

Štúdium hnednutia potravín v modelovom systéme 1,4-benzochinónu a kazeínu

JÁN POKORNÝ, BEÁTA HEGEDŮŠOVÁ A NGYUEN-THIEN LUÂN

Katedra chemie a zkoušení potravín Vysoké školy chemickotechnologické v Prahe
a Výskumný ústav potravinársky v Bratislave

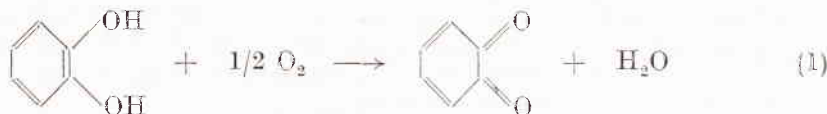
Úvod

Hnednutie potravín, najmä ovocia, zeleniny a okopanín (najmä zemiakov a cukrovej repy) sa pokladá za závažnú chybu potravinárskych výrobkov, pretože znižuje ich senzorickú kvalitu a výživnú hodnotu. Iba v niektorých prípadoch je hnednutie žiadúce, pretože pri reakciách hnednutia vznikajú senzoricky aktívne látky, napr. pri pražení kávy, kakaových bôbov alebo pri pečení chleba.

Hnednutie môže byť spôsobené enzymatickými reakciami alebo chemickými premenami (napr. kondenzáciou alebo polymerizáciou) karbonylových derivátov prítomných v potravinách. V prípade kombinácie oboch typov reakcií je možná tzv. sekundárna chemická reakcia produktov enzymatických reakcií.

Enzymatické hnednutie je spôsobené oxidáciou polyfenolových látok prítomných v potravinách, napr. katechínov, leukoantokyamidínov, antokyamidínov, flavonolov alebo derivátov kyseliny škoricovej (ako sú chlorogénové kyseliny, kyselina ferulová, kyseliny *p*-kumárové).

Reakciu katalyzujú enzýmy polyfenoloxidázy, často prísne špecifické. Pri reakcii vznikajú chinóny [1], napr.:



Niektoré polyfenoloxidázy môžu oxidovať iba *o*-dihydroxyderiváty (rad pyrokatechínov), iné aj *p*-dihydroxyderiváty (rad hydrochinénov).

Sfarbenie sa prejavuje pri chinónoch vznikajúcich podľa reakcie (1), intenzívne hnednutie však nastáva až ich sekundárnymi reakciami, predovšetkým kondenzáciou s aminokyselinami a bielkovinami. O týchto reakciách je dosiaľ málo poznatkov. Zistilo sa napr., že benzochinón reaguje s glycéinom za tvorby červeného produktu, ktorý sa ďalej rozkladá za súčasnej absorpcie kyslíka

a vznikajú intenzívne sfarbené zlúčeniny [2, 3]. Ako medziprodukt sa pravdepodobne tvorí *p*-amino-*o*-chinón. Zvlášť intenzívne sfarbené produkty vznikajú reakciami chinónov so sekundárnymi amínmi, preto prolín dáva tmavšie sfarbené produkty ako iné aminokyseliny [4].

Podobne ako s voľnými aminokyselinami môžu reagovať chinóny aj s bielkovinami [5], a to predovšetkým s ich tiolovými skupinami viazaných sírnych aminokyselín [6], pomalšie reagujú pravdepodobne aj s aminokyselinami viazaných lyzínových zvyškov [5].

Súbežne s kondenzačnou reakciou s aminokyselinami prebieha kondenzačná reakcia s neoxidovaným polyfenolovým substrátom [7], pričom sa výsledné kondenzačné produkty ľahko oxidujú vzdušným kyslíkom.

Uvedené reakcie hneďnutia polyfenolových prekursorov pozorovali napr. pri jablkách [8], broskyniach [9] a zemiakoch [10]. Podobne zružovenie a následné zhnednutie karfiolu pri mraziarskom skladovaní a konzervárskom spracovaní možno aspoň čiastočne vysvetliť oxidáciou polyfenolových zlúčenín a kondenzáciou takto vzniknutých chinónov [11].

