

## Zur Anwendung der kolorimetrischen Weinsäurebestimmung nach Rebelein bei der Untersuchung von Bäckereiprodukten\*)

Von J.-M. Brümmer

### A. Problemstellung

Organische Säuren und unter ihnen besonders Weinsäure sind in Mahlerzeugnissen, Backzutaten und Gebäcken häufig anzutreffen. Es ist daher nicht verwunderlich, wenn die Analytik organischer Säuren immer wieder bearbeitet und verbessert wurde<sup>1-5)</sup>.

Für die mehrbasischen Oxycarbonsäuren waren meistens nur qualitative, meist chromatographische Trennungen angewandt worden. Es ist natürlich möglich, durch spezifische weitergehende Untersuchungen der chromatographischen Zone, z. B. durch Titration, auch zu quantitativen Aussagen zu kommen.

Durch die zahlreichen Arbeiten von Rebelein<sup>6)</sup> auf dem Weinsektor sind neuere und quantitativ genauere Methoden speziell zur Bestimmung von Weinsäure, aber auch von Zitronen- und Milchsäure bekannt geworden. Es lag daher nahe, diese Erkenntnisse auch auf Backrohstoffe und Backwaren anzuwenden. Im Mittelpunkt standen die Arbeiten über Weinsäurebestimmung. Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß unter gewissen Voraussetzungen auch die Erfassung der Zitronen- und Milchsäure in Bäckereiprodukten nach Rebelein möglich ist.

Die Weinsäure tritt in verschiedenen Verbindungsarten in Bäckereiprodukten auf. In den Mahlerzeugnissen z. B. wird der überwiegende Teil als freie Säure, in Backpulvern daneben auch als Salz vorkommen.

In neuzeitlichen Weizenmehl-Backmitteln wird die Esterform vorherrschen. Hier ist die Weinsäure hydrophiler Bestandteil der fettähnlichen Emulgatoren.

Bei der Aufarbeitung muß diesen Erscheinungsarten Rechnung getragen werden, sei es, um möglichst vollständig die vorhandenen Säuremengen zu erfassen, oder aber nicht dadurch zu Fehlergebnissen zu kommen, daß andere Weinsäureverbindungen mitbestimmt werden.

### B. Methodik

Die Extraktion der zu erfassenden Weinsäure bringt für Bäckerei-Rohstoffe keine Schwierigkeiten mit sich. Aus Mahlprodukten und auch aus fettlosen Rezepturbestandteilen ist ein Herauslösen mit geeigneten Lösungsmitteln jedem Analytiker geläufig. Hier kann sich nach der Extraktion fast ohne weitere Aufarbeitung die kolorimetrische Bestimmung anschließen.

Etwas umständlicher wird der Arbeitsweg bei fetthaltigen Untersuchungsproben. Hier interessiert meist der Gehalt an veresterter Weinsäure, so wie sie z. B. in Diacetylweinsäureester (DAWE), also als Monoglycerid-Fettstoffgemisch auftritt. Sind diese Verbindungen, und es handelt sich hier um Gemische von Glyceriden und Halbestern, wie chromatographische Trennungen und Strukturuntersuchungen beweisen<sup>7, 8)</sup>, mit Mahlerzeugnissen vermischt oder sind fertige Gebäcke zu untersuchen, so treten weitere Komplikationen in der Erfassung auf. Mit den normalen Lösungsmitteln, wie sie bei Fettbestimmungen ein-

gesetzt werden, sind nur geringe Wiederfindungsraten — etwa 1 bis 2 %, erzielt worden. Dies ist auch für die Fettgehaltskontrolle bei Backerzeugnissen von Interesse, die somit bei Einsatz üblicher Lösungsmittel (Pentan, Hexan, Diäthyläther) auch bei Anwendung einer Salzsäurehydrolyse die vorhandenen Fettstoffe nur unvollständig erfaßt.

