

Saf Humulon ve Trans - Izo - Humulon Üretimi ¹⁾

Doç. Dr. Oğuz KILIÇ

U.Ü.Z.F. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü — BURSA

GİRİŞ

Besleyici, serinlerici ve hafif alkollü bir içecek olan biranın karakteristik aromasını veren hammaddede şerbetçiotudur. Şerbetçiotu içerdiği acı asitler ve reçinelerle biranın acı tadını, bu acı asitlerin oksidasyon ve parçalanma ürünleri ve kısmen de uçucu yağlar biranın aromasını oluşturur. Acı asitler ve reçineler grubu içerisinde acılık gücü en yüksek olan fraksiyon, eskiden humulon adı ile bilinen fakat daha sonra benzer yapıda 5 madde (humulon, kohumulon, adhumulon, prehumulon, posthumulon) içerdiği saptanan alfa - asitleridir. Alfa - asitleri geçmişte pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Günümüzde de hem bira kimyası hem de ilaç sanayii ile ilgili araştırmalara konu olmaktadır. Alfa asitlerinin % 35 - 70'ini humulon oluşturmakta ve bu madde hem bira kimyası ile ilgili araştırmalarda, özellikle kromatografik analizlerde standart madde olarak, hem de türevlerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır.

Saf humulon oldukça pahalı bir madde olduğundan, ve üretim yöntemi literatürde belirtilmediğinden bu konuda çalışanlara yardımcı olmak amacıyla şerbetçiotu ve şerbetçiotu ekstraktından saf humulon üretimini, ayrıca humulonun suda çözünen formu olan ve üretimi tamamlanmış biraya acılık vermek amacıyla dinlendirme sırasında doğrudan katılabilen trans - humulon üretimini aşağıda özetlenmiş bulunmaktadır.

ŞERBETÇİOTU EKSTRAKTINDAN HUMULON ELDE OLUNMASI

% 30 - 40 α - asidi içeren şerbetçiotu ekstraktı alınır. Önce konduktometrik yöntemle ekstraktın α - asidi miktarı tayin edilir. 0.3 N Na_2CO_3 çözeltisi hazırlanır. Ekstraktan α - asidi miktarı % 2 olacak şekilde (2 g/100 ml) alınarak izooktan veya heksan içerisinde solus-

yon hazırlanır. Büyükçe bir ayırma hunisine 3 hacim Na_2CO_3 çözeltisi, 1 hacim ekstrakt solusyonu (örneğin 3 litre + 1 litre) konur. 15 - 20 dakika iyice çalkalanır ve ayrılmaya bırakılır. Ayrılma sonunda su fazı (Na_2CO_3 çözeltisi) β - asitlerini ve klorofil gibi diğer maddeleri, organik faz ise α - asitlerini ve bazı maddeleri içerecektir. Çalkalama işleminden sonra karışımın pH'sı H_2SO_4 ile pH kağıdı kullanılarak pH = 1 - 2 arasına getirilir. H_2SO_4 ilavesi sırasında CO_2 çıkıp kabın basıncı arttığından dikkatli olmak gerekir. Bu nedenle H_2SO_4 partiler halinde verilir ve her çalkalamadan sonra kapak hafifçe açılarak fazla CO_2 'inin dışarı çıkması sağlanır. Her keresinde pH kağıdı ile kontrol edilerek gerekiyorsa H_2SO_4 ilave edilir. Diğer taraftan eğer H_2SO_4 bir kerede verilirse α - asidin tamamı organik faza geçmez CO_2 çıkışı giderek azalır ve sonunda durur. Ayrıca CO_2 çıkışının azalması pH'nın düşmesi hakkında da fikir verir.

Su fazı ayrılarak alınır. β - asitleri gerekli olacaksa bu faz atılmaz saklanır, aksi takdirde dökülür. Organik faz uygun bir balona alınır. Şerbetçiotu ekstraktı kıvamında olana dek buharlaştırılarak koyulaştırılır (vakumla düşük sıcaklıkta). Elde olunan ekstraktın içerisinde bir miktar organik çözücü kalır fakat bunun zararı yoktur. Sonra balondan bir miktar alınarak konduktometre ile α - asitleri tayin edilir.

