

CHEMICZNA OCENA PREPARATU KAROTENU OTRZYMANEGO METODĄ FERMENTACJI

Z. PAZOŁA, G. E. N. NELSON, A. CIEGLER, H. H. HALL

Centralne Laboratorium Przemysłu Koncentratów Spożywczych, Poznań.
Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois

Biologiczna wartość poszczególnych karotenów zależy od ich budowy chemicznej i przestrzennej (stereoizomeria). Aktywność poszczególnych karotenów, jako źródła prowitaminu A, przedstawia się następująco (3):

all-trans beta-karoten	100 %	(1 670 000 jedn. międzynr./g
Neo-beta-karoten U	38 %	
Neo-beta-karoten B	53 %	
all-trans alfa-karoten	53 %	
Neo alfa-karoten U	13 %	
Neo alfa-karoten B	16 %	
all-trans γ -karoten	27 %	

Ponieważ przewiduje się przemysłowe zastosowanie preparatów karotenowych zarówno jako barwnika, jak również jako źródła prowitaminu A do witaminizacji produktów spożywczych i pasz, prawdziwa wartość biologiczna produkowanych preparatów posiada zasadnicze znaczenie.

O ile wysoka wartość biologiczna syntetycznego beta-karotenu jest niewątpliwa (7), gdyż zawiera on głównie all-trans beta-karoten, to bardziej skomplikowanie przedstawia się sprawa w przypadku preparatów karotenu otrzymywanych ze źródeł naturalnych (marchwi) lub na drodze fermentacji.

Olejowe roztwory karotenu, wyodrębnionego z marchwi były badane

¹ Praca wykonana w Północnym Instytucie Min. Rolnictwa USA w ramach stypendium Organizacji do Spraw Żywnienia i Rolnictwa (FAO) przy ONZ.

² Niniejsze doniesienie zostało ogłoszone na rocznym zjeździe Stowarzyszenia Technologów Spożywczych (Institute of Food Technologists) w Detroit, USA (kwiecień 1963).

przez Grynberg i Witwicką (7), które stosując rozdział chromatograficzny na kolumnie z tlenkiem glinu stwierdziły, że zawartość najaktywniejszej biologicznie formy all-trans beta-karotenu wynosiła w badanym wypadku tylko około 8%. W niniejszej pracy przeprowadzono analizę preparatu karotenowego otrzymanego metodą fermentacji przy pomocy skojarzonych hodowli seksualnie przeciwstawnych szczepów pleśni *Blakeslea trispora* NRRL 9159 (—) i NRRL 9216 (+). Fermentacyjna metoda produkcji karotenu (6) jest obecnie najtańszą metodą produkcji prowitaminu A na świecie i z tego względu stwarza szerokie możliwości stosowania preparatów karotenowych przy witaminizacji produktów spożywczych i pasz.

Właściwa ocena wartości biologicznej tych preparatów odgrywa w tej sytuacji niezmiernie ważną rolę.

Z tego względu podjęto próby oznaczania zawartości poszczególnych karotenów i stereoizomerów beta — karotenu w preparacie karotenowym otrzymanym wspomnianą metodą fermentacji. Dla porównania wykonano analogiczne analizy preparatów otrzymanych z marchwi: badano preparaty produkcji polskiej i amerykańskiej oraz handlowy preparat karotenu produkcji amerykańskiej.

O c e n a m e t o d a n a l i t y c z n y c h

W ramach pracy stosowano następujące metody analityczne:

a) Oznaczanie ogólnej zawartości karotenoidów przeprowadzono przez ekstrakcję preparatów przy pomocy eteru naftowego (t. wrze. 33—57° C) na gorąco i następny pomiar gęstości optycznej otrzymywanych roztworów karotenu przy pomocy spektrofotometru B przy długości fali 450 m μ . Stężenie karotenu w badanych próbach było obliczone z krzywej standardowej, otrzymanej przez analizę roztworów czystego all — trans beta — karotenu (Hofmann — La Roche).

b) Oznaczanie ogólnej zawartości beta-karotenu według AOAC (1). Metoda polega na adsorpcji karotenoidów na kolumnie wypełnionej MgO (Seasorb + Hyflo Super Cel, 2 : 1) i następnej elucji β -karotenu przy pomocy mieszaniny aceton — eter naftowy (1 + 9).

c) Rozdział poszczególnych karotenów przez adsorpcję na kolumnie wypełnionej aktywowanym tlenkiem glinu i kolejną elucję następującymi rozpuszczalnikami (2):

