

A raffinóztartalom meghatározása melaszokban*

POLACSEKNÉ RÁCZ MÁRIA, SZÉP IVÁNNÉ**, VAMOSNÉ
VIGYÁZÓ LILLY

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1981. április 2.

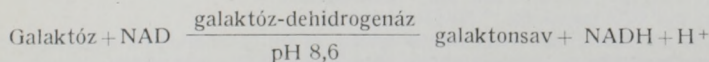
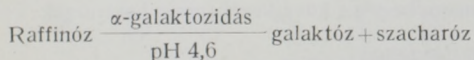
Enzimes analitikai módszert dolgoztunk ki a melaszok raffinóztartalmának meghatározására. Mivel a melaszok nagy mennyiségű szacharóz (kb. 50%) mellett kevés (1% alatti) raffinózt tartalmaznak, a raffinóz specifikus meghatározását a galaktóz-tartalom mérése alapján abból számítva végeztük.

A kidolgozott módszerrel megvizsgáltuk az 1980-as cukorrépa-feldolgozási idény kezdetén a 12 hazai cukorgyárból beérkezett melasz-mintákat és az eredményeket matematikai-statisztikai módszerekkel értékeltük.

Anyagok és módszerek

A módszer elve:

A raffinóz glükóz, fruktóz és galaktóz cukoregységekből álló triszacharid. Savas hidrolízis hatására az alkotó monoszacharidokra bomlik. Enzimes hidrolízis esetén α -galaktozidázzal bontva galaktózra és szacharózra, invertázzal (β -fruktofuranozidázzal) bontva pedig fruktózra és melibiózra bomlik. Enzimes mennyiségi meghatározása melaszokban csak a galaktóz lehasításával lehetséges, mivel a melasz mintegy 50% szacharózt tartalmaz és az invertázos bontásnál ez is elbomlik glükózra és fruktózra. A raffinóz olyan kis mennyiségben fordul csak elő a melaszban (1% alatt), hogy a fruktóz-tartalom ebből származó növekedése a szacharózból származó fruktóz mellett nem mérhető. Ezért a Boehringer cég metodikai gyűjteménye alapján (1) a galaktóz lehasításával határoztuk meg a melaszok raffinóztartalmát.



* Elhangzott a MÉTE Mikrobiológiai Szakosztálya Kémiai Mikrobiológiai Munkabizottságának 1981. március 10-i előadóján.

** Szeszipari Kutatóintézet, Budapest

A képződött redukált NAD (nikotin-adenin-dinukleotid) egyenértékű a jelenlevő galaktóz mennyiségével, és éles abszorpciós maximuma van 340 nm-en és 365 nm-en. Ennek alapján mennyisége spektrofotometriásan meghatározható és ebből a raffinóztartalom kiszámítható.

A melaszoldat készítése:

5 g melaszt 50 cm³ 60 °C desztillált vízben mágneses keverővel oldunk. Az oldatot 1–1 cm³ Carrez I és Carrez II oldattal derítjük, majd lehűlés után 100 cm³-re feltöltjük és szűrőpapíron szűrjük. A szűrletből határozzuk meg a raffinóztartalmat.

A meghatározáshoz felhasznált oldatok készítése:

1. *Carrez I-oldat:* 30%-os vizes ZnSO₄ · 7 H₂O-oldat
2. *Carrez II-oldat:* 15%-os vizes K₄Fe (CN)₆ · 3H₂O-oldat
3. *Acetát-puffer, pH 4,6; 0,675 mol dm⁻³:*
92 mg CH₃COONa · 3 H₂O-t és 6,75 cm³ 0,1 mol dm⁻³ ecetsavat oldunk desztillált vízben 20 cm³ végtérfogatban. Az oldat szobahőmérsékleten legalább 4 hétig stabil.
4. *Trisz-puffer 0,75 mol dm⁻³; pH 8,6:*
9 g trisz-(hidroximetil)-aminometánt oldunk 70 cm³ desztillált vízben, 12 cm³, 1 mol dm⁻³ koncentrációjú HCl-val beállítjuk a pH-t 8,6-ra és az oldatot desztillált vízzel feltöltjük 100 cm³-re.
Az oldat +4 °C-on 1 évig stabil.
5. *NAD-oldat, 14 mmol dm⁻³:*
60 mg NAD-ot (nikotinamid-adenin-dinukleotid) oldunk 6 cm³ desztillált vízben.
Az oldat +4 °C-on 4 hétig stabil.
6. *α-galaktózidáz:* 5 mg cm⁻³ koncentrációjú szuszpenzió (Boehringer Mannheim GmbH, NSZK gyártmányú), hígítatlanul kell használni.
7. *Galaktóz-dehidrogenáz:* 5 mg cm⁻³ koncentrációjú szuszpenzió (Boehringer Mannheim GmbH, NSZK gyártmányú), hígítatlanul kell használni.

