

Fractionnement des produits de réaction de Maillard par différentes techniques et observation d'activité fermentaire de ces fractions.

I. Fractionnement sur échangeur de cation

Yang Hee Lee

Institut Coréen de Science et de Technologie.
Séoul, Corée.

Léon Petit et Eliane Fittes

Station de Biochimie des Céréales, I.N.R.A.
91-Massy, France.

여러가지 방법에 의한 Premelanoïdin의 분劃과 그 분劃物の 醱酵活性에 관한 觀察

I. 陽이온 交換樹脂에 의한 分劃

李 陽 熙

韓國科學技術研究所

레온 뵈띠, 엘리안 뢰뜨

佛蘭西國立農業研究院 穀類生化學研究所

(1969年 1月 20日 受理)

要 約

마이야르反應 生成物인 Premelanoïdin 中 酒精醱酵의 速度를 促進하는 物質을 分離하기 爲하여 陽이온 교환수지를 利用하여 Premelanoïdin을 fractionation 하고 얻어진 各 fraction의 酒精醱酵의 活性여부를 試驗하였다.

陽이온 교환수지로는 Dowex 50×8, 50-100을 使用하고 elution solvent로는 2N-NH₄OH 溶液을 使用하였으며 얻어진 各 5ml의 fraction은 冷凍乾燥해서 다시 本來 試料의 濃度(0.2N)로 희석하여 活性試驗에 使用하였다.

Fractionation의 結果는 water filtrate 區에 glucose, 5-HMF 및 少量의 갈색색소의 fraction을 얻었고 ammoniacal eluate 區에 大部分의 갈색색소와 glycine

N-glycoside의 fraction을 얻을 수 있었다.

酒精醱酵의 活性은 glucose, 갈색색소 및 glycine-N-glycoside 구획에서 관찰할 수 있었으나 glucose는 前 實驗에서 活性이 없는 物質로 認定되었으며 本 實驗에 나타난 活性은 Dowex 50에 의한 fractionation 과정중 glucose 自體의 變質에 依한 것으로 추측된다.

結局 活性物質이 存在하는 fraction은 Ammoniacal eluate 區의 갈색색소 fraction과 glycine 및 N-glycoside를 함유하는 fraction이라고 認定된다.

SHEIKH, PETIT et GODON (1960-1961) JEMMALI et PETIT (1965) ADRIAN et al. (1966) et LEE et PETIT (1968) ont remarqué que les produits de la réaction de Maillard ont des effets activateurs

physiologiques sur les microorganismes, sur les enzymes et sur l'animal supérieur. Ceci est observé en utilisant les prémélanoïdines préparées à partir de glucose et de glycocole dans lesquelles se trouvent des produits complexes formés au cours de la réaction de Maillard. Mais, les substances qui sont responsables à cette activation ne sont pas encore isolées. Nous avons alors essayé de fractionner les prémélanoïdines sur la résine cationique surtout "Dowex 50×8" en vue de séparer les substances activatrices par les propriétés acido-basique des molécules des produits.

Méthodes expérimentales.

Comme résines échangeuses de cations, nous avons essayé les résines Dowex 50×8 et Amberlite IR-120. Mais, après plusieurs essais, nous avons remarqué que le Dowex 50×8 donne des séparations plus nettes dans le fractionnement des prémélanoïdines que l'amberlite IR-120. Finalement, nous avons utilisé seulement à cette fin le Dowex 50×8.

Cette résine cationique portant des groupes sulfoniques est mise sous forme acide, en lui faisant subir deux cycles alternes de traitement NH_4OH (2N)– HCl (2N). On la remplit sur une colonne de 55cm de hauteur et 1.2cm de diamètre, on rince à l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent soit neutre.

Sur cette colonne ainsi préparée, on introduit 2 ml de produit à fractionner, on rince à l'eau distillée et recueille l'effluent par fractions de 5ml, à la vitesse de 1 ml en 2 minutes, jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (250 ml environ). On élue alors à l'ammoniaque (2N) et on recueille de la même manière que le filtrat. La résine est régénérée par passage d'ammoniaque (2N), d'eau distillée puis d'acide chlorhydrique(2N) en excès (200 ml environ); on lave enfin à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent. Chaque fraction recueillie donne lieu aux opérations suivantes: mesure de la densité optique à 420 m μ , relevé du spectre U.V., chromatographie sur papier, en vue de la détection des produits qui nous sont identifiés.