Um die Assoziate von Fettstoffen mit Eiweiß, Stärke, verkleisterter Stärke etc. aufzutrennen, müssen erheblich polarere Lösungsmittel oder -gemische, z. B. Methanol-Butanol oder noch besser wassergesättigtes n-Butanol angewandt werden. Beim Einsatz von n-Butanol ist die Anwendung von Wärme bei der Extraktion nicht zwingend notwendig. Trotzdem darf nicht verkannt werden, daß selbst bei diesen Lösungsmitteln noch mit Verlusten von ca. 50 % besonders bei der Untersuchung von Gebäcken gerechnet werden muß. Diese Erkenntnisse ergeben sich aus Versuchen mit radioaktiv markierter Weinsäure in DAWE<sup>9)</sup>.

Nach der Rohextraktion müssen freie Säuren, sowie Mehl- und/oder Fremdfett vom zu untersuchenden Emulgator getrennt werden. Freie Weinsäure, wie sie aus den Eigengehalten der Rohstoffe, z. B. der Mahlprodukte oder aus der Esterhydrolyse stammen kann, ist durch Ausschütteln mit alkalischen Lösungen zu entfernen.

Zur Abtrennung von DAWE aus Rohfetten schlägt Kröller<sup>10)</sup> eine Fällung des Emulgators mit gesättigter methanolischer Bleiacetatlösung vor. Wir glauben, bei Anwendung unseres Arbeitsweges auf diese Fällung verzichten zu können, zumal wir wiederholt feststellen mußten, daß bei der Untersuchung von Fertigmehlen und Gebäcken Unregelmäßigkeiten in der Niederschlagsbildung eintraten, selbst wenn größere Ester-mengen vorhanden waren.

### C. Analysengang

Zieht man die gegebenen Hinweise über Weinsäure in Bäckereiprodukten in Betracht, zeichnet sich folgender Analysengang ab:

#### Lösungen

- Nr. 1 Wassergesättigtes n-Butanol
- Nr. 2 2n-butanolische Kalilauge, stets frisch bereiten
- Nr. 3 Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 2 %ig in Wasser
- Nr. 4 Natriumsulfat-Lösung, 7,1 %ig in Wasser unter Berücksichtigung eines eventuellen Kristallwassergehaltes
- Nr. 5 Ammoniumvanadat-Lösung, 2 %ig 10 g  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  in 150 ml n/10 wäßriger Lauge lösen. Nach Zugabe von 200 ml einer 27 %igen wäßrigen Natriumacetat-Lösung (ev. vorhandenes Kristallwasser bei der Einwaage berücksichtigen) mit n/10 Lauge auf 500 ml auffüllen
- Nr. 6 2n-Schwefelsäure
- Nr. 7 Schwefelsäure, 25 %ig

Nach der Rohfettextraktion mit wassergesättigtem n-Butanol wird zentrifugiert und filtriert; freie Säuren werden durch zweimaliges Ausschütteln mit je 20 ml 2 %iger

\*) Veröffentlichungs-Nr. 3909 der B. f. G.

wäßriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung entfernt. Die überstehende butanolische Lösung wird in den Extraktionskolben zurückgegeben und mit 30 ml 2n-butanolischer Kalilauge 30 Min. lang bei 70° C verseift. Da Weinsäure nicht absolut hitzestabil ist, sollten höhere Wassertemperaturen vermieden werden.

Nach dem Abkühlen wird viermal mit je 20 ml 7,1 %iger wäßriger Natriumsulfat-Lösung (Nr. 4) ausgeschüttelt. Eine geringe Zugabe von 5 ml n-Butanol ergab in einigen Fällen bei der 1. Ausschüttelung eine schnellere Phasentrennung. Die spezifisch schwereren wäßrigen Lösungen werden vereinigt und filtriert. Vor dem Auffüllen mit 7,1 %iger Natriumsulfat-Lösung auf 100 ml wird, wenn nötig, mit Schwefelsäure auf etwa pH 6,0 eingestellt. (Sollte die zu erwartende Weinsäuremenge gering sein, genügt eine zweimalige Behandlung mit Natriumsulfatlösung auch, wonach dann nur auf 50 ml aufgefüllt zu werden braucht. Ebenso ist es möglich, bei größeren Weinsäurekonzentrationen weitere Verdünnungsreihen aufzustellen).

