

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

III. Fractionnement par gel-filtration sur "Sephadex".

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 方法에 依한 Premelanoïdin 의 分劃과 그 分劃物의
醱酵活性에 關한 觀察

III Gel-filtration 에 依한 分劃

李 陽 熙

韓國科學技術研究所

레온 빠띠, 엘리안 뢰뜨

佛蘭西 國立農業研究院 穀類生化學研究所

(1969年 2月 20日 受理)

要 約

本 實驗에 使用된 Gel 로는 Sephadex G-200, G-100 과 G-75 로써 fractionation 은 大體로 호조진에서 이루어 졌다. G-200 과 G-100 의 경우에 있어서는 갈색색소의 분자크기가 서로 다른 2 個의 Peak 를 얻을 수 있었고 Colum에 투입된 試料는 完全히 回收되었다. G-75 의 경우에는 갈색색소와 분자 크기가 작은 다른 物質과를 分離할 수 있었으나 약간의 試料는 Gel 에 흡착되어 完全히 回收할 수 없었다.

발효실험의 결과를 종합해 보면 우선 갈색색소를 함유하는 모든 fraction 은 발효초기에 活性을 보이며 분자크기가 작은 물질의 區劃에서는 강하고도 점증되는 活性을 관찰할 수 있었다.

Sephadex Gel 에 依한 fractionation 은 첫째로 作業도중에 試料의 變質現象이 없다는 것과 둘째로 갈색색소를 그들의 분자크기에 따라 分劃할 수 있

다는 利點들이 있다.

Le gel Sephadex est utilisé largement pour la séparation des produits par ordre de grosseur moléculaire; STINSON et WILLITS (1963) ont décrit une méthode de gel filtration sur Sephadex G-25 qui permet la séparation des colorants des caramels d'une solution en mélange avec du saccharose et du chlorure de sodium. GJESSING (1965) a fractionné une solution de substances humiques sur Sephadex G-100 et G-75 et il a obtenu deux pics de produits différant par la grosseur des molécules.

Ici nous avons essayé cette technique pour le fractionnement des prémélanoïdines. Puisqu'au cours de la réaction de Maillard les produits initiaux, les sucres et les protides, se polymérisent et se produisent des composés variant des caractéristiques

dimensionnelles moléculaires en fonction de l'avancement de la réaction, la technique de gel-filtration nous a parue convenable afin de séparer les produits complexes de la réactions par leur grosseur de molécule. D'ailleurs, dans l'opération de cette technique, nous ne utilisons que d'eau distillée comme le solvant et ceci éviterait des altérations des produits que nous l'avons observé au cours des fractionnement sur échangeur de cation et par chromatographie de partage à cause de la contamination des produits étrangers à partir des solvants ou des matériels utilisés pour les techniques. (LEE, PETIT et FITTES (1969), LEE, PETIT et FITTES (1969)).

Méthodes Expérimentales

Nous avons utilisé exclusivement les gels de dextrane Sephadex "G-200", "G-100", et "G-75". Après gonflement du produit dans l'eau distillée pendant 24 heures, on consitue une colonne de 60cm de hauteur et de 1,5cm de diamètre. Le fractionnement est effectué sur un échantillon de 2 ml de produits; la colonne est rincée à l'eau distillée jusqu'à élimination complète du colorant et absence de glucose et de glyocolle dans l'effluent. Les fractions sont recueillies et traitées de façon identique à celles des échangeur d'ions pour localiser le passage des produits.

Il faut noter que l'emploi du Sephadex "G-75" présente quelques difficultés; la filtration au cours du fractionnement se ralentit progressivement, la récupération des pigments n'est pas totale; même un lavage par une solution ammoniacale ne suffit pas à décolorer entièrement le gel. GJESSING (1956) a remarqué un phénomène identique avec Sephadex "G-25" et G-50 dans l'isolement des substances humiques.

Les fractions sont utilisées directement pour le test fermentaire sans aucun traitement spécial.

Résultats et Discussion

La Fig. 1 et le Tableau 1 montrent respectivement le courbe d'éluion et les activités fermentaires des fractions obtenues par gel-filtration sur Sephadex G-200.