La préparation des échantillons pour les tests de fermentation est effectuée sur une prise de 2 ml de chaque fraction: on les a cryodésséché entre -5° et -20°C, dans un flacon de pénicilline, puis on reprend dans 1 ml d'eau distillée. De cette opération, il résulte la concentration de l'échantillon et l'élimination de l'ammoniaque lorsqu'il s'agit d'éluat ammoniacal.

L'activité fermentaire est déterminée par la quantité de gas carbonique dégagé comme on a décrit précisément dans le travail précédent (LEE et PETIT (1968)).

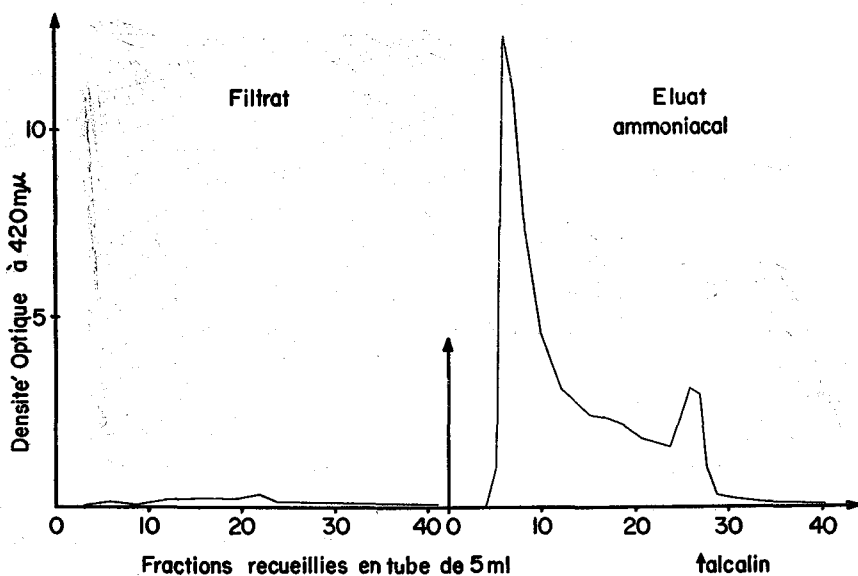


Fig 1. Fractionnement des prémélanoïdines sur Dowex. 50

Résultats.

1. Fractionnement

2 ml de prémélanoïdines sont fractionnées par la méthode décrite plus haut pour cette résine. Puis les diverses opérations destinées à localiser le passage des produits dans les fractions et les tests de fermentation sont effectués successivement.

1.1. Localisation des produits dans les fractions.

a) Mesure de densité optique.

En vue de localiser le passage du colorant, la densité optique des fractions a été mesurée à 420 $m\mu$. Comme la Fig. 1. le montre, une petite quantité de colorant se trouve dans le filtrat tandis que la plus grande partie du colorant se localise dans l'éluat. Le colorant dans l'éluat se sépare en deux

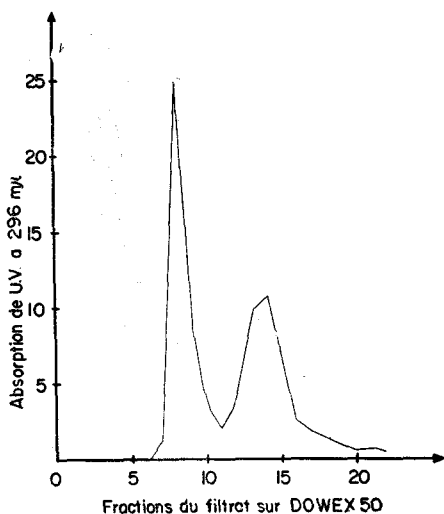


Fig 2. Passage de 5-HMF et de 296.