α - asitleri miktarı bilinen bu ekstraktan 100 g α - asidine eşit olan miktarda tartılır ve benzen içerisinde çözündürülerek 1 litreye tamamlanır. Çözelti dikkatli bir şekilde 50°C 'a ısıtılır. Üzerine α - asidine ekialan miktardan yaklaşık % 10 fazla olacak şekilde O - fenilendiamin [$\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2 = 108.14$ g] ilave edilir. Örneğin α - asidine eşdeğer miktar 108 g ise $103 + 10 = 118$ g ilave edilebilir. O - fenilendiamin tartıldıktan sonra spatül ile doğrudan kristal şekilde ilave edilir ve iyice çalkalanır.

1) Aktarılan bilgi Gent Üniversitesi (BELÇİKA) Organik Kimya Bölümündeki uygulamaya dayanmaktadır.

Karıştırma sırasında spatül çözeltiliye daldırılmaz ve çözeltili herhangi bir metal ile temas ettirilmez. En iyisi manyetik karıştırıcı kullanmaktır.

O - fenilendiamin çözüntükten sonra çözeltili oda sıcaklığına soğuması için yaklaşık 1 saat kendi haline bırakılır, soğutucu kullanılmaz. Daha sonra çözeltili soğutucuya alınır ve yaklaşık olarak 0°C'a soğutulur. Çözeltili 0°C'a soğuduktan sonra 24 saat daha bu sıcaklıkta bırakılır. Bu sürenin sonunda sarı kristaller oluşur. Çözeltili cam filtreden (No = 2 yeterli) süzülerek kristaller ayrılır ve soğuk (0°C) benzen ile bir kez yıkanır. Kristaller soğuk benzen'de çözünmez. Filtre üzerinde kalan kristaller bir behere aktarılır ve üzerine oda sıcaklığında bulunan benzen ilave edilerek yavaş yavaş ve çok dikkatli bir şekilde 50°C'a kadar alttan ısıtılır. Kristallerin tamamı çözüldüğü zaman verilen benzenin yeterli olduğuna karar verilir. Benzen miktarı genellikle 500 ml civarında olmaktadır. İlk kullanılan benzen miktarı kaydedilmelidir. Çünkü toplam 7 kez tekrarlanacak kristalizasyon işleminde kullanılacak benzen miktarı giderek azalacaktır (550, 500, 450 ml benzen gibi). Kristaller benzen'de çözüldükten sonra 1 - 2 saat oda sıcaklığında bırakılır, daha sonra soğutucuda 0°C'te 24 saat bırakılır, tekrar filtre edilir. Bu işlemler aynen 7 kez tekrarlanarak 7 günde tamamlanır. Yedinci kristalizasyondan sonra α - asitleri ve O - fenilendiamin kompleksi elde olunur. Kristal kompleksi vakumlu desikatörde parafin üzerinde kurutulur. Parafin benzeni absorbe eder. Kompleks içerisinde α - asitlerinin moleküler karşılığı kadar O - fenilendiamin bulunur. α - asitleri içerisinde % 0.2 kadar kohumolon bulunabilir. Bu kompleks 7. kristalizasyondan sonra buzdolabında yıllarca bozulmadan kalabilir.

Saf humulon'un eldesi : Saf humulon gerektiğinde yukarıda elde olunan kompleksten örneğin 10 g alınır ve ayırma hunisi içerisine konulur. Üzerine eriyene kadar eter ilave edilir. Kullanılan eter saf olmalı peroksit içermemelidir. Peroksit α - asitleri ile reaksiyona girer. Kullanılacak eterin saflığından şüpheleniyorsa, eter bir balona konularak içerisine 2 g/litre kadar hidrokinon konur ve % 10'u balonda kalana kadar damıtılıp kullanılır.