50 ml dieses Ansatzes werden zur Farbreaktion verwendet. Sollten aufgrund der vorliegenden Weinsäurekonzentrationen andere Mengen zur Anfärbung kommen, so sollten die Volumen-Verhältnisse von Ansatz zu Vanadat-Lösung und zur Säuremenge gleichgehalten werden. Nach Zugabe von 5,0 ml Ammoniumvanadat-Lösung (Nr. 5) ist wiederum mit Schwefelsäure anzusäuern. Es zeigte sich, daß hier der pH-Wert 4,5 bei einer Schwankungsbreite von  $\pm 0,2$  pH-Einheiten, die am besten reproduzierbaren Werte lieferte. Da hierfür nur 2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbraucht werden sollten, empfiehlt es sich, die vorher erwähnte Einstellung auf pH 6,0 durchzuführen, da sonst in der Endstufe zu konzentrierte Säure benutzt werden muß.

Bei Minderverbrauch von Säure ist mit Wasser auf insgesamt 2,0 ml auszugleichen, um stets gleiche Verdünnungen zu erhalten. In einigen Untersuchungsfällen zeigte es sich, daß an dieser Stelle eine weitere Filtration notwendig wird. Die Messung schließt sich möglichst nach 1,5 Min. an und wird bei 530 nm in 1-cm-Küvetten unter Berücksichtigung eines Blindwertes aus Natriumsulfat-(Nr. 4) und Ammoniumvanadat-Lösung (Nr. 5) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt rechnerisch im Verhältnis zu Extinktionen bekannter Weinsäuremengen oder unter Zuhilfenahme einer Eichkurve, die auf reine freie Weinsäure bezogen wird. Es empfiehlt sich, bei jeder Bestimmungsserie die genaue Lage der Eichkurve durch zwei Messungen mit reiner Weinsäure festzulegen, da geringe Parallelverschiebungen auftreten können. Sind die Gehalte an freier Weinsäure oder in nicht fettartigen Verbindungen, z. B. Salze, zu ermitteln, so kann, wie bereits angedeutet, nach schwachem Ansäuern sofort mit der Natriumsulfatlösung extrahiert werden. Es wird dann wie beschrieben weiterverfahren.

Durch zahlreiche Kontrollversuche haben wir uns von der Brauchbarkeit des Analysenweges überzeugt. So wurden u. a. die einzelnen Schritte des von uns vorgeschlagenen Untersuchungsganges, insbesondere die Verseifungsdauer, die Alkalität der Verseifungslösung, die Wirksamkeit der Ausschüttelung und der Einfluß von pH-Schwankungen überprüft. Bei diesen Versuchen haben wir keine fraglichen Punkte entdecken können. Der Einfluß des pH-Milieus ist dahin zu deuten, daß gegenüber unseren Angaben eher zu sauer als zu alkalisch gearbeitet werden sollte.

Auch bei Anwesenheit anderer Fette waren bei der kolorimetrischen Ermittlung des Weinsäuregehaltes keine Veränderungen festzustellen. Ebenso verändern selbst in erheblichen Mengen vorhandene weitere Carbonsäuren, auch Oxicarbonsäuren, das Meßergebnis nicht. Dies ist von Bedeutung, da somit andere organische Säuren nach dem Verseifen nicht entfernt zu werden brauchen.

Nebenbei soll hierzu noch ausgeführt werden, daß in diesem Zusammenhang geeignete Ionen-Austauscher erfolgreich erprobt wurden, die eine weitere Vorselektion der Weinsäure erlauben würden.

Von besonderer Wichtigkeit war es uns, verschiedene handelsübliche DAWE-Typen mit der beschriebenen Methode auf ihre Weinsäuregehalte zu untersuchen. Wir ermittelten dabei Säuregehalte von 6,0 bis 21 %, bezogen auf den Gesamttemulgator. Diese Zahlen stehen nur z. T. in Übereinstimmung mit den theoretischen Angaben von Kröller<sup>10)</sup>. Berücksichtigt man aber bei den DAWE-Typen verschiedene Fettgehalte, verschiedene Veresterungsgrade, sowie das Vorhandensein von Halbestern<sup>7)</sup> so kann auch mehr Weinsäure als sich theoretisch für das Reinprodukt errechnet, möglich sein.

