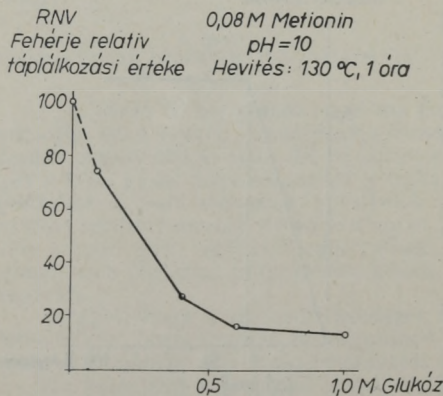
Metionin és glukóz reakciójának rendiségét megszabó fontosabb termékei

majd bonyolult lépéseken keresztül többségükben triózok és egyéb három szénatomszámú karbonil vegyületek (pl. metilglioxál) keletkeznek. A cukorhasadási termékek részben újra reagálnak az aminosavval, részben aldol-kondenzációs és dehidratációs lépéseken keresztül barna polimer színanyagok keletkeznek.

A glukóz egy része difruktózmationinná alakul. A kinetikus vizsgálatok eredményei alapján a reakciósor további lépései annyiban térhetnek el az előzőtől, hogy egyrészt nagyobb számú, a metioninnal reagáló intermedierek, illetve a triózoknál kisebb szénatomszámú karbonil vegyületek jelenlétét kell feltételeznünk.

A metionin és glukóz közti reakció bomlástermékei a glukózkoncentrációval arányos mértékben csökkentették a teljes tojásfehérje táptalajon élő protozoa szaporodását (11. ábra). A hatásért felelős vegyületek azonosítására, illetve a jelenség alaposabb tanulmányozására további vizsgálatok szükségesek.

Köszönetet mondunk Csendes Jánosnának a kísérletben nyújtott értékes technikai közreműködéséért.



11. ábra

0,08 M metionin és különböző glukózkoncentrációval előállított Maillard termékek hatása a *Tetrahymena pyriformis* W szaporodásának mértékével jellemzett fehérje táplálkozási értékre

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ МАЙЛЛАРД МЕЖДУ МЕТИОНИНОМ И ГЛЮКОЗОЙ

Э. Дворшак, Ф. Ёрши и М. Телегди-Ковач

Дериватографическими испытаниями в мясе возможно было различать следующие этапы реакции Майллард между метионином и глюкозой. При температуре 160–200°C реакция происходит быстрее чем карамелизация; при температуре 200–240°C красящие вещества становятся нерастворимыми; при 240–400°C происходит пиролиз красящих веществ; а в конце при температуре 400–600°C остаточное количество вещества сгорит. Оптимальную реакцию возможно наблюдать при отношении глюкозы: метионина 3 : 2.

На основании испытаний проведенных в водяном растворе и в твердой фазе при нагревании половина метионина и глюкозы в соотношении 1 : 1 моль, а вторая половина в соотношении 1 : 2 вступит между собой в реакцию. В первом случае по всей вероятности в реакции Майллард триозы выступающие в качестве промежуточного продукта (интермедиера) и другие карбонильные соединения с тремя числами атомов углерода ответственны за окончательное разрушение метионина и образование красящих веществ. В случае соотношения 1 : 2 моль больше интермедиера соединяются с метионином или предполагается наличие карбонильных соединений с меньше трёх числа атомов углерода. Повышением значения pH увеличивается образование коричневых красящих веществ и разрушение метионина. В случае коричневого красителя происходит эта реакция за счёт сокращения периода индукции. Повышение концентрации глюкозы при изменении значения pH в повышенной степени влияют на упомянутые процессы.

При реакции Майллард в случае глюкозы и метионина могут образоваться такие соединения, которые могут уменьшить размножение штамма протозоа *Trahymena pyriformis* W. на полноценных белках.

UNTERSUCHUNG DER MAILLARD-REAKTION ZWISCHEN METHIONIN UND GLYKOSE

E. Dworschák, F. Örsi und M. Telegdy Kováts

Mit derivatographischen Untersuchungen konnten bei der zwischen Methionin und Glykose in der Schmelze stattfindenden Maillard-Reaktion folgende Phasen unterschieden werden: zwischen 140–200 °C spielte sich die Reaktion schneller ab, als bei der Karamellbildung; zwischen 240–240 °C werden die Farbstoffe unlöslich; zwischen 240–400 °C erfolgt eine Pyrolyse der Farbstoffe und schliesslich zwischen 400–600 °C verbrennen die Stoffreste. Die optimale Reaktion kann bei dem Verhältnis Glykose: Methionin 3:2 beobachtet werden.

Nach in wässriger Lösung und fester Phase durchgeführten Versuchen reagiert die Hälfte des Methionins und der Glykose während Erhitzung im Verhältnis von 1 : 1 Mol miteinander, die andere Hälfte im Verhältnis von 1 : 2. Im ersten Falle sind wahrscheinlich die intermediären Triosen der Maillard Reaktion und andere Carbonylverbindungen mit drei Kohlenstoffatomen für die endgültige Zersetzung des Methionins und Entstehung der Farbstoffe verantwortlich. Im Falle der Molverhältnisses 1 : 2 kann die Anwesenheit mehrerer mit dem Methionin in Verbindung tretender Intermediären, bzw. der weniger als drei Kohlenstoffe enthaltenden Carbonylverbindungen angenommen werden.

Mit der Zunahme des pH, nimmt die Bildung der braunen Farbstoffe sowie die Zersetzung des Methionins zu. Im Falle der braunen Farbstoffe kann dies

durch Verkürzung der Induktionsperiode der Reaktion erklärt werden. Die Steigerung der Glykosenkonzentration beeinflusst die erwähnten Vorgänge in höherem Masse, als die pH Änderung.

Im Laufe der Maillard-Reaktion zwischen Glykose und Methionin kann mit dem Entstehen solcher Verbindungen gerechnet werden, welche die Vermehrung des Protozoenstammes *Tetrahymena pyriformis* W auf vollwertigem Eiweiss stoff verringern.

INVESTIGATION OF THE MAILLARD REACTION BETWEEN METHIONINE AND GLUCOSE

E. Dworschák, F. Örsi and M. Telegdy Kováts

By means of derivatographic investigations it was possible to distinguish the following periods in the Maillard reaction taking place between methionine and glucose in a meltphase: in the temperature range between 140 and 200 °C the reaction occurs quicker than the formation of caramel; in the range from 200 to 240 °C the colour substances turn insoluble; between 240 and 400 °C the colour substances undergo pyrolysis; and lastly in the range from 400 to 600 °C the residual substances are burnt. Optimum reaction can be observed at a glucose to methionine ratio of 3 : 2.

According to investigations carried out in an aqueous solution and in solid phase about half of the amounts of methionine and glucose are undergoing reaction with each other in a molar ratio of 1 : 1 whereas the other half in a molar ratio of 1 : 2. In the former case possibly the trioses and other C₃-carbonyl compounds present as intermediates of the Maillard reaction are responsible for the final decomposition of methionine and for the formation of the colour substances. In case of a molar ratio of 1 : 2 the presence of several intermediates or carbonyl compounds lower than C₃ which are combining with methionine can be assumed.

Both the formation of the brown colour substances and the decomposition of methionine are increasing with the rise of the pH value. In case of the brown colour substances this may be explained by the shortening of the induction period of the reaction. The rise of the glucose concentration affects the mentioned processes to a degree greater than the changes in the pH value.

In the course of the Maillard reaction between glucose and methionine the formation of compounds may be expected which reduce the multiplication of the protozoon strain *Tetrahymena pyriformis* W on complete proteins.