Comme le courbe d'éluion le montre, on remarque

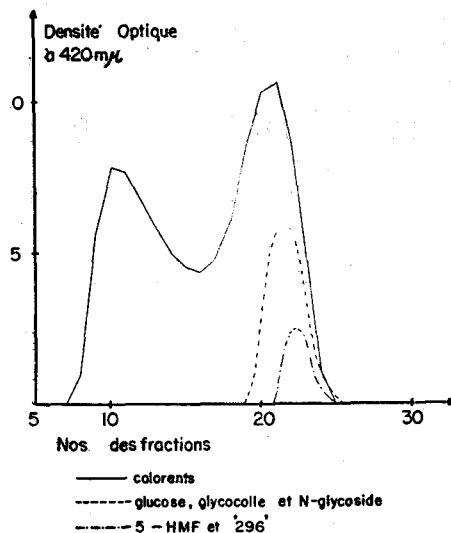


Fig 1. Fractionnement des prémélanoidines sur G-200

Tableau 1. Test fermentaire des fractions obtenues par filtration sur Sephadex G-200.

fractions	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μl/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	2,89	2,41	1,45
8. 9.	4,54	4,13	3,41
10. 11.	4,92	4,63	2,90
12. 13.	4,30	4,22	1,75
14. 15.	4,84	4,53	2,03
16. 17.	4,72	4,30	1,98
18. 19.	5,70	4,98	2,03
20. 21.	7,06	8,18	0,26
22. 23.	6,75	7,98	0,44
24. 25.	4,91	5,78	0,16

d'abord deux pics de colorant qui diffèrent par la grosseur de leurs molécules, ensuite, les autres produits à petites molécules, (glucose, glyocolle, N-glycoside et 5-hydroxy méthyl furfural) se localisent avec le colorant de deuxième pic mais plus inclinés vers la fin d'éluion. Les courbes montrant le passage des produits à petites molécules dans la figure n'indiquent pas leur quantité exacte mais correspondent seulement au passage quantitatif relatif des produits.

En ce qui concerne l'activité fermentaire, ce sont les fractions contenant les produits à petites molécules qui montrent une activité appréciable.

D'ailleurs, les autres fractions qui contiennent le colorant seul montrent une faible activation fermentaire.

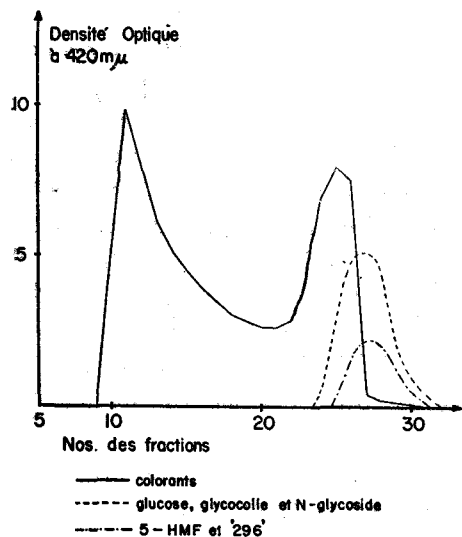


Fig 2. Fractionnement des prémélanoïdines sur G-100.

Tableau 2. Test fermentaire des fractions obtenues par filtration sur Sephadex G-100.

Fractions	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μ l/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	2,68	1,68	0,73
10. 11.	3,83	2,51	0,86
12. 13.	3,20	2,05	0,76
14. 15.	3,15	2,33	0,88
16. 17.	3,73	2,70	1,11
18. 19.	3,75	2,38	1,06
20. 21.	3,65	2,28	0,95
22. 23.	3,60	2,16	0,95
24. 25.	4,91	5,41	1,71
26. 27.	4,60	5,37	13,43
28. 29.	4,50	4,27	10,00
30. 31.	4,25	4,17	9,43
32. 33.	5,08	5,95	5,06

Le fractionnement sur G-100 présente une allure similaire à celui sur G-200. Nous remarquons pourtant de petites différences de la caractéristique de fractionnement, entre ces deux gels, provoquées par la différence dimensionnelle de leur gel; la séparation des produits est meilleure sur G-100 que sur

G-200 et les produits se filtrent plus lentement sur G-100 que sur G-200 (cf. Fig. 2).