Dans les conditions de fractionnement que nous utilisons, nous mettons effectivement ce composé en évidence dans le filtrat, mais accompagné d'impuretés, produits légèrement colorés dans les premières fractions et 5-HMF dans les dernières (Fig. 2).

Cependant la position des maxima d'absorptions des différents spectres montre bien que ce "296" est le composant prédominant de chacune d'elles; c'est pourquoi, sur le graphique 2, nous avons représenté les variations de l'absorption à 296 $m\mu$ en fonction du volume d'effluent. Nous y voyons que le passage

pics: un grand pic au début de l'éluat et un petit pic au point d'apparition de l'alcalinité.

b) Passage du 5-HMF et du "296"

La formation de 5-hydroxy-méthyl-furfural (5-HMF) au cours de la réaction de Maillard est bien connue et sa séparation a été réussie par plusieurs auteurs à partir du milieu de glucose-glycocolle, ou des fruits et des légumes brunis (HAAS et al. 1949; WAHHAB 1948; PETIT 1957; PETIT 1959; REYNOLDS et FENICK 1960). Par ailleurs, PETIT (1957) a isolé à partir des prémélanoïdines une substance ayant un maximum d'absorption à $\lambda=296m\mu$, qu'il appelle "296"; il en a réalisé l'isolement par extraction à l'éther des prémélanoïdines et a pu obtenir un produit pur et stable sous forme de sel de calcium ($C_{11}H_{13}O_8N_2Ca$).

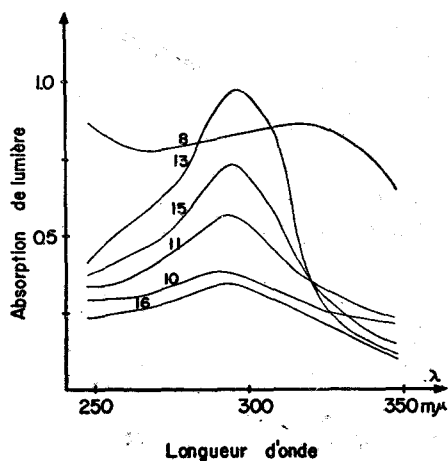


Fig 3. Spectres des fractions du filtrat

du "296" se localise entre la 11^{ème} et la 16^{ème} fraction du filtrat. Le premier pic de la Fig. 2 est dû à la présence d'un composé non identifié ayant un léger maximum d'absorption au voisinage de 330 $m\mu$ (Fig. 3 courbe 8).

c) Chromatographie sur papier

Le glycocolle et le N-glycoside se localisent dans les mêmes fractions de l'éluat comprises entre la 25^{ème} et la 28^{ème}, juste au point d'apparition de l'alcalinité. Cependant, une faible quantité de glycocolle est encore décelable jusqu'à la 33^{ème} fract-

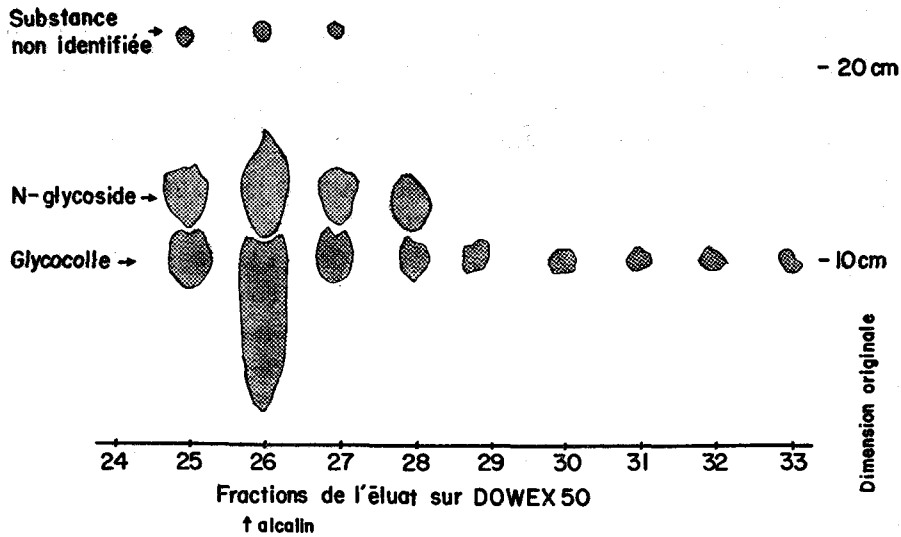


Fig 4. Chromatogramme des fractions

ion. Dans la même zone que le glycocolle et N-glycoside apparaissent de petites taches brun clair que nous n'avons pas pu identifier (Fig. 4).

