

**VĚDECKÝ
ČASOPIS**



Potravinářské vědy

1

**ROČNÍK 9
PRAHA
BŘEZEN 1991
CENA 32 Kčs
ISSN 0232-0568**

**ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ**

Řídí redakční rada: ing. Zeno Šimůnek, CSc. (předseda), ing. Miloslav Adam, CSc., ing. Luisa Benešová, prof. ing. Dušan Čurda, CSc., ing. Jiřina Houšová, CSc., ing. Vladimír Hušek, CSc., prof. ing. Ivo Ingr, DrSc., ing. Milan Kováč, CSc., prof. ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. ing. Alexander Příbela, DrSc., doc. ing. Mojmír Rychtera, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc., ing. Jaroslav Vígner, CSc.

Vedoucí redaktorka RNDr. Marcela Braunová.

OBSAH

Fukal L.: Kombinace rychlé extrakce na pevné fázi a imunometody při stanovení velmi nízkých koncentrací aflatoxinu M_1 v mléku	1
Rauch P., Rychetský P., Hochel I., Voldřich M., Bílek R., Guesdon J.-L.: Enzymová imunoanalýza histaminu v potravinách	9
Brát J., Hauer E., Marr R., Hartl J.: Využití reaktivní extrakce při získávání kyseliny mléčné z fermentačního bujónu	17
Vrbová E., Marek M., Kleidus S.: Enzymové elektrody pro stanovení L-laktátu	23
Pípek P., Sinevič V.: Změny reologického chování masa v závislosti na stupni desintegrace a na vnějších podmínkách	33
Loučka M., Vinklárková M.: Optimalizace procesu kontinuální sterilace a pasterace	45
Ostrý V., Ruprich J., Knesel L., Polster M.: Testování toxigenity kmenů <i>Penicillium camemberti</i> : stanovení cyklopiazonové kyseliny	55

PŘEHLEDY

Rauch P.: Značené sloučeniny při sledování složek potravin	65
--	----

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Davídková E., Holasová M., Pařízková H.: XXI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin	71
--	----

RECENZE

Pokorný J.: Z. E. Sikorski (Ed.) — Seafood: Resource, nutritional composition, and preservation	75
Pokorný J.: F. Molnár (Ed.) — Quality assurance in food and related consumer goods industry	76

СОДЕРЖАНИЕ

Фукал Л.: Комбинация быстрого экстрагирования на прочной фазе и иммунометода при определении очень низких концентраций афлотоксина M_1 в молоке	6
Раух П., Рыхетски П., Гохел И., Волдржих М., Билек Р., Гуседон Й. Л.: Ферментативный иммуноанализ гистамина в пищевых продуктах	15
Брат Й., Гауер Э., Марр Р., Гартл Й.: Использование реактивной экстракции при получении молочной кислоты из ферментативного бульона	21
Врбова Э., Марек М., Клайдкс Б.: Ферментные электроды, нужные для определения L-лактата	31
Піпек П., Синевич В.: Изменение реологического поведения мяса в зависимости от степени дезинтеграции и от внешних условий	43
Лоучка М., Винкларкова М.: Оптимизация процесса проточной стерилизации и пастеризации	53
Остры В., Рупрых Й., Кнесел Л., Полстер М.: Тестирование токиногенетичности штаммов <i>Penicillium camemberti</i> : определение циклопиазоновой кислоты	62

KOMBINACE RYCHLÉ EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI A IMUNOMETODY PŘI STANOVENÍ VELMI NÍZKÝCH KONCENTRACÍ AFLATOXINU M_1 V MLÉKU

L. Fukal

FUKAL, L. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha): *Kombinace rychlé extrakce na pevné fázi a imunometody při stanovení velmi nízkých koncentrací aflatoxinu M_1 v mléku*. Potravinářské Vědy, 9, 1991, (1): 1–7.

Pro stanovení aflatoxinu M_1 v mléce byla zkombinována extrakce na reverzní fázi (SEP-PAK C_{18} nebo SILICA-cart C_{18}) s radioimunochemickou kvantifikací. Ve srovnání s přímým radioimunochemickým stanovením bylo dosaženo nižší hodnoty detekčního limitu (30 ng/l vs. 3 ng/l), uspokojivé návratnosti analytu (80–90 procent) a reprodukovatelnosti (průměrný variační koeficient 6,4 % vs. 11,1 %) za nepříliš zvýšené pracnosti. Metoda umožňuje kontrolu nezávadnosti mléka z hlediska obsahu aflatoxinu M_1 podle nejprísnejších zahraničních hygienických norem.

aflatoxin M_1 ; extrakce na reverzní fázi; imunochemické stanovení; mléko

Je-li dojnicím podáváno krmivo kontaminované aflatoxinem B_1 , objevuje se v jejich mléku v nízkých koncentracích hydroxyderivát — aflatoxin M_1 (Polan et al., 1974; Applebaum et al., 1982). Vzniká v hepatocytech oxidativní metabolizací enzymy mikrosomální frakce. Akutní toxicita aflatoxinu M_1 (AFM₁) je ekvivalentní toxicitě aflatoxinu B_1 , zatímco kancerogenní a mutagenní účinky AFM₁ jsou značně nižší. V mléku lze AFM₁ prokázat asi za 12 hodin po podání kontaminovaného krmiva, a celkové množství AFM₁ vyloučeného mlékem představuje 0,2 až 3 % z přijatého množství aflatoxinu B_1 , v závislosti na fyziologickém stavu, množství přijatého krmiva, dojivosti a dalších faktorech (Patterson et al., 1980; Price et al., 1985; Frobish et al., 1986; Munksgaard et al., 1987).