Suivant les résultats des tests fermentaires, nous trouvons des activités tout à fait analogue à celles observées dans les fractions obtenues par G-200. C'est-à-dire, une activité faible en début de fermentation dans les fractions contenant du colorant et une activité appréciable et croissante dans les fractions des produits à petites molécules (cf. tableau 2).

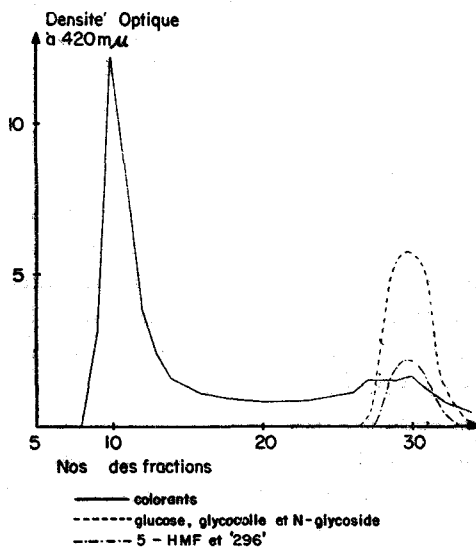


Fig 3. Fractionnement des prémélanoïdines sur G-75.

Tableau 3. Test fermentaire des fractions obtenues par filtration sur Sephadex G-75.

fractions	Vitesse de dégagement de CO ₂ (μ l/mn.) après un temps de fermentation de:		
	3 heures	6 heures	22 heures
témoin eau	2,01	1,11	0,60
9. 10.	4,31	2,68	0,63
11. 12.	3,95	2,33	0,57
13. 14.	3,50	2,26	0,57
15. 16.	3,56	2,50	0,78
17. 18.	3,11	2,20	0,67
19. 20.	3,11	2,07	0,67
21. 22.	3,16	2,15	0,66
23. 24.	3,21	2,18	0,66
25. 26.	3,28	2,30	0,76
27. 28.	3,81	4,00	0,93
29. 30.	3,60	4,43	7,71

Dans la filtration sur G-75, la plupart des pigments sont rassemblés dans un seul pic situé au début de la zone de tamisage moléculaire et une petite fraction colorée passe avec les produits à petites molécules se localisant en fin de filtration. Comme l'on a déjà noté plus haut, une petite quantité du colorant se fixe dans le gel au cours de fractionnement et la récupération des produits n'est pas totale (cf. Fig. 3).

Comme Tableau 3 le montre, les résultats des tests fermentaire présentent une caractéristique d'activité analogue à ceux observés dans les fraction obtenue par G-100 et G-200.

En conclusion, généralement, le fractionnement se réalise dans de bonnes conditions et la récupération des produits introduits est totale dans les cas de G-200 et G-100. Cependant, sur G-75 une faible fraction du colorant reste dans le gel, la récupération des produits introduits n'étant pas alors rigoureusement complète.

En analysant les résultats des tests fermentaires, nous remarquons que toutes les fractions qui contiennent

le colorant présentent une activation au début de la fermentation et les fractions qui contiennent les produits à petites molécules montrent une activation forte et croissante en fonction du temps de fermentation à cause de la présence du glycolle et du N-glycoside.

Le fractionnement sur Saphadex présente quelques avantages; au cours du fractionnement, on ne remarque aucune altération des produits qui puisse modifier leur action sur la fermentation. De plus, il y a possibilité de séparation des pigments en deux groupes suivant la grosseur de leurs molécules.

Références Bibliographiques

- 1) GJESSING E.T.: Nature, 208, No. 5015, 109 1-1092(1965).
- 2) LEE, Y.H., PETIT L. et FITTES E.: J. Agri. Chem. Coréen 11, 95(1969).
- 3) LEE Y.H., PETIT L. et FITTES E.: J. Agri. Chem. Coréen 11, 101(1969).
- 4) STINSON E.E. and WILLITS C.C.: J. Assoc.-Offi. Agri. Chem. 46(1963).
- 5) STRENLI H.: Chimia 16, 371-372(1962).