- 1) Mieszaniną eter etylowy — eter naftowy w stos. 5 : 95
- 2) Mieszaniną eter etylowy — eter naftowy w stos. 25 : 75
- 3) Mieszaniną eter etylowy — eter naftowy w stos. 50 : 50

Według autorów metody (Hoffmann — La Roche) poszczególne eluaty — frakcje winny zawierać następujące izomery karotenu:

- 1) Frakcja 1: cis-beta-karoten (Neo B) i ewentualnie cis-alfa-karoten.
- 2) Frakcja 2: all-trans-beta-karoten i ewentualnie all-trans-alfa-karoten.
- 3) Frakcja 3: gamma-karoten.

d) Metoda według Bickoffa (3, 5) polegająca na adsorpcji na wodorotlenku wapnia i eluacji przy pomocy 1,5% roztworu eteru p-krezyłometylowego w heptanie. Wymieniony rozpuszczalnik winien eluować poszczególne stereoizomery beta-karotenu według następującej kolejności Neo-beta-karoten B, all-trans beta-karoten i Neo-beta-karoten U.

Wszystkie pomiary intensywności zabarwienia roztworów dokonywano przy pomocy spektrofotometru Beckman B przy długości fali 450 m μ . Czystość poszczególnych frakcji badano przez pomiar i wykreślenie krzywej widma absorpcyjnego przy pomocy spektrofotometru Beckman BD połączonego z samopisem Sargenta. Przeprowadzone badania wykazały, że metoda według AOAC daje zawyżone wyniki, gdyż stosowany eluat (10% acetonu w eterze naftowym) wymywa alfa-karoten wspólnie z beta karotenem; rozdział tych dwóch karotenów był w tej metodzie niemożliwy. Metoda według Hoffmann — La Roche'a (stosowano tlenek glinu produkcji firmy M. Woelm — Eschwege, Niemcy) nie dała również odpowiedniego rozdziału. W przypadku wszystkich badanych preparatów karotenowych frakcje 1 i 3 były bezbarwne. Cis-beta-karoten (Neo B) występował we frakcji 2 wspólnie z formą all-trans, a w przypadku preparatów z marchwi również z alfa-karotenem.

Najbardziej przydatną i dokładną metodą okazała się połączona adsorpcja według Bickoffa: a) wstępny rozdział karotenów na tlenku magnezu (eluacja 2% roztworem acetonu w eterze naftowym) i b) następny rozdział frakcji beta-karotenu na wodorotlenku wapnia na poszczególne stereoizomery.

Rozdział karotenów na kolumnie z tlenkiem magnezu przy zastosowaniu 2% roztworu acetonu w eterze naftowym zachodził bardzo dobrze. Otrzymano frakcje α -karotenu i β -karotenu, których czystość odrębnie sprawdzono przez wykres krzywej absorpcyjnej (4) w roztworze izo-oktanu. Oprócz tych frakcji otrzymano w przypadku kilku preparatów frakcje karotenów, których nie udało się zidentyfikować; na kolumnie pozostawały niewymywalne ksantofile.

Otrzymana frakcja beta-karotenu była następnie rozdzielona na kolumnie z tlenkiem wapnia (prod. Mallincrodt Chemical Works, St. Louis, Mo.), gdzie uzyskiwano doskonały rozdział stereoizomerów Neo B i all-

trans beta-karoten; czystość tych frakcji sprawdzono również przez wykres krzywej absorpcyjnej. Nie stwierdzono obecności frakcji Neo U-beta-karotenu w przypadku 4 badanych preparatów karotenu.

O c e n a p r e p a r a t ó w k a r o t e n o w y c h

Stosując ostatecznie przyjętą metodę według Bickoffa przeprowadzono analizy 5 preparatów karotenowych: 1) preparat otrzymany metodą fermentacji, 2) koagulat białkowy z marchwi produkcji polskiej, 3) koagulat białkowy z marchwi produkcji amerykańskiej, 4) olejowy roztwór karotenu wyodrębnionego z marchwi, produkcji amerykańskiej, oraz 5) preparat karotenu roztwarzalny w wodzie, produkcji amerykańskiej, otrzymany na drodze syntezy.

Wyniki tych analiz ujęte są w tabelach nr 1 i 2.