Ayırma hunisine 10 g kompleks için 100 ml 2N HCl ilave edilir. İyice çalkalanır ve fazlar ayrılmaya bırakılır. Eter fazı sarı renkte üstte toplanır, su fazı ise kahverengimsidir. Su fazı ayrılarak uzaklaştırılır. Kalan eter fazı iki kez hacminin üçte biri kadar 0.01 N HCl ile yıkanır. Böylece humulon dışında kalan α - asitleri büyük ölçüde ayrılmış olur. Ayrılan eter fazı uygun bir balon içerisinde vakum uygulanarak ve 50°C'in altında buharlaştırılır. Balonda kalan kısım tam saf olmayan humulon'dur. Elde olunan bu humulon pekçok analizler için kullanılabilir. Ancak içerisinde bir miktar kohumolon ve diğer α - asitleri bulunduğundan kromatografik analizlerde kullanılabilmek için bunu asetik asit (% 99 saf) içerisinde tekrar kristalize etmek gerekir. Bu amaçla bir behere 10 g alınır ve üzerine 11 ml saf asetik asit ilave edilir. Isıtıcı üzerine yerleştirilmiş bir su banyosu içerisine oturtularak 50°C'ı geçmeyecek şekilde dikkatle ısıtılır. Bu arada manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Berrak bir çözeltili elde olunur. Karışım 50°C sıcaklıkta iken bir damla saf su damlatılır. Karışım bulanır, biraz sonra açılır. Tekrar damlatılır ve bu işlem sürdürülünce örneğin 7 - 8 damla sonra çözeltili bulanık hale gelir ve artık açılmaz, bu durumunu sürdürür. Bu anda bir damla asetik asit ilave edilir. Eğer çözeltili berraklaşırsa beklenir, tekrar bulandığı görülür. Bu kez asetik asit damlatma işi çözeltili berrak kalana kadar sürdürülür. Çözeltilinin berrak kaldığından emin olununca beher plastik bir folya ile kapatılır, karıştırma durdurulur ve aynı su banyosu içerisinde kristalleşmeye bırakılır. Oda sıcaklığına gelince su banyosundan soğutucuya, 2 - 3 saat sonra da derin soğutucuya nakledilir. Burada bir gece bırakılır. Ertesi gün alınarak cam filtreden vakum yardımıyla süzülür. Bir miktar damıtık su ile yıkanır. Filtrenin altında koyu sarı ve koloidal bulanık bir çözeltili oluşur. Bu çözeltili içerisinde α - asitleri bulunmaktadır, fakat kohumolon içeriği yüksektir. Eğer toplam α - asitleri olarak herhangi bir şekilde kullanılması söz konusu ise atılmaz, toplanıp kristalize edilerek soğutucuda saklanır. Yıkama işlemi sonunda filtre üzerine konan humulon miktarı azalır, örneğin 10 g konuldu ise 8 g kalabilir. Yıkama işlemi tekrarlanırsa miktar daha da azalır. Fa-

kat eğer buraya kadar anlatılan işlemler dik-katli ve temiz koşullarda yürütülürse 1 kez yıkama yeterlidir. Yıkama bitince kristaller pet-ri kabına alınır ve altında sodyum hidroksit bulunan ve vakum uygulanan bir desikatör içe-risinde karanlık bir yerde 2-3 gün kurumaya bırakılır. Kuruması tamamlanan saf humulon derin soğutucuda saklanır.