2. Test d'activité fermentaire

Les tableaux 1 et 2 présentent un panorama de l'activité fermentaire des fractions de l'effluent; en les analysant, nous remarquons 3 zones dans lesquelles se manifeste une certaine accélération de fermentation. La zone du glucose (entre la 4ème et 7ème fraction du filtrat), celle du colorant (entre la 6ème et la 11ème fraction de l'éluat) et la zone du glycocolle et du N-glycoside (entre la 25ème et la 29ème fraction d'éluat).

Tableau 1. Activité fermentaire; fractionnement de prémélanoidines sur Dowex 50×8

Fractions (Filtrat)	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μ1/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	2,40	1,51	1,22
4. 5.	9,05	6,88	3,56
6. 7.	6,68	5,25	2,61
8. 9.	2,70	1,71	1,46
10. 11.	2,73	1,65	1,58
12. 13.	2,10	1,28	1,26
14. 15.	2,40	1,53	1,26
16. 17.	2,61	1,87	1,38

18. 19.	2,10	1,30	1,20
20. 21.	3,01	2,00	1,55
22. 23.	2,68	1,75	1,58
24. 25.	1,93	1,20	1,07
témoin eau	3,56	2,26	0,50
26. 27.	3,56	2,68	0,45
28. 29.	4,45	3,13	0,45
30. 31.	3,58	2,81	0,53
32. 33.	3,51	2,78	0,58
34. 35.	3,86	2,65	0,48
36. 37.	3,70	2,91	0,56
38. 39.	3,81	2,86	0,55
40. 41.	3,76	2,70	0,56
42. 43.	3,98	2,76	0,60
44. 45.	3,90	2,85	0,53
46. 47.	3,48	2,68	0,46

Tableau 2. Activité fermentaire: fractionnement de prémélanoidines sur Dowex 50×8

fractions (Eluat)	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μ1/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	3,31	2,28	1,15
4. 5.	3,71	2,61	1,13
6. 7.	5,00	4,00	1,66
8. 9.	4,51	3,46	1,55

10.	11.	4,13	3,05	1,54
12.	13.	2,44	1,75	1,05
14.	15.	2,41	2,16	1,11
16.	17.	3,26	2,13	1,23
18.	19.	3,63	2,55	1,21
20.	21.	3,26	2,10	1,15
22.	23.	4,25	4,76	2,78
24.	25.	10,28	12,16	12,65
témoin eau		2,60	1,53	0,61
26.	27.	10,31	10,60	11,15
28.	29.	6,45	8,45	4,41
30.	31.	4,68	3,48	1,58
32.	33.	4,01	2,90	1,46
34.	35.	4,20	3,03	1,40
36.	37.	4,06	2,89	1,35
38.	39.	3,56	2,21	1,33
40.	41.	4,20	2,90	1,33
42.	43.	3,48	2,68	1,36
44.	45.	3,75	2,43	1,31
46.	47.	3,48	2,18	1,21

Le caractère activateur se présente différemment dans ces trois zones actives, c'est-à-dire que l'on observe en fonction du temps de fermentation, une action décroissante dans la zone du glucose, une action faible et décroissante dans la zone du colorant et une action forte et croissante dans la zone du glycolle et du N-glycoside.

Mais l'activité dans la zone du glucose et dans celle du glycolle, N-glycoside présente une intensité exagérée par rapport à l'action habituelle des prémélanoidines. Ces résultats nous sont parus anormaux, nous avons alors effectué un fractionnement identique avec un mélange de glucose et de glycolle pour réaliser une expérience témoin.