Keďže úloha chinónov pri reakciách hneďnutia potravinárskych surovín je komplikovaná a účinná prevencia v potravinárskom priemysle je podmienená poznaním mechanizmov prebiehajúcich reakcií, študovali sme interakciu chinónu s bielkovinou v jednoduchšej modelovej sústave, pozostávajúcej z 1,4-benzochinónu a kazeínu.

Experimentálna časť

Materiál. Kazeín podľa Hammarstena (Reanal, Budapest) sme jemne rozotreli (veľkosť častíc 30—60 μ m) a 1,4-benzochinón (Reachim, Moskva) sme prečistili sublimáciou.

Pracovný postup. V 2 ml etanolu sa rozpustí 10 mg čerstvo prečisteného 1,4-benzochinónu a roztok sa zmieša s 1 g kazeínu (96 % sušiny). Rozpúšťadlo sa ihneď odstráni odparením za zníženého tlaku pri teplote maximálne 20 °C.

Pri sledovaní reakcie vo vlhkom prostredí sa kazeín nechal vopred napučať v destilovanej vode (18 hodín), prebytok vody sa odstránil a použil sa materiál obsahujúci 52% sušiny. Ďalej sa postupovalo ako pri použití suchého kazeínu. Rozdiel je v návažku: 10 mg 1,4-benzochinónu sa zmieša s 2 g vlhkého kazeínu. Zmes kazeínu a 1,4-benzochinónu sa nechá stáť v uzavretej nádobe na tmavom mieste pri + 5 °C alebo pri 25 °C. Po skončení reakcie sa zmes trikrát extrahuje metanolom (celkový objem 25 ml), určí sa spektrum extraktu, rozpúšťadlo sa odparí za zníženého tlaku pri teplote maximálne 20 °C. Zvyšok sa rozpustí v 1 ml etanolu a roztok sa použije na chromatografické určenie na tenkých vrstvách. Zvyšok po extrakcii reakčnej zmesi metanolom sa použije na reflektometrické meranie intenzity sfarbenia.

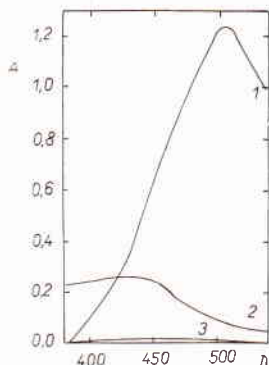
Analytické metódy. Intenzitu sfarbenia extraktu sme merali na spektrofotometri Spekol (C. Zeiss, Jena), sfarbenie nerozpustného zvyšku po extrakcii sme stanovili reflektometricky na registračnom spektrofotometri SF-14 (Leningradskoje optiko-mechaničeskoje obedinenije).

Na chromatografiu na tenkých vrstvách sme použili silikagél Silpearl (Kavalier, n. p., Votice). Nanášali sme 20 ml etanolového roztoku vzorky a vyvíjali zmesou petroléter, dietyléter a kyselina octová (50 : 48 : 2) do vzdialenosti čela 110 mm. Petroléter mal interval bodu varu 40—60 °C. Na

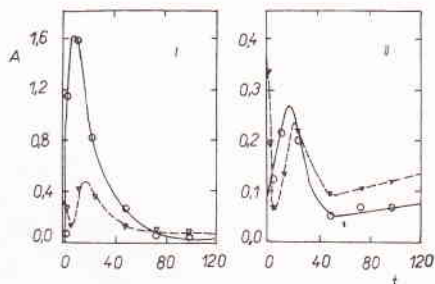
detekciu sme použili 5% etanolový roztok kyseliny molybdenofosforečnej (Lachema, n. p., Brno).

Výsledky

Z kazeínu sa metanolom prakticky nevyextrahujú žiadne farebné látky, sám 1,4-benzochinón absorbuje v intervale 400—450 nm, kým reakčné produkty 1,4-benzochinónu s kazeínom rozpustné v metanole majú intenzívnu absorpciu v červenej oblasti spektra s maximom pri 510 nm (obr. 1). Na obr. 2



Obr. 1 — Vplyv 1,4-benzochinónu na spektrum extraktu z kazeínu. A — absorbančia roztoku; λ — vlnová dĺžka v nm; 1 — roztok reakčného produktu extrahovaného metanolom zo zmesi kazeínu a 1,4-benzochinónu po dvoch hodinách reakcie pri $+5^{\circ}\text{C}$; 2 — spektrum 1,4-benzochinónu rovnakej koncentrácie ako pri 1; 3 — spektrum extraktu z kazeínu (bez prídavku benzochinónu).