Hygienické předpisy ČSFR stanoví, že koncentrace AFM₁ v tekutém mléku nesmí přesahovat 500 ng/l a v mléčné kojenecké výživě 100 ng na 1 litr obnoveného mléka (Anonym, 1986). V řadě evropských států jsou ale tolerované hladiny AFM₁ v mléku ještě několiknásobně nižší (pro běžné tekuté mléko 100 ng/l — Belgie, 50 ng/l — Rakousko, SRN, Švýcarsko, Holandsko, Švédsko; pro mléčnou kojeneckou výživu 50 ng/l — Holandsko, 10 ng/l — Rakousko, SRN, Švýcarsko (Van Egmond, 1989)). Zavedení kontroly dodržování nezávadnosti mléka z hlediska obsahu AFM₁ je závislé na rutinním zvládnutí dostatečně citlivé analytické metody. Klasický postup zahrnující extrakci mléka organickými rozpouštědly, čištění extraktu a kvantifikaci po chromatografickém rozdělení je při požadavku vysoké citlivosti velmi pracný a zdlouhavý (Bartoš, Matyáš, 1978; Adensam et al., 1987; Scott, 1989).

Vzhledem k tomu, že se podařilo připravit protilátky proti AFM₁ (Harder, Chu, 1979; Dixon-Holland et al., 1988), lze při velkoplošném monitorování hladiny AFM₁ v mléce vkládat určité naděje do imunochemických metod (Pestka et al., 1981; Hu et al., 1984; Rauch et al., 1987). V ČSFR jsou vyráběny analytické soupravy umožňující poměrně jednoduše stanovit koncentraci AFM₁ v mléce 50 ng/l pomocí radioimunochemické metody (Fukal, 1988; Fukal et al., 1990). S perspektivou, že i v naší republice v budoucnu mohou být snižovány nejvyšší tolerované hladiny AFM₁ v mléce, byla v předkládané práci kombinována jednoduchá extrakce mléka na pevné fázi s radioimunochemickou kvantifikací. Bylo tak dosaženo výrazně nižšího detekčního limitu analytické procedury.

MATERIÁL A METODY

Standard AFM₁ byl izolován dr. Jiřím Ruprichem, CSc., z IHE Brno (Piskač, Ruprich, 1983). Pro extrakci AFM₁ z mléka na pevné reverzní fázi byly použity kolonky SEP-PAK C₁₈ (Waters Assoc., Milford, USA) a kolonky SILICA-cart C18 (Tessek Ltd., Praha). Radioimunochemicky byl AFM₁ stanovován pomocí analytických souprav (RIA-test-aflatoxin M₁B₁) z Ústavu radioekologie a využití jaderné techniky v Košicích.

Princip radioimunochemického stanovení (RIA) je založen na kompetitivní interakci aflatoxinu značeného s ¹²⁵I a aflatoxinu ze vzorku s omezeným počtem vazebných míst na specifické protilátce. V soupravě použité králíčí anti-aflatoxinové antisérum má následující křížové reakce s jednotlivými typy aflatoxinů: 76 % s AFM₁, 100 % s AFB₁, 29 % s AFB₂, 52 % s AFG₁, 7 % s AFG₂, 21 % s AFM₂. Vysoká afinita antiséra k AFB₁ a AFM₁ dovoluje použít derivát AFB₁ značený pomocí ¹²⁵I jako radioindikátor a současně AFM₁ jako standard. To má značný ekonomický přínos pro výrobce (produkce AFM₁ je mnohonásobně dražší ve srovnání s AFB₁) při zachování dobrých parametrů soupravy. Afinita antiséra k AFB₁ v reálné analytické praxi nezkrsluje stanovení AFM₁. Při příjmu malého množství AFB₁ (do 100 µg/kg krmiva) je mlékem vylučován pouze AFM₁. Pokud je dojnicím podáno větší množství AFB₁, je poměr mlékem vylučovaného AFM₁ a AFB₁ okolo 10:1 (Stubblefield et al., 1983; Trucksess et al., 1983). To znamená, že nepřevyšuje-li v vzorku mléka stanovená koncentrace pomocí RIA nejvyšší tolerovanou mez 500 ng/l, je přítomen a stanovován pouze AFM₁. V případě velmi vysokého obsahu aflatoxinů v mléku by byla stanovována přibližná suma AFM₁ a AFB₁.