Die vorstehende Methode wird von uns seit längerer Zeit parallel zu dünnschichtchromatographischen Untersuchungen angewandt. Es zeigt sich, daß auch in Fällen, wo mit der DC keine eindeutige Aussage zu erhalten war, die kolorimeterische Methode eindeutige Angaben lieferte.

#### Zusammenfassung

Eine verbesserte quantitative Bestimmung von Weinsäure in Bäckereiprodukten wird in Anlehnung an die Arbeiten von Rebelein vorgeschlagen.

Die Weinsäure kann sowohl frei als auch in Salzen oder Estern vorliegen. Die Erfassung erfolgt kolorimetrisch durch Farbreaktion der Weinsäure mit Ammoniumvanadat im sauren Milieu. Die genaue Einhaltung des pH-Wertes erwies sich als besonders wichtig. Zahlreiche Kontrollen belegen die Anwendbarkeit der Methode.

#### Summary

An improved method is suggested to quantitatively determine tartaric acid in bakery products, based on papers published by Rebelein.

The tartaric acid may occur both free and in saltes or esters. Detection is done by colorimetry through a colour reaction of the tartaric acid with ammonium vanadate in an acid environment. Accurate observance of the pH value proved to be of particular importance. Numerous checks testify to the method's applicability.

#### Résumé

On propose, en confirmation des travaux de Rebelein, un dosage amélioré de l'acide tartarique dans les produits de boulangerie.

L'acide tartarique peut aussi bien se trouver isolé que faire partie de sels ou d'esters. La détection se fait de façon colorimétrique par réaction colorée de l'acide tartarique avec du vanadate d'ammonium en milieu acide. L'observance rigoureuse de l'indice de pH s'est révélée être particulièrement importante. De nombreux contrôles ont justifié l'utilité pratique de la méthode.

An dieser Stelle möchte der Autor seinen Mitarbeitern, insbesondere aber Fräulein Glum und Fräulein Deike für umsichtige Arbeit und ihr Verständnis an vielen Einzelversuchen danken.

Den Firmen Atlas-Goldschmidt-AG, Essen; Dynamit-Nobel, Witten; Emulsions A/S Palsgaard, Juelsminde; Grindstedverket, Aarhus; Grünau GmbH, Illertissen; Uni-lever-Emery N.V., Gouda und Witco Chemicals, Paris, ist Dank zu sagen für die kostenlose Überlassung zahlreicher DAWE-Typen.

#### LITERATUR

- 1) Rohrlisch, M. und W. Essner: Untersuchung über die Bestimmung, Aktivierung und Hemmung der Milch- und Essigsäure bei der Sauerteiggärung. Brot u. Gebäck 5, (1951) 85-91.
- 2) Drews, E.: Über das Schicksal mehleigener organischer Säuren bei der Sauerteiggärung und den Einfluß der Mitverarbeitung von Citronen-, Wein- und Apfelsäure auf den Milch- und Essigsäuregehalt des Sauerteigbrottes. Brot u. Gebäck 15, (1961) 6, 105-113. Brot u. Gebäck, 15 (1961) 2, 33-45, 41-44.