T a b e l a 1

Zawartość¹ karotenów i stereoizomerów beta-karotenu w różnych preparatach karotenowych

Produkt	Ogólna ilość karotenoidów	Rozdział na MgO				Rozdział na Ca(OH) ₂		
		alfa	beta	x ²	y ³	Neo B	all-trans	Neo U
Produkt fermentacyjny	15,4	—	13,6	0,24	0,26	0,70	12,41	—
Koagulat białkowy z marchwi (polski)	12,2	2,0	8,25	0,16	—	0,81	7,46	—
Koagulat białkowy z marchwi (amerykański)	20,0	3,85	12,25	0,18	—	1,48	9,81	—
Olej z marchwi (amerykański)	11,1	3,1	4,72	0,32	—	3,40	2,88	0,52 ⁴
Preparat karotenu, syntetyczny	23,2	—	23,20	—	—	10,04	5,92	6,36

¹ Zawartość wyrażona w mg/g produktu.

² Frakcja występująca na kolumnie z MgO jako trzecia: widmo absorpcyjne nie było identyczne z krzywą dla gamma — karotenu.

³ Frakcja występująca na kolumnie z MgO jako czwarta.

⁴ Widmo absorbcyjne otrzymanej frakcji nie było identyczne z krzywą dla Neo U beta — karotenu.

Przeprowadzone analizy wykazały, że preparat karotenowy otrzymany w procesie fermentacji nie zawiera nawet śladów alfa-karotenu; około 90% zwartych karotenoidów, stanowi czysty beta-karoten. Duża większość zawartego karotenu występuje w tym wypadku w formie all-trans.

Tabela 2

Procentowa zawartość¹ poszczególnych karotenów i stereoizomerów beta-karotenu w szeregu preparatów karotenowych

Produkt	K a r o t e n y				Stereoizomery beta-karotenu		
	alfa	beta	x	y	Neo B	all-trans	Neo U
Produkt fermentacyjny	—	88,3	1,56	1,69	4,54	80,6	—
Koagulat białkowy z marchwi (polski)	15,4	64,4	1,2	—	6,2	57,4	—
Koagulat białkowy z marchwi (amery- kański)	19,25	61,3	0,9	—	7,4	49,1	—
Olej z marchwi (amerykański)	27,9	42,5	3,0	—	12,6	25,9	4,7
Preparat karotenu syn- tetyczny	—	100	—	—	43	26	27

¹ Ogólną zawartość karotenoidów w poszczególnych preparatach przyjęto za 100%.

Wszystkie preparaty karotenowe otrzymane z marchwi zawierały poważne ilości (do 20%) alfa-karotenu oraz większe ilości w porównaniu z preparatem „fermentacyjnym” beta-karotenu w postaci Neo-B. Jak już wspomniano we wszystkich wypadkach, stwierdzono identyczność frakcji alfa-karotenu (oddzielonego na tlenku magnezu) oraz frakcji Neo-B all-trans beta-karotenu) oddzielonych na wodorotlenku wapnia), gdyż krzywa absorpcji była identyczna z krzywymi standardowymi (4).

Jak z przeprowadzonych badań wynika produkt fermentacyjny zawiera głównie (około 80%) karotenu o wysokiej wartości biologicznej. Przeprowadzone badania również dowodzą, że preparaty otrzymywane z marchwi mają rzeczywiście niższą wartość biologiczną niż to by sugerowały proste kolorymetryczne analizy chemiczne, za pomocą których oznaczamy sumaryczną zawartość karotenów (lub nawet karotenoidów) bez wniknięcia w ich strukturę chemiczną i przestrzenną. Handlowy preparat karotenu (otrzymanego na drodze syntezy) wykazał zawartość wyłącznie beta-karotenu, ale — co jest niezmiernie ważne — o niekorzystnym składzie stereoizomerów; również i w tym wypadku aktywność biologiczna jest poważnie zaniżona.

PIŚMIENNICTWO

1. Anonim: A. O. A. C. Methods of analysis, **9**, 653—655 (1960).
2. Anonim: „Determination of beta-carotene in food and feedstuffs”, Hoffmann — La Roche, Basel (Biuletyn Techniczny).
3. Bickoff E. M.: Methods of biochemical analysis, **4**, N. York (1957).
4. Bickoff E. M. i inni: J. Assoc. of Agr. Chemists, **31**, 633—646 (1948).
5. Bickoff E. M. i inni: J. Assoc. of Agr. Chemists, **32**, nr 4, 766—774 (1949).
6. Ciegler A., Hall H. H., Nelson G. E. M.: Microbiological production of carotene in a medium comprising carotene, US Patent nr 3 025 321 (13. 3. 1962).
7. Grynberg H., Witwicka J.: Tłuszcze i środki piorące, **4**, nr 1, 9 (1960).