Pracovní postup radioimunoanalýzy

Do polystyrenových zkumavek bylo pipetováno 0,1 ml standardu AFM₁ (nebo vzorku mléka popř. jeho extraktu), 0,1 ml precipitačního antikrálíčího antiséra, 0,1 ml králíčího anti-AFM₁-antiséra, 0,1 ml radioindikátoru (všechny reagenty byly ředěny 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,5). Po důkladném promíchání byl obsah zkumavek inkubován při laboratorní teplotě 18 °C. Potom bylo do zkumavek přidáno 0,1 ml 2% roztoku hovězího gama-globulinu a 1 ml 7% roztoku polyethylenglykolu 6000 vychlazeného na 4 °C. Při následné inkubaci (60 min, 4 °C) vytvořený precipitát byl separován v chlazené odstředivce (30 min, 2500xg). Po odsátí supernatantu byla radioaktivita precipitátu měřena na gama-automatu NA 3601 (Tesla, Liberec). Kalibrační křivka byla konstruována v rozsahu 31–1000 ng/l. V případě přímého stanovení v mléku bez extrakce byl pro účely kalibrace standard AFM₁ rozpuštěn v mléku, zatímco v případě RIA AFM₁ po extrakci mléka na pevné fázi byl standard AFM₁ rozpuštěn ve 20% roztoku methanolu ve fosfátovém pufru s 0,5% kaseinem. Relativní hodnoty poměru radioaktivity konkrétního standardu a specifické vazby systému (B/B₀) byly vynášeny proti hodnotám logaritmu koncentrace standardu AFM₁, popř. při počítačovém zpracování v transformaci souřadnic logit-log (Fukal et al., 1987). Hodnoty specifické nulové vazby (v nepřítomnosti aflatoxinu) se pohybovaly v rozmezí 30–38 %, hodnoty nespecifické vazby (v nepřítomnosti antiséra) v rozmezí 6–8 %.

Extrakce na kolonkách SEP-PAK C₁₈

Byly přizpůsobeny dříve popsané postupy (Winterlin et al., 1979; Carisano, Della Torre, 1986). Před použitím kolonek byla jejich náplň promyta 5 ml vody, 10 ml acetonitrilu a 10 ml vody za použití injekční stříkačky (rychlost průtoku asi 10 ml za minutu). Potom se pomocí injekční stříkačky nechal protéct kolonkou roztok 10 ml odstředěného mléka a 10 ml vody. Kolonka byla promyta 5 ml vody a 10 ml 10% roztoku acetonitrilu ve vodě. AFM₁ byl eluován po vysušení kolonky proudem vzduchu pomocí 10 ml acetonitrilu. Eluát byl odpařen do sucha za mírného probublávání dusíkem při 40 °C a získaný odparek byl rozpuštěn v 0,2 ml methanolu. Před imunochemickým stanovením bylo k methanolovému roztoku přidáno 0,8 ml 0,05 M fosfatového pufru pH 7,0 s 0,5% kaseinem.

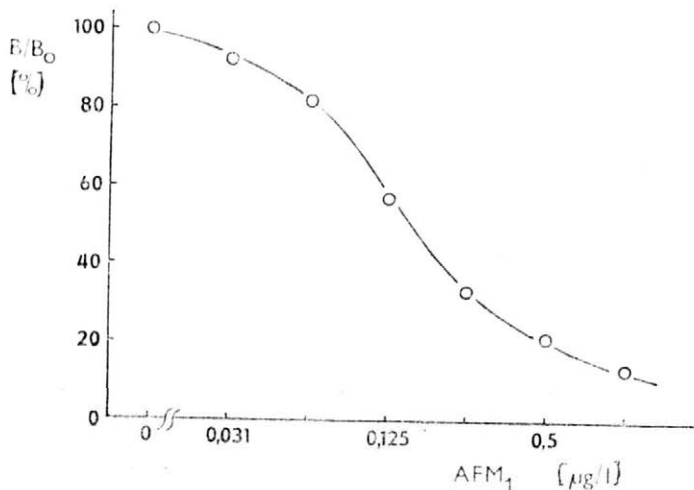
Extrakce na kolonkách SILICA-cart C18 (Adensam et al., 1989)

Před použitím se kolonky promyjí 10 ml methanolu a 10 ml vody. Roztok 10 ml mléka a 10 ml vody se pomocí injekční stříkačky nechá protéct kolonkou. Kolonka se promyje 5 ml vody, vysuší proudem vzduchu pomocí vodní vývěvy, a ještě promyje 10 ml n-hexanu. Z vysušené kolonky se AFM₁ eluuje 6 ml směsí dichlormethan:aceton (95:5). Rozpouštědlo se odpaří na rotačním vakuovém odpařováku, odparek se rozpustí v 0,2 ml methanolu a přidá se 0,8 ml 0,05 M fosfatového pufru pH 7,0 s 0,5 % kaseinu. V tomto roztoku se stanovuje AFM₁ pomocí RIA.