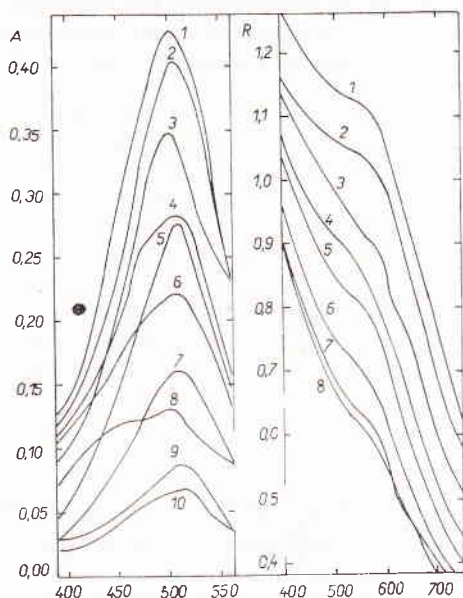


Obr. 2 — Zmeny intenzity sfarbenia pri reakcii 1,4-benzochinónu s kazeínom pri $+5^{\circ}\text{C}$. A — absorbančia metanolového roztoku (extraktu); t — čas reakcie v minútach; I — zmes obsahujúca 4% vody; II — zmes obsahujúca 48% vody; ———— vlnová dĺžka 510 nm; - - - - - vlnová dĺžka 400 nm.

je znázornený priebeh zmien sfarbenia metanolového extraktu pri reakcii za teploty $+5^{\circ}\text{C}$. Počas prvých hodín intenzita sfarbenia pri 400 nm rýchlo klesá (spôsobená najmä benzochinónom) a rastie intenzita sfarbenia pri 510—520 nm, zodpovedajúca vznikajúcemu primárnemu reakčnému produktu. Intenzita sfarbenia pri 400 nm potom opäť rastie, pretože niektoré reakčné produkty absorbujú v tejto oblasti. Pri ďalšom pôsobení 1,4-benzochinónu na kazeín však intenzita sfarbenia extraktu rýchlo klesá. Podobne prebiehali zmeny aj v prostredí s vyšším obsahom vody, iba celková intenzita sfarbenia extraktu bola nižšia.

Keďže reakčný produkt nie je jednotný, mení sa pri reakcii nielen intenzita sfarbenia, ale aj celý charakter spektra metanolového extraktu (obr. 3). Zmeny sú charakterizované najmä tým, že postupne mizne absorpcia príslušného 1,4-benzochinónu (v oblasti medzi 400 a 450 nm) a rastie intenzita maxima reakčných produktov (pri 510—520 nm). S dĺžkou reakčného času sa už značne zvyšuje podiel hnedých reakčných produktov a relatívny podiel absorpcie pri 400—450 nm opäť vzrastá. Názorne vidieť tieto zmeny na obr. 4, kde je uvedená závislosť pomeru absorbiancií od času pri 520 nm a pri 440 nm.

Rovnako menia svoj charakter reflektáčnej spektrá vyextrahovaného zvyšku (obsahujúceho kazeín), aj keď v tomto prípade nie je maximum absorpcie dost výrazné (obr. 3) a prejavuje sa len ako plató pri 580 nm. Pomer intenzít sfarbenia pri 580 nm a pri 400 nm má rovnako rýchly vzostup, ktorý sa v neskorších štádiách reakcie spomaľuje, ale hodnota tohto pomeru neklesá ako pri extrakte (obr. 4).