ŞERBETÇİOTUNDAN HUMULON ELDE OLUNMASI

Şerbetçiotundan humulon elde olunması da esas olarak ekstraktan elde olduğu gibidir. Ancak elde ekstrakt bulunduğu işlemin kı-saltılması yönünden tercih edilir. Şerbetçiotun-dan ekstrakt elde olunacağı zaman altı mus-luklu ve yaklaşık 15 l hacimli bir kolona ge-rek duyulur. Bu kolonun alt kısmına bir mik-tar cam pamuğu onun üzerinede 1 kg öğütül-müş şerbetçiotu için 200 g silikagel konur. 1 kg öğütülmüş şerbetçiotu 10 l benzen ile ayrı bir kapta ekstrakte edilir ve elde olunan ekstrakt kolona verilip yavaş yavaş süzülür. Kolondaki silikagel, şerbetçiotu benzen ekstrak-tından klorofil ve benzeri maddeleri ayırır. Alı-nan benzen ekstraktı 50°C'ı aşmaksızın vakum yardımı ile koyulaştırılarak benzenin hemen hemen tamamı uzaklaştırılır ve bir litrelik er-lene alınarak üzerine 250 ml metanol ilave edilip karıştırılır. Karışım soğutucuya alınarak 1-2 saat bırakılır, bu arada balmumu madde-leri çöker. Üstte kalan kısım santrifüj tüpleri-ne alınarak santrifüj edilir, böylece kalan bal-mumu maddeleri de çöker. Berrak kalan üst kısımlar bir kapta birleştirilir. Elde olunan me-tanol ekstraktından 1 ml alınarak kondukto-metre ile α -asitleri miktarı tayin edilir. Me-tanol ekstraktında bulunan α -asitlerinin ta-mamını bağlayacak kurşun asetat miktarı he-saplanır ve % 5 fazlasıyla metanoldeki derişik çözültisi halinde ekstrakta ilave edilir. α -asit-leri kurşun asetatla kanarya sarısı renginde kurşun humulat oluşturarak çöker. Karışım santrifüje edilerek çökme işi hızlandırılır. Bu sırada eğer tüplerin cidarına yapışmış balmu-mu maddeleri görülüyorsa bu tüpler yenileri ile değiştirilir. Çökmeden sonra tüplerin üze-rinde kalan sıvı kısım dökülür ve 3 kez çökelti yeterli miktarda metanol ilave edilerek karış-

tırılır, santrifüj edilir ve üstte kalan metanol tabakası dökülerek yıkanır. Böylece santrifüj tüplerinde yıkanmış kurşun humulat (α -asitleri kurşun tuzu) kalır. Bunun üzerine sarı renk kaybolana kadar sülfirik asidin metanol içeri-sinde hazırlanmış % 5'lik eriyiği verilir. α -asit-leri açığa çıkar, kurşun sülfat tuzu çöker. Tüp-ler tekrar santrifüj edilir ve üstte kalan me-tanol tabakaları bir ayırma hunisi içinde bir-leştirilir. α -asitlerini içeren metanol hacmi-nin 3 katı benzen ilave edilir. İyice çalkalanır. Sonra metanol hacminin en az 2.5 katı saf su ilave edilir, tekrar çalkalanır. 10 N H₂SO₄ kul-lanılarak karışımın pH'sı 1-2 arasına getiri-lir. Fazlar ayrılmaya bırakılır. Bu durumda α -asitleri benzen fazına geçmiştir. Metanol -su fazı ayrılır. Benzen fazının α -asidi miktarı konduktometre ile tayin edilir. Toplam benzen fazında bulunan α -asitlerine ekivalan olanın % 10 fazlası miktarda O-fenilendiamin ilave edilir. İşlemin bundan sonrası şerbetçiotu ekstraktından humulon elde olunmasında oldu-ğu gibidir.