Recovery, kapacita a možnost opakované použitelnosti kolonek při stanovení AFM₁ v mléce byly testovány se dvěma vzorky mléka, ke kterým bylo přidáno známé množství standard AFM₁ v acetonitrilu do výsledné koncentrace 520 ng/l (A) a 20 ng/l (B). Připravený vzorek byl podle výše popsaných postupů extrahován na kolonce a výtok z první kolonky pak ještě extrahován na další kolonce. Koncentrace AFM₁ byla stanovena pomocí RIA vždy před nanesením na 1. kolonku, po extrakci z ní, a po extrakci z 2. kolonky.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Typická kalibrační křivka přímého radioimunochemického stanovení AFM₁ v neextrahovaném mléce je znázorněna na obr. 1. Detekční limit metody je okolo 30 ng/l. Při platnosti současných československých hygienických předpisů je tato citlivost postačující pro účely kontrolních analýz. Přestože citlivější přímé imunochemické stanovení AFM₁ nebylo



B = vázaný radioligand v přítomnosti známé koncentrace neznačeného aflatoxinu M₁ — bound tracer in the presence of a known concentration of unlabelled aflatoxin M₁, B₀ = vázaný radioligand v nepřítomnosti neznačeného aflatoxinu — bound tracer in the absence of unlabelled aflatoxin

1. Příklad standardní křivky pro přímé radioimunochemické stanovení aflatoxinu M₁ v mléce — An example of standard curve for direct radioimmunochemical assays of aflatoxin M₁ in milk

dosud popsáno (P e š t k a et al., 1981), při monitorování nižších hladin AFM₁ v mléce je nezbytné vzorek extrahovat a AFM₁ v extraktu nakoncentrovat. Pro tyto účely je vhodné použití komerčních kolonek s reverzní fází. Oba testované typy kolonek (SEP-PAK C₁₈ zahraničního výrobce a SILICA-cart C18 od domácího dodavatele) umožňují relativně rychlou a na množství vzorku i organických rozpouštědel nenáročnou extrakci. Spřažením této extrakce na pevné fázi s radioimunochemickou kvantifikací se dosáhne detekčního limitu okolo 3 ng/l.

Z tab. I je zřejmá uspokojivá návratnost AFM₁ z obou typů kolonek (80–90 %), extrakční kapacita postačující na reálné vzorky a možnost opakovaného použití kolonek k extrakci dalších vzorků mléka. Ani po páté extrakci mléka na kolonce nenarůstá znatelně tlak potřebný na protečení vzorku kolonkou. Reprodukovatelnost výsledků je při použití extrakce na kolonkách značně horší než při samotné RIA (tab. II), ale pro účely screeningové kontroly je to naprosto postačující. Při porovnání výsledků stanovení AFM₁ ve vzorcích mléka pomocí tří testovaných metod nebyly zjištěny zásadní rozdíly (tab. III). Výhoda kombinovaných postupů extrakce na pevné fázi s imunostanovením proti přímému imunostanovení spočívá v podstatně nižším detekčním limitu. Ve srovnání

I. Ověření recovery, kapacity a opakované použitelnosti kolonek při stanovení AFM₁ v mléce — Checks of the recovery, capacity and repeated use of columns in the course of AFM₁ assays in milk

Druh kolonky	Koncentrace AFM ₁ (ng/l) stanovená pomocí RIA ve vzorku mléka					
	A			B		
	I	II	III	I	II	III
SEP-PAK C ₁₈ (nová)	520	447	<3	20	17	<3
SILICA-cart C18 (nová)	520	426	<3	20	17	<3
SEP-PAK C ₁₈ (4krát použitá)	520	482	<3	20	16	<3
SILICA-cart C18 (4krát použitá)	520	475	<3	20	18	<3

I = před nanesením na 1. kolonku, II = po extrakci z 1. kolonky, III = po extrakci z 2. kolonky

I = before application to 1st column, II = after extraction from 1st column, III = after extraction from 2nd column

II. Reprodukovatelnost analýz pro koncentraci AFM₁ v mléce 125 ng/l a 10 ng/l — Reproducibility of analyses for AFM₁ concentrations in milk 125 ng/l and 10 ng/l

Typ analýzy	Variační koeficienty při			
	intra-assay		inter-assay	
	125 ng/l	10 ng/l	125 ng/l	10 ng/l
RIA	5,2 %	—	7,5 %	—
SEP-PAK + RIA	9,4 %	16,8 %	11,2 %	15,7 %
SILICA-cart + RIA	10,2 %	18,4 %	13,4 %	22,3 %

III. Stanovení aflatoxinu M_1 ve vybraných vzorcích mléka různými metodami (průměrné hodnoty ze tří stanovení, použita vždy nová kolonka) — Aflatoxin M_1 detection in some milk samples applying different methods (average values of three assays, a new column was used in each case)

Číslo vzorku	Stanovené koncentrace AFM ₁ (ng/l) metodou		
	RIA	SEP-PAK C ₁₈ +RIA	SILICA-cart C ₁₈ +RIA
1	262	214	227
2	189	182	162
3	<30	13	15
4	<30	8	—
5	<30	11	—
6	<30	<3	<3
7	<30	13	8
8	<30	<3	<3

Vzorky č. 7 a 8 = rekonstituované vzorky sušené mléčné kojenecké výživy — Samples nos. 7 and 8 = reconstituted samples of baby's milk powder

s konvenčně používanými chromatografickými postupy s fluorescenční detekcí, které vyžadují zdlouhavou extrakci vzorku a nákladné přístrojové vybavení, umožňují testované kombinované postupy poměrně rychlé a jednoduché stanovení AFM₁. Jeden pracovník může pohodlně analyzovat 30 vzorků během 2 dnů. O tom, že snahy o citlivější stanovení AFM₁ nejsou samoučelné, svědčí nejen nízké hodnoty nejvyšších tolerovaných hladin tohoto mykotoxinu v mléku v řadě evropských zemí, ale i potřeba kontrolovat nezávadnost lidského mateřského mléka (Lamplugh et al., 1988), a poznatky o synergických účincích nízkých hladin toxických látek na živočišný organismus.