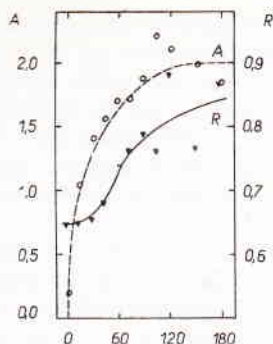


Obr. 3 — Zmeny spektra pri reakcii 1,4-benzochinónu s kazeínom pri 25 °C. *A* — absorbanca extraktu; λ — vlnová dĺžka v nm; *R* — reflektometrické stanovenie intenzity sfarbenia vyextrahovaného materiálu; I — metanolové extrakty po reakčnom čase: 1 — 75 min; 2 — 60 min; 3 — 90 min; 4 — 45 min; 5 — 105 min; 7 — 30 min; 8 — 120 min; 8 — 15 min; 9 — 150 min; 10 — 180 min; II — vyextrahovaný zvyšok po reakčnom čase: 1 — 180 min; 2 — 120 min; 3 — 90 min; 4 — 75 min; 5 — 60 min; 6 — 15 min; 7 — 30 min.

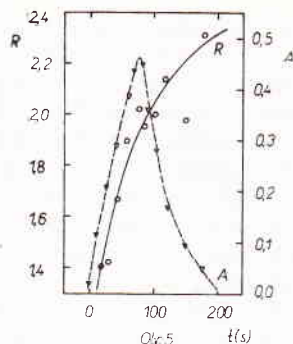
Priebeh zmeny intenzity sfarbenia pri reakcii 1,4-benzochinónu s kazeínom pri teplote 25 °C je na obr. 5. Intenzita sfarbenia rozpustných produktov rýchlo vzrastala k maximum a opäť klesala, zatiaľ čo intenzita sfarbenia nerozpustných látok sa v celom sledovanom časovom intervale zvyšovala.

Rozpustné reakčné produkty 1,4-benzochinónu s kazeínom sme rozdelili chromatograficky na tenkej vrstve silikagélú (obr. 6). Chromatogram sa skladal z dvoch častí, a to zo skupiny menej polárnych bezfarebných zložiek a zo skupiny polárnejších farebných zložiek. Najviac farebných reakčných produktov bolo v extrakte získanom po krátkom reakčnom čase (5–30 minút), po ďalšej reakcii tieto produkty pozvoľna mizli.

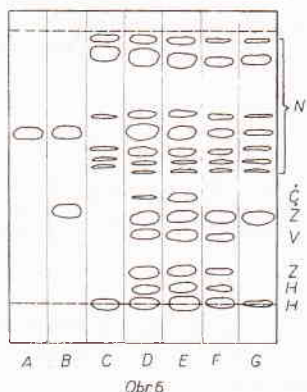
Keďže skupinu bezfarebných produktov (R_F -hodnoty medzi 0,5 a 0,95) sme získali extrakciou z reakčných zmesí a z kazeínu, ku ktorému sme nepridali 1,4-benzochinón, na ďalšie pokusy sme preto kazeín pozbavili všetkých rozpustných látok prečistením desaťnásobnou extrakciou zmesou metanolu



Obr. 4 — Zmeny charakteru spektra pri reakcii 1,4-benzochinónu s kazeínom pri 25 °C. A — pomer absorbie metanolového extraktu pri 520 a 440 nm $A_{520} : A_{440}$; R — pomer intenzity sfarbenia nerozpustného zvyšku $R_{550} : R_{440}$; t — čas reakcie pri 25 °C v minútach.

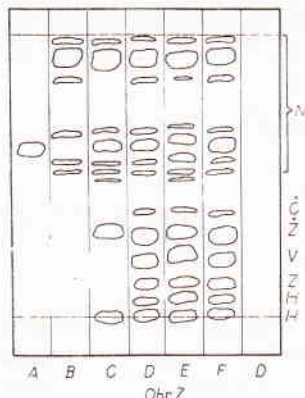


Obr. 5 — Priebeh reakcie medzi kazeínom a 1,4-benzochinónom pri 25 °C. R — reflektometrické meranie pri 580 nm; A — absorbanca extraktu pri 510 nm; t — čas reakcie v minútach.