- 3) *Drews, E.*: Nachweis von organischen Säuren und Konservierungsmitteln mit Hilfe der Papierchromatographie. *Getreide u. Mehl* **3**, (1953), 85–88, 90–91.
- 4) *El Gindy, M. M.* und *E. Drews*: Papierchromatographischer Nachweis organische Säuren in Backpulvern und Rührkuchen. *Brot u. Gebäck* **11**, (1957) **11**, 144–145.
- 5) *Brümmer, J.-M.* und *U. Klempin*: Vergleichende Milchsäurebestimmung in Backwaren. *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* **64**, (1968) **1**, 15–19.
- 6) *Rebelein, H.*: Kolorimetrisches Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Weinsäure und Milchsäure in Wein. *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* **57**, (1961) **2**, 36–41; **60**, (1964) **5**, 140–144; **63**, (1967) **11**, 337–340.
- 7) *Seher, A.* und *J. Jansen*: Untersuchung von Diacetylweinsäure-partialglyceriden. *Mittbl. GDCh-Fachgr. Lebensmittelchem. u. gerichtl. Chem.* **24**, (1970) **9**, 166.
- 8) *Brümmer, J.-M.* und *H.-D. Ocker*: Beobachtungen beim Nachweis von Diacetyl-Weinsäureester in Backrohstoffen. *Mittbl. GDCh-Fachgr. Lebensmittelchem. u. gerichtl. Chem.* **24**, (1970) **9**, 167–168.
- 9) *Ocker, H.-D.*: Privatmitteilung u. Jahresbericht 1971 der Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung in Berlin und Detmold, *Getreide, Mehl und Brot* **26** (1972) **4**, S. 121.
- 10) *Kröllner, E.*: Untersuchungen zum Nachweis von Emulgatoren in Lebensmitteln. *2. Mitt. Fette, Seifen, Anstrichmittel* **64**, (1962) **7**, 602–605.

*Institut für Lebensmittelchemie und -technologie der TU Berlin*

## Beitrag zur Analyse pflanzlicher Proteine: Proteine der Banane

Von *A. Askar* \*)

### Einleitung

Während die Proteinzusammensetzung in tierischen Lebensmitteln relativ gut erforscht ist, liegen bei den pflanzlichen Proteinen, abgesehen von Untersuchungen an Mais, Weizen, Bohnen, Kartoffeln und Erbsen, nur wenige Ergebnisse vor. Das hat vor allem zwei Gründe: einmal sind pflanzliche Proteine als solche humanmedizinisch bisher wenig interessant, zum zweiten ist die Aufarbeitung und Isolierung pflanzlicher Eiweißstoffe technisch meist schwierig.

*Koch* <sup>1)</sup>, *Koch* und *Schwahn* <sup>2)</sup> und *Meskhi* <sup>3)</sup> haben die Traubenproteine mittels Elektrophorese mit Stärke als Trägersubstanz in 1 bis 3 Hauptfraktionen getrennt. *Sahulka* <sup>4)</sup> hat eine ähnliche Methode verwendet und 18 Proteinfraktionen in Äpfeln festgestellt. Mit Hilfe der Disk-Elektrophorese an Polyacrylamidgel hat *Clements* <sup>5)</sup>, <sup>6)</sup> Eiweißextrakte aus verschiedenen Früchten zu trennen versucht. Über Bananen wurden einige Arbeiten über Enzymaktivitäten durchgeführt. So haben *Tager* und *Biale* <sup>7)</sup> die steigende Carboxylase- und Aldolaseaktivität während der Reifung gemessen. Phosphatase, Amylase <sup>8)</sup> und Pektinmethylesterase <sup>9)</sup> zeigten ebenfalls steigende Aktivität.

Zur Isolierung, Trennung und Charakterisierung der Bananenproteine wurden in der vorliegenden Arbeit die Gelfiltration an Sephadexgelen und die Disk-Elektrophorese an Polyacrylamidgelen herangezogen. Zusätzlich wurde die Aminosäurezusammensetzung der Bananenproteine ermittelt.

### Methoden

#### I. Isolierung von Bananenproteinen:

Zur Aufarbeitung von zerkleinerten Bananen wurde für je 500 g 0,5 ml Filtrationsenzym (Pektinol flüssig der Firma *Röhm & Haas*, Darmstadt) zugegeben und bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen, um Pektine bzw. Schleimstoffe, die die weitere Verarbeitung von Bananen erschweren, abzubauen. Nach Abfiltrieren und zweimaliger Extraktion des festen Rückstandes mit 2%iger NaCl-Lösung ließ sich ein klarer Saft gewinnen.