Literatura

- ADENSAM, L. — LEBEDOVÁ, M. — MARKO, A. — TUREK, B.: Mikrometoda stanovení aflatoxinu M_1 v tekutém mléce. *Prům. Potr.*, 40, 1989, s. 420—422.
- ADENSAM, L. — LEBEDOVÁ, M. — TUREK, B.: Stanovení velmi nízkých koncentrací aflatoxinů. II. Sledování aflatoxinů v mléce pro kojeneckou výživu. *Čs. Hyg.*, 32, 1987, s. 362—367.
- ANONYM: Nejvyšší přípustné množství cizorodých látek znečišťujících v potravinách. Část druhá — Mykotoxiny. Hygienické předpisy svazek 61/1986, poř. č. 69, Ministerstvo zdravotnictví ČSR, Příloha č. 2, Praha, Avicenum, 1986, s. 21.
- APPLEBAUM, R. S. — BRACKETT, R. E. — WISEMAN, D. W. — MARTH, E. H.: Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J. Dairy Sci.*, 65, 1982, s. 1503—1508.
- BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z.: Výběr metod pro zjišťování přítomnosti aflatoxinů v tekutém mléce. *Vet. Med. (Praha)*, 23, 1978, s. 559—567.
- CARISANO, A. — DELLA TORRE, G.: Sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxin M_1 in dry milk. *J. Chromatogr.*, 355, 1986, s. 340—344.
- DIXON-HOLLAND, D. E. — PESTKA, J. J. — BIDIGARE, B. A. — CASALE, W. L. — WARNER, R. L. — RAM, B. P. — HART, L. P.: Production of sensitive monoclonal antibodies to aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 and their application to ELISA of naturally contaminated foods. *J. Food Protect.*, 51, 1988, s. 201—204.
- FROBISH, R. A. — BRADLEY, B. D. — WAGNER, D. D. — LONG-BRADLEY, P. E. — HAIRSTON, H.: Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Protect.*, 49, 1986, s. 781—785.
- FUKAL, L.: Využití komerční RIA-soupravy ke sledování kontaminace mléka aflatoxinem M_1 . *Prům. Potr.*, 39, 1988, s. 196—198.

- FUKAL, L. — PROŠEK, J. — RAUCH, P. — SOVA, Z. — KÁŠ, J.: Selection of the separation step in radioimmunoassay for aflatoxin B₁ using ¹²⁵I as a marker. J. Radioanal. Nucl. Chem., 109, 1987, s. 383—391.
- HARDER, W. O. — CHU, F. S.: Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. Experientia, 35, 1979, s. 1104—1107.
- HU, W. J. — WOYCHIK, N. — CHU, F. S.: ELISA of picogram quantities of aflatoxin M₁ in urine and milk. J. Food Protect., 47, 1984, s. 126—127.
- LAMPUGH, S. M. — HENDRICKSE, R. G. — APEAGYEI, F. — MWANMUT, D. D.: Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. Br. Med. J., 296 (No. 6627), 1988, s. 968.
- MUNKSGAARD, L. — LARSEN, J. — WERNER, H. — ANDERSEN, P. E. — VIUF, B. T.: Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. Milchwissenschaft, 42, 1987, s. 165—167.
- PATTERSON, D. S. P. — GLANCY, E. M. — ROBERTS, B. A.: The „carry over“ of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. Food Cosmet. Toxicol., 18, 1980, s. 35—37.
- PESTKA, J. J. — LI, Y. — HARDER, W. O. — CHU, F. S.: Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk. J. Assoc. of Anal. Chem., 64, 1981, s. 294—301.
- PISKAČ, A. — RUPRICH, J.: Aflatoxin M₁ — záchyť produkčního kmene plísně *Aspergillus flavus*. Vet. Med. (Praha), 28, 1983, s. 357—362.
- POLAN, C. E. — HAYES, J. R. — CAMPBELL, T. C.: Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. J. Agr. Food Chem., 22, 1974, s. 635—638.
- PRICE, R. L. — PAULSON, J. H. — LOUGH, O. G. — GINGG, C. — KURTZ, A. G.: Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. J. Food Protect., 48, 1985, s. 11—15.
- RAUCH, P. — FUKAL, L. — PROŠEK, J. — BŘEZINA, P. — KÁŠ, J.: Radioimmunoassay of aflatoxin M₁. J. Radioanal. Nucl. Chem., Lett., 117, 1987, s. 163—169.
- SCOTT, P. M.: Methods for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products — a review of performance characteristics. Food Addit. Contam., 6, 1989, s. 283—305.
- STUBBLEFIELD, R. D. — DIER, A. C. — RICHARD, J. L. — SHOTWELL, O. L.: Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B₁. Am. J. Vet. Res., 44, 1983, s. 1750—1752.
- TRUCKSESS, M. W. — RICHARD, J. L. — STOLOFF, L. — McDONALD, J. S. — BRUMLEY, W. C.: Absorption and distribution patterns of aflatoxin B₁ and aflatoxins B₁ and M₁ in blood and milk of cows given aflatoxin B₁. Am. J. Vet. Res., 44, 1983, s. 1753—1756.
- VAN EGMOND, H. P.: Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. Food Addit. Contam., 6, 1989, s. 139—188.
- WINTERLIN, W. — HALL, G. — HSIEH, D. P. H.: On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk and reversed phase high performance liquid chromatography. Anal. Chem., 51, 1979, s. 1873—1874.