Obr. 6

Obr. 6 — Delenie reakčných produktov 1,4-benzochinónu s kazeínom na tenkej vrstve silikagélú. A — 1,4-benzochinón čistý; B — 1,4-benzochinón čiastočne polymerizovaný stáťím pri 25 °C; C — metanolový extrakt z kazeínu (bezfarebný); metanolové extrakty z reakčnej zmesi kazeínu s 1,4-benzochinónom po reakčnom čase: D — 5 min; E — 30 min; F — 3 hodiny; G — 24 hodín. Farba škvŕn (bez detekcie): N — bezfarebné; $Č$ — červená; $Ž$ — žltá; V — fialová; Z — žltohnedá; H — hnedá.



Obr. 7

Obr. 7 — Vplyv nízkomolekulových kontaminantov kazeínu na reakciu s 1,4-benzochinónom pri 25 °C. A — 1,4-benzochinón; B — metanolový extrakt z kazeínu podľa Hammarstena; C — metanolový extrakt z kazeínu po 30-min. reakcii s 1,4-benzochinónom; D — extrakt z pôvodného kazeínu po 90-min. reakcii s 1,4-benzochinónom; E — metanolový extrakt zo zmesi 1,4-benzochinónu s extrahovaným kazeínom po 30-min. reakcii; F — metanolový extrakt zo zmesi 1,4-benzochinónu s extrahovaným kazeínom po 90-min. extrakcii; G — kontrola bez chinónu (nijaké detegovateľné škvŕny); farba škvŕn: N — bezfarebná; $Č$ — červená; $Ž$ — žltá; V — fialová; Z — žltohnedá; H — hnedá.

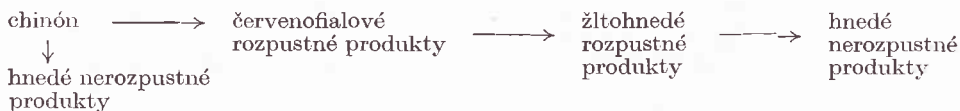
a chloroformu (1 : 1). Takýto kazeín extrakciou metanolom už nedával roztoky s pozitívnou reakciou s kyselinou molybdenofosforečnou pri chromatografickej analýze na tenkej vrstve ani pri použití desaťnásobného množstva extraktu, ako vidieť na obr. 7. Pôsobením 1,4-benzochinónu sa však aj pri tomto kazeíne utvorila skupina bezfarebných škvŕn s hodnotami R_F 0,5—0,85 analogicky ako pri pôvodnom kazeíne. Vzorky extrahovaného kazeínu však boli po reakcii za inak rovnakých podmienok zreteľne intenzívnejšie sfarbené ako vzorky pripravené z pôvodného kazeínu.

Extrakt zmesi 1,4-benzochinónu s kazeínom prečisteným extrakciou metanolom boli podstatne svetlejšie ako extrakt z neprečisteného kazeínu. Mnohonásobná extrakcia pri prečisťovaní kazeínu má pravdepodobne vplyv na zmeny konformácie kazeínu, a uľahčuje tak reakcie vedúce k tvorbe nerozpustných farebných látok.

Diskusia

Chinóny reagujú s aminokyselinami, peptidmi a bielkovinami relatívne veľmi rýchlo, takže sa v potravinách pravdepodobne voľne nahromadia, alebo sa môžu postupne nahromadiť ich reakčné produkty. Ako primárny produkt vzniká červeno sfarbená zlúčenina (obr. 1), podobne ako zlúčenina vznikajúca pri reakcii 1,4-benzochinónu s lyzínom [12]. Tento produkt však rýchlo reaguje ďalej podobne ako pri reakcii aminoderivátov s alifatickými aldehydmi [13]. Tieto sekundárne premeny sa prejavujú zmenami spektra extraktu (obr. 3 a obr. 4).