Zur Verhinderung einer oxydativen Bräunung wurde dem Saft eine Sulfidlösung zugesetzt. Die Trennung der Proteine von den niedermolekularen Anteilen erfolgte durch Gelfiltration, wozu eine Sephadex G-25-Säule 4 × 90 cm (*Pharmacia Fine Chemicals*, Schweden) Verwendung fand. Herstellung und Betrieb der Sephadexsäulen erfolgte nach Anweisung der Firma und nach den von *Determann* <sup>10)</sup> angegebenen Vorschriften.

Eine Probe von 50 ml Saft wurde auf die Säule gegeben und mit 0,1 ml NaCl-Lösung von pH 7,0 eluiert.

\*) Zur Zeit im Institut für Früchte- und Gemüsetechnologie der TU Berlin.

Die proteinhaltigen Fraktionen, die mit dem automatischen Fraktionssammler Ultrarag (*LAB*, Stockholm) gewonnen wurden, wurden durch Extinktionsmessungen im Spektralphotometer PMQ II (*Zeiss*, Oberkochen) bei 280 nm in 0,5 ml-Quarzküvetten gegen Wasser bestimmt. Die vereinigten Proteinlösungen wurden dann unter Vakuum bei 25°C in einem Rotationsverdampfer konzentriert und erneut auf die Säule gegeben. Die Trennung der Proteine von den hochmolekularen Anteilen erfolgte durch Fällung mit gestättigter Ammoniumsulfatlösung. Nach der Fällung wurde der Niederschlag abzentrifugiert und auf einer Sephadex G-25-Säule (3 × 40 cm) vom Ammoniumsulfat befreit. Die Proteinlösung wurde im Vakuum eingengt und durch eine dreitägige Dialyse von NaCl befreit.

#### II. Aminosäurezusammensetzung der Bananenproteine:

Die reinen Proteine wurden mit 6 n HCl (1:10 000) 24 Stunden lang hydrolysiert und die Aminosäuren zusammengeätzt durch Ionenaustauschchromatographie quantitativ bestimmt (*Hannig*-Apparatur <sup>11)</sup> der Firma *Bender & Hobein*, München). Die Herstellung der Pufferlösungen, des Ninhydrin-Reagenzes und des Aminosäure-Testgemisches sowie die Durchführung der Hydrolyse ist von *Askar* <sup>12)</sup> ausführlich beschrieben. Für die Bestimmung des Tryptophans, welches bei einer sauren Hydrolyse weitgehend zerstört wird <sup>13)</sup>, wurde die gleiche Probenmenge mit 15 ml 5 n NaOH unter Stickstoff im verschlossenen Bombenrohr bei 100°C 24 Stunden lang erhitzt. Die Farbreaktion und die spektrophotometrische Bestimmung wurden nach *Spies* <sup>14)</sup> durchgeführt.

#### III. Die Trennung an Sephadex G 100- und G 200-Säulen:

Die zu trennende Probe wurde in wenig 0,1 m NaCl-Lösung von pH 7 gelöst, auf eine Sephadex G-100- bzw. G-200-Säule (3 × 35 cm) gegeben und mit derselben Lösung eluiert. Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration erfolgte nach *Determann* und *Michel* <sup>15)</sup>. Die Methode basiert auf der linearen Abhängigkeit zwischen dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus der Molekulargewichte von globulären Proteinen.

#### IV. Die disk-elektrophoretische Trennung auf Polyacrylamidgel:

Als weiteres Verfahren zur Auftrennung des Bananenproteins und der durch die Gelfiltration gewonnenen Fraktionen wurde die Disk-Elektrophorese eingesetzt (Apparatur der Firma *Shandon*, Frankfurt/M.). Die Bereitung und Behandlung der Gele erfolgte nach den von *Maurer* <sup>16)</sup> und *Davis* <sup>17)</sup> angegebenen Vorschriften. Die Herstellung von Sammel- und Trenngel sowie das Färben und Entfärben ist von *Askar* <sup>12)</sup> ausführlich geschildert worden. Die Molekulargewichtsbestimmung mittels der Disk-Elek-