Došlo dne 7. 6. 1990

ФУКАЛ, Л. (Химико-технологический институт, Прага): Комбинация быстрого экстрагирования на прочной фазе и иммунометода при определении очень низких концентраций афлатоксина М₁ в молоке. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 1—7.

Для определения афлатоксина М₁ в молоке сочеталась экстракция на обратной фазе (SEP-PAC C₁₈ или SILICA-carb C18) с радиоиммунохимической квантификацией. По сравнению с прямым радиоиммунохимическим определением достигли меньшего значения детекционного лимита (30 нг/л в сравнении с 3 нг/л), удовлетворительной возвратимости анализа (80—90 %) и воспроизводимости (средний коэффициент вариации 6,4 % в сравнении с 11,1 %) при неслишком повышенной трудоемкости. Метод позволяет контроль безупречности молока с точки зрения содержания афлатоксина М₁ по самым строгим зарубежным санитарно-гигиеническим стандартам.

афлатоксин М₁; экстракция на возвратной фазе; иммунохимическое определение; молоко

FUKAL, L. [Institute of Chemical Technology, Praha]: *A combination of rapid solid-phase extraction and immunomethod used for assays of very low concentrations of aflatoxin M₁ in milk.* Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 1–7.

Extraction on reverse phase (SEP-PAK C₁₈ or SILICA-cart C18) was combined with radio-immunochemical quantification to detect aflatoxin M₁ in milk. In comparison with a direct radioimmunochemical assay, the value of detection limit was lower (30 ng/l vs. 3 ng/l), good recovery of analyte (80–90 %) and good reproducibility (average coefficient of variation 6.4 % vs. 11.1 %), were observed, labour requirement not increasing very much. The method makes feasible the check of milk safety as to aflatoxin M₁ content in keeping with the strictest foreign hygienic standards.

aflatoxin M₁; reverse-phase extraction; immunochemical assays; milk

FUKAL, L. [Chemisch-technologische Hochschule, Praha]: *Die Kombination rascher Extraktion auf fester Phase und Immunomethode bei der Feststellung der sehr niedrigen Konzentration von Aflatoxin M₁ in der Milch.* Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 1–7.

Zur Festlegung von Aflatoxin M₁ in der Milch kombinierte man eine Extraktion auf Reversionsphase (SEP-PAK C₁₈ oder SILICA-cart C18) mit radioimmunochemischer Quantifikation. Im Vergleich mit direkter radioimmunochemischer Bestimmung erreichte man einen niedrigeren Wert des Detektionslimits (30 ng/l vs. 3 ng/l), befriedigende Analytrückerstattung (80–90 %) und Reproduzierbarkeit (der durchschnittliche Variationskoeffizient 6,4 % vs. 11,1 %) bei nicht zu hohem Arbeitsaufwand. Die Methode ermöglicht eine Kontrolle der Milchanstandslosigkeit vom Gesichtspunkt des Aflatoxin M₁-Gehalts laut strengster ausländischer hygienischer Norm.

Aflatoxin M₁; Extraktion auf Reversionsphase; immunochemische Bestimmung; Milch

Adresa autora:

Ing. Ladislav Fukal, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Komplexní rozbory kvality a zdravotní nezávadnosti potravin

Všechny rozbory související s určením kvality a zdravotní nezávadnosti podle ČSN i podle norem jiných států na základě požadavků odběratelů.

ROZSAH ROZBORŮ A ANALÝZ

- komplexní rozbor základního chemického složení potravinářských surovin, potravin a krmiv
- komplexní rozbor esenciálních a výživových faktorů (aminokyseliny, mastné kyseliny, stopové prvky) v potravinách a krmivech
- identifikace a stanovení látek, které se podílejí na senzorických vlastnostech potravin (aróma, chuť, barva)
- stanovení kontaminace potravinových surovin, potravin a krmiv těžkými kovy, dusičnany a dusitany
- stanovení potravinových kontaminantů — polychlorovaných bifenylů (PCB), chlorovaných uhlovodíků, reziduí pesticidů a dalších organických sloučenin
- konzultace o aspektech hygienicko-toxikologické jakosti potravin
- studium změn cizorodých látek při výrobě a skladování potravin
- konzultace o aspektech nutriční a senzorické hodnoty potravin
- hodnocení produktů alternativního zemědělství a biopotravin
- stanovení senzorické (smyslové) jakosti potravin a její optimalizace

K analýzám se používají nejmodernější analytické postupy s využitím špičkové laboratorní techniky.

Objednávky přijímá: Katedra chemie a zkoušení potravin, fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6

Telefon: 31 17 03 8
Telex: 12 27 44 vsch c
Telefax: (42) 311 47 69

ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA HISTAMINU V POŽIVATINÁCH

P. Rauch, P. Rychetský, I. Hochel, M. Voldřich, R. Bílek, J.-L. Guesdon

RAUCH, P. — RYCHETSKÝ, P. — HOCHEL, I. — VOLDŘICH, M. — BÍLEK, R. — GUESDON, J.-L. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha; Výzkumný ústav endokrinologický, Praha; Institut Pasteur, Paris): *Enzymová imunoanalýza histaminu v poživatinách*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 9–16.