Tableau 3. Activité fermentaire: fractionnement d'un mélange de glucose-glycolle sur Dowex 50×8

fractions	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μ l/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
(Filtrat)			
témoin eau	2,41	1,01	0,65
4. 5.	2,66	1,20	0,61
6. 7.	10,88	9,53	0,61
8. 9.	4,81	3,36	0,96

10.	11.	2,80	1,28	0,53
12.	13.	2,41	1,03	0,51
14.	15.	2,48	1,18	0,53
16.	17.	2,15	1,10	0,46
18.	19.	2,33	1,00	0,63
20.	21.	2,33	1,00	0,63
22.	23.	2,41	1,05	0,53
24.	25.	2,43	0,81	0,40

(Eluat)

témoin eau		2,28	1,30	0,63
15.	16.	2,85	1,50	0,58
17.	18.	2,51	1,36	0,51
19.	20.	2,55	1,46	0,56
21.	22.	2,43	1,38	0,50
23.	24.	3,01	3,68	8,86
25.	26.	5,83	6,06	13,10
27.	28.	3,00	3,38	3,85
29.	30.	3,00	1,65	0,61
31.	32.	2,15	1,20	0,05
33.	34.	2,23	1,19	0,46
35.	36.	2,00	1,19	0,45

Les résultats de cet essai sont rassemblés dans le Tableau 3; on constate que des activités intenses, comparables aux précédentes, se manifestent précisément dans les zones de passage du glucose et du glycolle.

Discussion

L'intérêt du fractionnement sur la résine Dowex 50×8 c'est de pouvoir séparer les prémélanoidines en plusieurs groupes de fractions comme nous l'avons exposé ci-dessus. Cependant il est apparu qu'une certaine modification des produits a lieu au cours du fractionnement surtout dans la zone du glucose. Nous remarquons dans les fractions qui correspondent au passage du glucose, une activité fermentaire très forte au début de la fermentation, bien que comme nous l'avons signalé précédemment, le glucose apporté par l'échantillon ne modifie pas la vitesse de fermentation. (LEE et PETIT(1968)). On retrouve ce phénomène dans le fractionnement témoin du glucose seul. Mais si on fractionne le glycolle seul, on ne retrouve plus d'activité dans la zone du glucose. Cela signifie vraisemblablement que la modification de l'activité fermentaire ne

provient pas de produits étrangers, contenus dans la résine et libérés au cours de l'échange d'ions, mais qu'elle est due à l'altération du glucose lui-même au cours du fractionnement.

Ne tenant pas compte de cet artefact, nous pouvons conclure que les produits activateurs se localisent dans la fraction la plus colorée et dans celle contenant le glyco-colle et le N-glycoside.

Références Bibliographiques

- 1) ADRIAN J., FRANGNE R., PETIT L., GODON B. et BARBIER J., *Ann. Nutr. Aliment.* **20**, (3), 257-277, (1966).
- 2) HAAS V.A., STANDTMAN F.H. and MACKINNEY G. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3576 (1948).
- 3) HUGGETT A. St. G., NIXON D. A., *Biochem. J.*, **12**, p. (1957).
- 4) JEMMALI M. et PETIT L. *Thèse de Doctorat.* Faculté des Sciences de Paris. (1965)
- 5) LEE, Y.H. et PETIT L. *J. Agri. Chem.* **10**, 39-45 (1968)
- 6) MOORE S. and STEIN W.H.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 893 (1954)
- 7) PARTRIDGE S.M. and BRIMLEY R.C.: *Biochem. J.*, **51**, 628 (1952)
- 8) PETIT L.: *Compt. Rend.*, **244**, 239 (1957)
- 9) PETIT L.: *Ann. Techn. Agri.*, **1**, 5-23. (1959)
- 10) PETIT L. GODON B. et SHEIKH N.M.: *Ann. Technol. Agri.*, **1**, 5-42. (1961)
- 11) SHEIKH N.M.: *Thèse de Doctorat.* Faculté des Sciences de Paris. (1960)
- 12) WAHHAB A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3580. (1948)