Reakčný mechanizmus

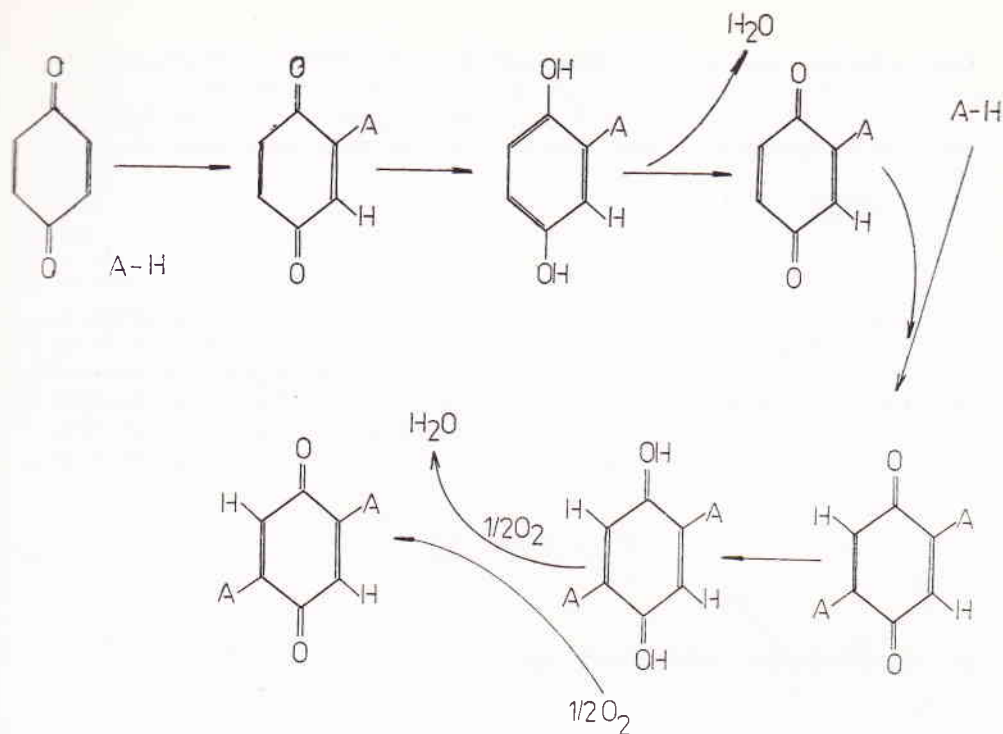


potvrdzujú aj chromatogramy na obr. 6, ktorými sa okrem 1,4-benzochinónu a jeho kondenzačného produktu dokázali ešte najmenej štyri ďalšie farebné zložky, z ktorých hnedé produkty sú pravdepodobne oligoméry.

Tieto nízkomolekulové rozpustné kondenzačné produkty prechádzajú potom postupne na nerozpustné vysokomolekulové hnedé látky, ktoré spôsobujú hnednutie vyextrahovaného materiálu. Preto intenzita sfarbenia rozpustného extraktu po dosiahnutí maxima rýchlo klesá (obr. 2 a 5), zatiaľ čo intenzita sfarbenia nerozpustného podielu sa s rastom reakčného času stále zvyšuje (obr. 5). Podobný jav sme pozorovali aj pri reakcii štruktúrne príbuzného diacetylu s glycínom [14].

Keďže nerozpustný podiel hnedne už od začiatku reakcie, možno predpokladať, že sa nerozpustné produkty môžu tvoriť aj priamo, napr. viazaním chinónu na molekulu bielkoviny.

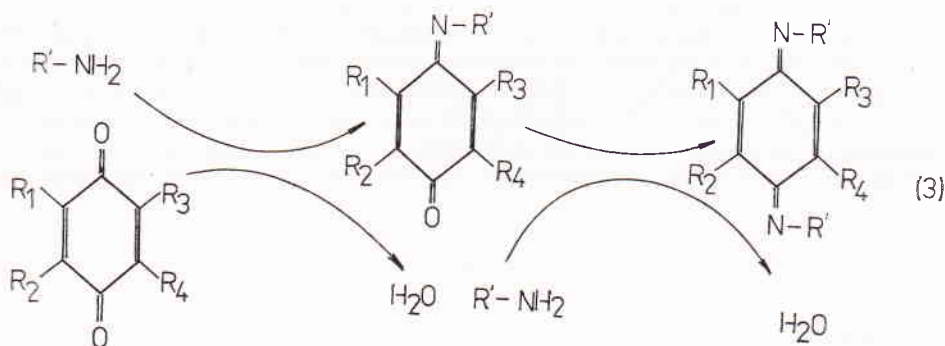
Chinóny môžu za sledovaných reakčných podmienok reagovať s bielkovinou alebo s voľnými aminokyselinami tromi spôsobmi, a to predovšetkým podľa schémy:



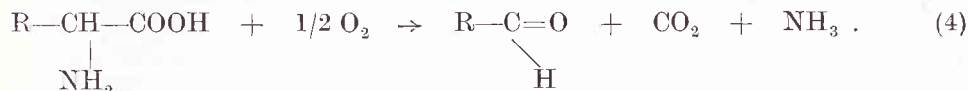
kde A—H je molekula aminokyseliny (voľnej, prípadne aj viazanej v peptidovom reťazci, predovšetkým ako koncová aminokyselina). V každom reakčnom stupni nasleduje po kondenzácii oxidácia. Nevyhnutnosť prístupu kyslíka na vznik intenzívneho sfarbenia sledovali aj iní autori [2, 3]. Kyslík má vplyv aj na mechanizmus kondenzácie glyoxalu s glycinom [15].

Okrem reakcie s aminovou skupinou môžu chinóny analogicky reagovať aj s tiolovou skupinou sírnych aminokyselín [6].

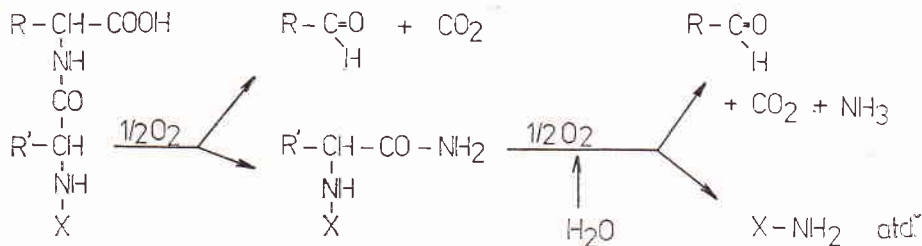
Reakcia [2] pravdepodobne neprebíha pri plne substituovaných chinónoch, ako napr. pri chinoidných oxidačných produktoch α -tokoferolov, kde sa môže uplatniť jedine priama tvorba chinimínových derivátov [16]:



Iná možnosť reakčného mechanizmu je Streckerovo odbúravanie [17], ktoré môže všeobecne prebiehať pôsobením zlúčenín so vzorcom $R-CO-(CH=CH)-CO-R'$ [18, 19], teda i v prípade chinónov. Z aminokyselín vzniká týmito reakciami kyslíčnik uhličitý, amoniak a aldehyd



Chinóny sa pri týchto procesoch redukujú. Vznikajúce aldehydy a amoniak sa potom môžu zúčastňovať na rôznych kondenzačných reakciách a zvyšovať tak intenzitu hnednutia. Podľa mechanizmu [4] môžu reagovať aj koncové aminokyseliny peptidických reťazcov [5], a nie je vylúčená ani možnosť roztrhnutia reťazca. O možnosti štiepenia peptidických reťazcov svedčí chromatogram na obr. 7, kde je dokázaný vznik bezfarebných, v metanole rozpustných zlúčenín pri reakcii 1,4-benzochinónu s kazeínom.



Napokon tretou možnosťou sú polymerizačné a polykondenzačné reakcie chinónov, ktorými takisto vznikajú ako konečné produkty nerozpustné hnedé makromolekulové látky. Vzhľadom na pomerne nízku koncentráciu chinónov a na ich rozptýlenie v materiáli, zvyčajne bohatom (aspoň relatívne) na aminokyseliny a bielkoviny, sú však tieto reakcie chinónov medzi sebou menej významné.

Záver

Z polyfenolických látok vznikajú v potravinách enzymatickou oxidáciou chinóny, ktoré môžu ľahko reagovať s prítomnými aminokyselinami a bielkovinami, ako sa to dokázalo v modelových zmesiach 1,4-benzochinónu a kazeínu. Najprv rýchlo vznikajú červenofialové rozpustné produkty, ktoré prechádzajú na hnedé rozpustné látky a potom ďalšími reakciami na hnedé nerozpustné makromolekulové látky. Nerozpustné produkty sa môžu tvoriť aj priamymi reakciami. Z proteínov sa pri týchto reakciách tvoria farebné, ako aj bezfarebné málo polárne nízkomolekulové látky, pravdepodobne reakciami podobnými Streckerovmu odbúravaniu.