Byla vypracována kompetitivní enzymová imunoanalýza (competitive enzyme immunoassay) ke stanovení histaminu v poživatinách. Byly určeny optimální koncentrace použité monoklonální protilátky, peroxidasevého konjugátu, jakož i 1,4-benzochinonu používaného k derivatizaci histaminu. Vypočítané hodnoty afinitní konstanty podle Müllera ($K_a = 8,1 \times 10^6$ l/mol), jakož i Gibbsovy energie ($\Delta G^\circ = -3,89 \times 10^4$ J/mol) tvorby imunokomplexu umožnily stanovit optimální dobu inkubace analyzovaných vzorků s protilátkou. Stanovení neruší histidin, tyramin a tryptamin včetně některých jejich derivátů. Detekční limit metody je 7 ng/ml. U kapalných vzorků je možné úpravou postupu docílit hodnoty ještě o řád nižší. Správnost analýz histaminu v sýrech, rybách, vínu a pivu byla ověřena metodou standardního přídávku (recovery 91–112 %) a u některých vzorků isotachoforeticky.

histamin; kompetitivní enzymová imunoanalýza [competitive enzyme immunoassay]; sýr; ryba; víno; pivo

Histamin, podobně jako ostatní biogenní aminy, je obvykle součástí většiny poživatin. Histamin vzniká běžnými metabolickými procesy, jako např. dekarboxylací histidinu (histidin dekarboxylasa EC 4.1.1.2), v živočišných a rostlinných tkáních i činností kulturních a kontaminujících mikroorganismů (Draughon et al., 1987). Malá množství histaminu, která se obvykle vyskytují v poživatinách, nepředstavují pro spotřebitele žádné zdravotní ohrožení (Voldřich et al., 1988).

V některých případech, např. v důsledku inhibice monoaminoxidas (aminoxidas EC 1.4.3.6) v potravinářských surovinách nebo působením mikroorganismů se zvýšenou katalytickou aktivitou dekarboxylas se mohou objevit zvýšené koncentrace histaminu, způsobující různé zdravotní obtíže (Zee et al., 1983). Zdravotní problémy může dále zvyšovat i snížená detoxikační schopnost trávicího traktu příjemce, způsobená přítomností inhibitorů monoaminoxidas, konzumací alkoholu nebo genetickými poruchami (Suhren et al., 1982).

Stanovení histaminu v určitých druzích poživatin může sloužit jako dodatečné kritérium pro hodnocení kvality potravinářských výrobků. Z tohoto důvodu je potřebné mít k dispozici specifickou, citlivou a jednoduchou metodu stanovení histaminu, umožňující stanovit současně větší množství vzorků.

V posledních letech byla vypracována řada metod vhodných ke stanovení histaminu v poživatinách. Jejich přehled uvádí Voldřich et al. (1988). V současnosti se jako nejvhodnější zdá HPLC s fluometrickým detektorem stanovující histamin po jeho kondenzaci s o-ftalaldehydem (Gouygo et al., 1987) a ionexová chromatografie na automatickém analyzátoru aminokyselin (Ingles et al., 1985). V této konkurenci má jistě naději na uplatnění i isotachoforetické stanovení (Voldřich et al., 1988).

Uvedené metody využívají drahé přístrojové vybavení a vyžadují náročnou obsluhu. Při zpracování větších sérií vzorků těmito technikami se také značně prodlužuje doba analýz. Proto jsme se pokusili vyvinout imunochemické stanovení histaminu, které je vhodné pro stanovení větších souborů vzorků a je přístrojově nenáročné.

MATERIÁL A METODY

K pokusům byl používán histamin dihydrochlorid Fluka (SRN), Tween 20 a 1,4-benzochinon Merck (SRN), histidin Reanal (Maďarsko), 1-methylhistamin a spermidin Sigma Chemicals (USA), 3-hydroxy-tyramin, tryptamin a n-butylamin Koch-Light (Anglie), tyramin Loba Chemie Wien (Rakousko), křenová peroxidasa RZ 3 Boehringer (SRN). Ostatní chemikálie dodala Lachema Brno, polystyrenové destičky KOH-I-NOOR Dalečín.

Tlumivé roztoky: chlorid sodný ($c = 0,15$ mol/l), obsahující Tris-HCl ($c = 0,01$ mol/l), pH 7,4 (TBS); TBS obsahující 0,1% Tween 20 (TBS-Tw); TBS-Tw obsahující 1% hovězí sérový albumin (TBS-Tw-BSA).

K pokusům byl používán konjugát histamin-benzochinon-peroxidasa a monoklonální protilátka proti konjugátu histamin-benzochinon, které připravili Guesdon et al. (1986).

Vzorky poživatin byly získány z maloobchodní sítě.

Úprava analyzovaných vzorků poživatin

Analyzovaná poživatina (1 g) byla homogenizována v 10 ml kyseliny chloristé ($c = 0,4$ mol/l). Vzniklá sraženina byla odstředěna při 3000 g po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl použit pro imunoanalýzu histaminu.