A meghatározás menete a következő:

0,2 cm³ derített melasz-oldatot +
0,2 cm³ pH 4,6, 0,675 mol dm⁻³ acetátpuffert és
0,02 cm³ α-galaktózidázt

jól összekeverve szobahőmérsékleten állni hagyunk, legalább egy órán keresztül. Ezalatt a raffinóz elbomlik galaktózzra és szacharózra.

A keletkezett galaktóz mennyiségét a következőképpen határozzuk meg a fenti reakcióelegyben:

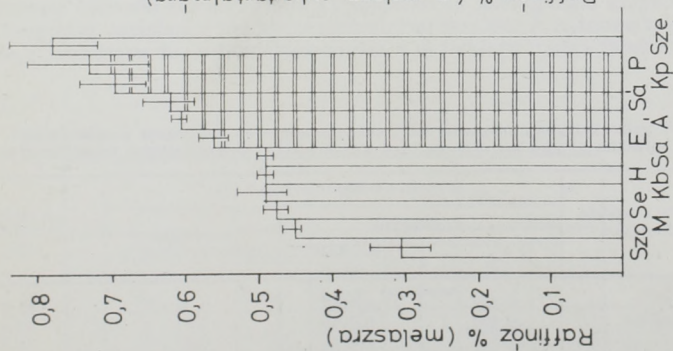
1,00 cm³ pH 8,6, 0,85 mol dm⁻³ trisz-puffert +
0,1 cm³ 0,14 mmol dm⁻³ NAD-oldatot és

1,50 cm³ desztillált vizet adunk hozzá, és jól összekeverve, desztillált vízzel szemben lemérjük az alap-extinkciót (E₁). Végül 0,02 cm³ galaktóz-dehidrogenáz enzimsuszpenziót adva hozzá, megindítjuk a reakciót és a reakcióidő eltelté, azaz az extinkció állandósulása után újból lemérjük az extinkciót (E₂). Az extinkció állandósulásához szükséges idő galaktóz, illetve raffinóz-pentahidrát modell-oldatok esetében 30 min. melaszok esetében azonban 2 h.

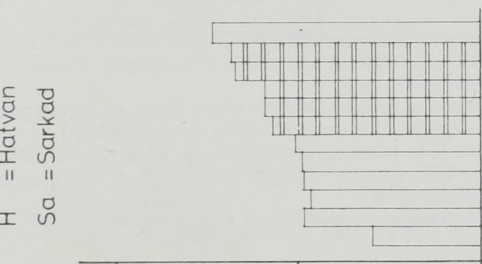
A *vakpróba* ugyanúgy készül, mint a minták, csak melasz-oldat helyett 0,2 cm³ desztillált vizet tartalmaz.

E = Ercsi
 Á = Ács
 Sá = Sárvár
 Kp = Kaposvár
 P = Petőháza
 Sze = Szerencs

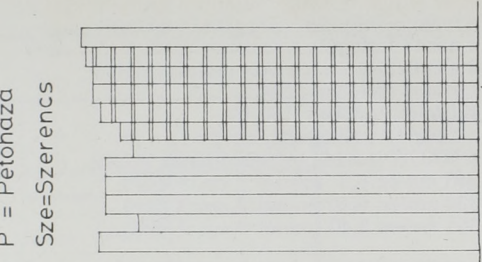
Szo = Szolnok
 M = Mezőhegyes
 Se = Selyp
 Kb = Kaba
 H = Hatvan
 Sa = Sarkad



Raffinóz % (a melsz cukortartalmára)



Cukortartalom % (a melszra)



Szo Se H E Á Sá P
 M Kb Sa A Kp Sze

Szo Se H E Á Sá P
 M Kb Sa A Kp Sze

A cukorgyár neve

A minták és a vakpróba extinkcióinak különbségéből a galaktóz-tartalmat a következőképpen számítjuk ki:

$$\Delta E \text{ minta} = (E_2 - E_1)_{\text{minta}} - (E_2 - E_1)_{\text{vakpróba}}$$

$$\text{cukorkoncentráció g dm}^{-3} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

ahol

- V = a reakcióelegy össztérfogata (3,04 cm³)
 v = a minta térfogata a reakcióelegyben (0,2 cm³)
 MG = a meghatározandó cukor molekulasúlya:
 raffinóz esetében 504,5,
 galaktóz esetében 180,16
 d = a kűvetta vastagsága, cm (= 1)
 ε = a NADH moláris extinkciójának értéke
 340 nm-en 6,3 (mmol⁻¹ cm⁻¹ dm³)
 334 nm-en 6,10 (mmol⁻¹ cm⁻¹ dm³)
 365 nm-en 3,40 (mmol⁻¹ cm⁻¹ dm³)

Raffinóz esetében, az állandók összevonása után:

$$\text{raffinóz g dm}^{-3} = 340 \text{ nm-en } 1,2171 \Delta E$$

$$365 \text{ nm-en } 2,2553 \Delta E$$

Ha a minta raffinóz-koncentrációja kisebb, mint 0,05 mg cm⁻³, akkor a reakcióelegyben a minta térfogatát 1,0 cm³-ig növelhetjük, a desztillált víz hozzáadásának egyidejű csökkentése mellett.