Literatúra

1. NELSON, J. M. — DAWSON, C. R.: *Advan. Enzymol.*, 4, 1944, s. 99.
2. BEEVERS, H. — JAMES, W. O.: *Biochem. J.*, 43, 1948, s. 636.

3. JAMES, W. O. — ROBERTS, E. A. H. — BEEVERS, H. — DeKOSK, P. C.: *Biochem. J.*, **43**, 1948, s. 626.
4. JACKSON, H. — KENDAL, L. P.: *Biochem. J.*, **44**, 1949, s. 477.
5. MASON, H. S.: *Nature (London)*, **175**, 1955, s. 771.
6. MASON, H. S. — PETERSON, E. W.: *Biochim. biophys. Acta*, **111**, 1965, s. 134.
7. HATHAWAY, D. E. — SEAKIS, J. W. T.: *J. Chem. Soc. (London)*, 1957, s. 1562.
8. HARD, E. — MAYER, A. M. SHAIN, Y.: *J. Sci. Fd Agr.*, **17**, 1966, s. 389.
9. LUH, B. S. — LEONARD, S. J. — PATEL, D. S.: *Fd Technol.*, **14**, 1960, s. 53.
10. MONDY, N. I. — GEDDE-DAHL, S. B. — MOBLEY, E. O.: *J. Fd Sci.*, **31**, 1966, s. 157.
11. POKORNÝ, J. — HOŠKOVÁ, J. — KYZLINK, V.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch. (v tlači)*.
12. POKORNÝ, J. — LUAN, N. T. — JANÍČEK, G.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch. (v tlači)*.
13. JANÍČEK, G. a POKORNÝ, J.: *Lebensm. Unters.-Forsch.*, **145**, 1971, s. 142.
14. POKORNÝ, J. — CÔN, N. H. — JANÍČEK, G.: *Sb. VŠCHT, Praha, E 39*, 1973, s. 21.
15. VELÍŠEK, J. — DAVIDEK, J. — POKORNÝ, J. — KLEIN, S. — JANÍČEK, G.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **149**, 1973, s. 69.
16. POKORNÝ, J. — LUAN, N. T. — JANÍČEK, G.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **152**, 1973, s. 65.
17. NEUBERG, C. — KOBEL, M.: *Biochem. Z.*, **185**, 1927, s. 477.
18. SCHÖNBERG, A. — MOUBACHER, R.: *Chem. Rev.*, **50**, 1952, s. 261.
19. SCHÖNBERG, A. — MOUBACHER, R. — MOSTAFA, A.: *J. Chem. Soc. (London)*, 1948, s. 176.

Исследование приобретения коричневой окраски пищевых продуктов в модельной системе 1,4-бензохинона и казеина

Выводы

Из полифеноловых веществ образуются в пищевых продуктах с помощью энзимного окисления хиноны, легко реагирующие с присутствующими аминокислотами и белками, как это было доказано в модельных смесях 1,4-бензохинона и казеина. Сперва быстро образуются краснофиолетовые растворимые продукты переходящие затем в коричневые растворимые а потом следующими реакциями в коричневые нерастворимые высокомолекулярные вещества. Нерастворимые продукты могут образоваться непосредственными реакциями. Из протеинов образуются во время этих реакций разноцветные и бесцветные слабо полярные низкомолекулярные вещества, вероятно с помощью реакций, похожих на распад Штрекера.

Food browning study in one 1,4-benzoquinone and casein model system

Summary

Quinines created from polyphenolic substances in foods by means of the enzymatic oxidation, are able to react with present aminoacids and proteins, as it was proved in model mixtures 1,4-benzochinone and casein. Redviolet soluble products are firstly quickly created, which further change in brown soluble products and than in further reactions on brown insoluble macromolecular substances. Insoluble products can be produced in direct reactions. Coloured and uncoloured few polar lowmolecular substances are created from the protein in this reactions, probably by reactions which are similar to the Strecker decomposition.