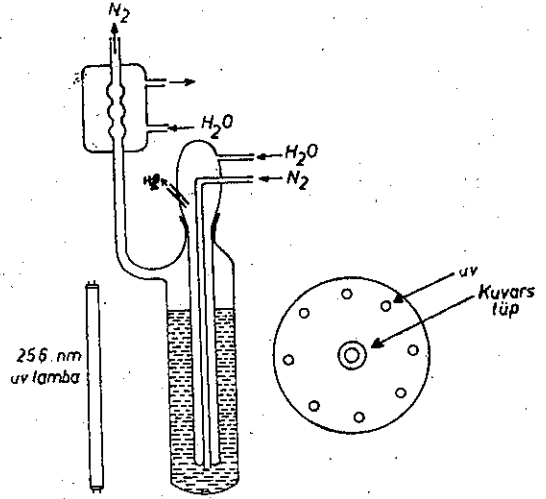
TRANS - İZO - HUMULON ELDE OLUNMASI

Trans - izo - humulon, humulonun metanol-deki % 1-3'lük eriyiğinin ultraviyole ışınla-riyle aydınlatılıp fotoizomerizasyonu ile elde olunur. Bu amaçla 2 g saf humulon alınır. Saf humulonun kullanılması istenmiyorsa eterle kristalizasyon işleminden sonra elde olunan ve bir miktar kohumulon içeren humulon da kullanılabilir. Üzerine 200 ml metanol ilave edi-lir ve eritilir. Eriyik şekil 1'de yandan ve üst-ten kesiti görülen izomerizasyon aletinin ku-vars tüpüne doldurulur. Kuvars tüpün orta kıs-mına, içerisinde buzlu su devredecek ve N₂ ga-zının humulon eriyiği içerisinden geçişini sağ-layacak normal camdan yapılmış tüp soğutucu yerleştirilir. Gerekli boru bağlantıları yapıldık-tan sonra kuvars tüp, üstü açık silindir şeklin-deki ve içerisinde dik olarak yerleştirilmiş 8 adet ultraviyole (256 nm) lambası bulunan alete yerleştirilir. Soğutmanın amacı ısınma dolayısıyla oksidasyonu önlemektir. N₂ gazı ise eriyiğin karışarak hertarafının eşit şekilde ultraviyole ışınlarına maruz kalmasını sağlar.

Soğutma suyu, azot gazı ve ultraviyole lambalar açılarak eriyikteki humulon 24 saat

fotoizomerizasyona bırakılır. Bir ayırma hunisine alınan eriyik üzerine 500 ml saf su ve 200 ml heksan ilave edilir (heksan yerine izo-oktan kullanılabilir). İyice karıştırılıp HCl ile $\text{pH} = 2$ 'ye asitlendirilir. Tekrar iyice karıştırılıp fazlar ayrılmaya bırakılır. Trans- izo - humulon organik (heksan veya izo - oktan) tabakaya geçmiştir. İçerisinde başka maddelerde bulunan bu tabaka ayrılarak alınır. Bir balon içerisinde, vakum altında ve 50°C 'tan aşağı sıcaklıklarda buharlaştırılarak, koyulaştırılır ve çok az heksan ile yıkanarak küçük bir behere alınır. Kahverengi bir eriyik elde olunur. Biraz heksan ilave edilerek su banyosunda 50°C 'a ısıtılır, homojen duruma geldikten sonra derin derin soğutucuya konularak 24 saat bekletilir. Eğer iyi bir fotoizomerizasyon sağlandı ise eriyik içerisinde uzun ve beyaz kristaller oluşur. Aksi takdirde kristalizasyon 2-3 gün sürebilir. Kristalizasyon oluştuğundan sonra karışım, küçük cam filitre üzerinde metal olmayan spatül yardımıyla filitre edilip derin soğutucuda bekletilmiş heksan ile yıkanır. Filitre üzerinde kalan kristaller küçük bir balona alınarak vakumla kurutulur. Kullanılan cam filitre ve spatül'de

plastik bir torba içerisinde derin soğutucuda muhafaza edilir. Filtrasyon işlemi çok çabuk yapılmalı, ısınmaya fırsat verilmemelidir. Kristalizasyon işlemi üç kez tekrarlanır. Sonuçta yaklaşık 0.5 g saf trans - izo - humulon elde olmaktadır.



Şekil 1. İzomerizasyon aletinin yandan ve üstten kesiti

M

MEYKOSAN

MEYVE KONSERVELERİ SANAYİ VE TİCARET A.Ş.

**Meyve-Sebze Domates Konsantre
Konserveleri + Ürünleri + Pulplar ve**

İMALÂT-İHRACAT

MERKEZ

Kavaklıdere Güfte sok.12/7 Ankara
telex:42462 deku tr. tel:25 26 33-18 56 70

FABRİKA

Derinkuyu-Nevşehir
TEL: 62