Amennyiben a melasz-oldatok elkészítését és az enzimreakciókat 1 nap alatt nem tudjuk elvégezni, a meghatározás megszakítható az α-galaktózidázos bontás után. Ugyanazt az eredményt kapjuk, ha az α-galaktózidázos bontásra nem 1 h állásidőt hagyunk, hanem másnap folytatjuk a keletkezett galaktóz mennyiségének meghatározását.

A módszer nagyon érzékeny, a méréstartomány: 0,05–1,5 mg cm⁻³ raffinóz.

Eredmények és következtetések

Az egyes cukorgyárak melaszainak raffinóztartalmát növekvő sorrendben az 1. táblázat mutatja. A táblázat tartalmazza ezenkívül a melaszok polarimetrlással meghatározott cukortartalmát és a raffinóztartalmat a cukortartalom %-ában.

1. táblázat

Melaszok polarimetriásan meghatározott cukortartalma és enzimesen meghatározott raffinóz tartalma a) a melasz súlyára, b) a polarimetriás cukortartalomra vonatkoztatva

A melasz eredete (cukorgyár)	A melasz raffinóztartalma (%)			A melasz cukortartalma (%)
	a melaszra		a melasz cukortartalmára	
	\bar{x}	s		
Szolnok	0,305	0,0404	0,59	51,8
Mezőhegyes	0,450	0,0140	0,97	46,4
Selyp	0,477	0,0111	0,93	51,2
Kába	0,491	0,0358	0,96	51,2
Hatvan	0,492	0,00625	0,97	50,8
Sárkad	0,492	0,0072	1,05	46,8
Ercsi	0,561	0,0161	1,14	49,0
Ács	0,606	0,00846	1,18	51,4
Sárvár	0,623	0,0324	1,18	52,6
Kaposvár	0,695	0,0460	1,33	52,4
Petőháza	0,728	0,0804	1,36	53,2
Szerencs	0,777	0,0605	1,46	53,4

\bar{x} = a meghatározások átlaga; s = a szórás; n = a párhuzamos adatok száma = 4

A különböző eredetű melaszok raffinóztartalmának összehasonlítása a variancia-analízis alapján:

A

	Szo	M	Se	Kb	H
M	0,145				
Se	0,172	0,027			
Kb	0,186	0,041	0,014		
H	0,187	0,042	0,015	0,001	
Sa	0,187	0,042	0,015	0,001	0,000

SzD = 0,03486 (P = 5%)
 0,047808 (P = 1%)
 0,065072 (P = 0,1%)

A: a 0,5%-nál kisebb raffinóztartalmú melaszok

B: a 0,5%-nál nagyobb raffinóztartalmú melaszok

A cukorgyárak neveinek rövidítése: Szo. = Szolnok, M = Mezöhegyes, Se = Selyp, Kb = Kaba, H = Hatvan, Sa = Sarkad, E = Ercsi, Á = Acs, Sá = Sárvár, Kp = Kaposvár, P = Petőháza, Sze = Szerencs.

SzD = a legkisebb szignifikáns eltérés.

A *kurzív* értékek a legalább P = 5%-os szinten szignifikáns eltéréseket jelölik. (Az értékek a két-két összehasonlított átlag eltérései.)

B

	E	Á	Sá	Kp	P
Á	0,045				
Sá	0,062	0,017			
Kp	0,134	0,089	0,072		
P	0,167	0,122	0,105	0,033	
Sze	0,216	0,171	0,154	0,082	0,049

SzD = 0,07077 (P = 5%)
 0,097056 (P = 1%)
 0,132104 (P = 0,1%)

A táblázatból látható, hogy raffinóztartalom szempontjából a melaszok 2 csoportra oszthatók: az egyik csoportban a raffinóztartalom 0,5%-nál kisebb, a másikban 0,5%-nál nagyobb. Az utóbbi csoportba tartozik valamennyi dunántúli cukorgyár melasza, valamint a szerencsi melasz. A legkisebb (0,31 ± 0,04) és a legnagyobb érték (0,78 ± 0,06) hányadosa 2,5, egy-egy csoporton belül 1,6, ill. 1,4, tehát a csoportokon belül a szóródás nagyjából azonos.

A két csoport átlagértékei között az eltérés (a Student-féle *t*-próba alapján) 99,9%- valószínűségi szinten szignifikáns ($t = 9,3462$, SzF = 46). Mivel az egyes csoportokon belül a variancia a Cochran-próba szerint homogénnek bizonyult, a csoportokon belül az egyes melaszok raffinóz-tartalmát variancia-analízissel hasonlítottuk össze. Ennek eredményét a 2. táblázat tartalmazza.

A táblázat szerint a 0,5%-nál kisebb raffinóztartalmú melaszok közül a szolnokinak szignifikánsan kisebb a raffinóztartalma a többi 5 melaszénál, a mezőhegyesinek pedig a kabainál, a hatvaninál és a sarkadinál. A többi minta raffinóztartalmának eltérései hibahatáron belüliek.

A 0,5%-nál nagyobb raffinóztartalmú melaszok közül az ercsi, az ácsi és a sárvári minta raffinóztartalma nem tér el egymástól szignifikánsan, továbbá a szerencsi és a petőházi mintáé is csak hibahatáron belül tér el egymástól. A minták többségének raffinóztartalma azonban legalább $P = 5\%$ -os szinten szignifikánsan különböző.

A polarimetriásan meghatározott cukortartalomra vonatkoztatva a szerencsi melaszoknak volt a legnagyobb raffinóztartalma, 1,46%.

Látható tehát, hogy az enzimes módszer alkalmas a melaszok csekély raffinóztartalmának kielégítő pontosságú meghatározására (a variációs együttható átlaga 5,1%-nak adódott) és az egyes melaszok raffinóztartalma közötti eltérések megállapítására.

Érdekes, hogy a galaktóz-dehidrogenáz által katalizált reakció időtartama a melaszok esetében négyszeres a modell-oldatokhoz képest. Az enzimreakció elhúzódtását a melasz valamely oldódó inhibitora, esetleg a derítőoldat valamely komponense okozhatja. Ez is mutatja, hogy bonyolult biológiai rendszerek esetében az enzimes analitikai eljárások nem mindig alkalmazhatók úgy, ahogyan azokat modell-anyagokra kidolgozták. A pontos reakciókörülményeket minden egyes biológiai anyagra kísérletileg meg kell állapítani.

I R O D A L O M

(1) Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik, 1979, Boehringer Mannheim.

ОБРАЗОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА «С» В БЫСТРОЗАМОРОЖЕННОЙ ПУЛЬПЕ ИЗ ЗЕМЛЯНИКА В ТЕЧЕНИИ ЕГО ХРАНЕНИЯ

Е. Рац и А. Мартон

Авторы по двум методам ($\alpha - \alpha^1$ дипиридолиловому и тонкослойно хроматографическому методу) исследовали содержание всего витамина «С» (в том числе AS и DAS) в быстрозамороженной пульпе из земляника храненной при разных температурах и в зависимости от продолжительности хранения. Результаты полученные слоистохроматографическим методом обычно являлись лучшим. Результаты полученные в разных периодах врмени хранения, в случае применения двух разных методов, в большой степени отличались друг

от друга. Слоистохроматографическому методу обеспечивающему лучшее разделение мешающих веществ необходимо предоставить предпочтение вопреки его высокой потребности времени оценки и субъективного метода оценки.

Кроме сравнения результатов двух методов, авторы определяли изменения и скорость измерения содержания витамина «С» в быстрозамороженной пульпе земляники храненной при трех разных температурах.

BESTIMMUNG DES RAFFINOSEGEHALTES IN MELASSEN

M. P.-Rácz, I. Szép, L. V.-Vigyázó

Eine enzymatische analytische Methode wurde zur Bestimmung des Raffinosegehaltes von Melassen entwickelt. Nachdem die Melassen neben grossen Mengen (etwa 50%) von Saccharose wenig Raffinose (unter 1%) enthalten, wurde die spezifische Bestimmung der Raffinose auf Grund der Messung des Galactosegehaltes durch Berechnung durchgeführt. Die am Beginn der 1980-er Kampagne der Zuckerrübenverarbeitung von 12 ungarischen Zuckerfabriken eingesendeten Melassemustern wurden mit der entwickelte Methode untersucht, und die Ergebnisse werden mit mathematisch-statistischen Methoden ausgewertet.

DETERMINATION OF THE RAFFINOSE CONTENT IN MOLASSES

M. P.-Rácz, I. Szép, L. V.-Vigyázó

An enzymatic analytical method was developed for the determination of the raffinose content of molasses. Since molasses contain besides great amounts (about 50%) of sucrose small percentages (below 1%) of raffinose, the specific determination of raffinose is carried out on the basis of the measurement of the galactose content, by an adequate calculation. Samples of molasses obtained at the beginning of the 1980 season of sugar-beet processing from 12 Hungarian sugar mills were investigated by the developed method, and the results are evaluated by mathematicalstatistical methods.