Kompetitivní enzymová imunoanalýza

Před vlastním stanovením histaminu je nezbytné roztoky standardů a analyzovaných vzorků nechat zreagovat s 1,4-benzochinonem a vytvořit konjugát histamin-benzochinon, proti kterému byla připravena používaná protilátka. Potřebný konjugát získáme smícháním 1 ml roztoku histaminu v kyselině chloristé ($c = 0,4$ mol/l) s 0,05 ml ethanolu, který obsahuje 1,4-benzochinon (3 mg/ml). Po pětiminutové reakci při laboratorní teplotě necháme přebytek benzochinonu zreagovat s 0,1 ml glycin-triethanolaminového roztoku ($c = 0,7$ mol/l), pH 7,4.

Do jamek polystyrenových mikrotitračních destiček bylo pipetováno 0,2 ml roztoku monoklonální protilátky proti konjugátu histamin-benzochinon rozpuštěné v TBS. Destičky byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C. Před dalším použitím byl roztok protilátky odsát a destičky byly třikrát promyty roztokem TBS-Tw. Poté bylo do každé jamky mikrotitrační destičky pipetováno 0,1 ml roztoku konjugátu histamin-benzochinon-peroxidasa, ředěného tlumivým roztokem TBS-Tw-BSA a 0,1 ml roztoku vzorku nebo standardu derivatizovaného 1,4-benzochinonem. Po inkubaci při laboratorní teplotě byl obsah jamek odsát a destičky byly třikrát promyty roztokem TBS-Tw. Aktivita peroxidasy vázaná na povrch jamek byla stanovena dříve popsaným postupem (Rau et al., 1990).

Termodynamická data byla stanovena a vypočtena podle metod, které publikoval Müller (1980).

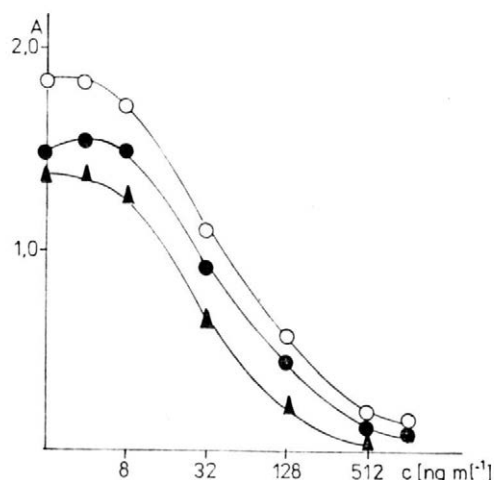
VÝSLEDKY A DISKUSE

Princip metody

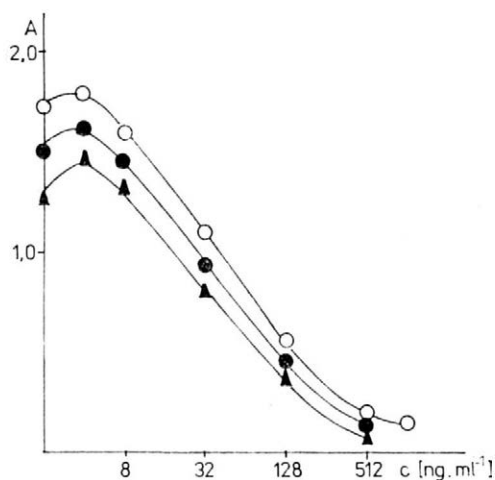
Ke stanovení histaminu byla použita kompetitivní enzymová imunoanalýza. Monoklonální protilátka proti konjugátu histamin-benzochinon se imobilizuje adsorbicí na stěny jamek polystyrenových mikrotitračních destiček. Při vlastním stanovení histaminu soutěží o vazebná místa protilátky konjugát histamin-benzochinon-peroxidasa s histaminem (z analyzovaného vzorku nebo standardu), který je nezbytné před analýzou nechat zreagovat s 1,4-benzochinonem (viz metody). Vyhodnocení analýzy spočívá ve změření katalytické aktivity peroxidasy, jejíž hodnota je nepřímo úměrná koncentraci histaminu ve vzorku.

Optimalizace stanovení

Každé imunochemické stanovení je nutné nejprve optimalizovat, tj. nalézt takové koncentrace protilátky a značeného antigenu (konjugát histamin-benzochinon-peroxidasa), za kterých dosáhneme při fotometrickém měření aktivity peroxidasy maximálních hodnot absorbance. Z obr. 1 a 2 je zřejmé, že hledaná optimální koncentrace určená pro monoklonální protilátku i pro peroxidasový konjugát je $5 \mu\text{g/ml}$.



1. Závislost průběhu kalibračních křivek imunoanalýzy histaminu na koncentraci imobilizované monoklonální protilátky — Dependence of calibration curves of histamine immunoassay on the concentration of immobilized monoclonal antibody
A — absorbance při 492 nm (absorbance at 492 nm)
c [ng.ml⁻¹] — koncentrace histaminu (histamine concentration); koncentrace imobilizované protilátky (concentration of immobilized antibody): ▲ 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ○ 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ● 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$



2. Závislost průběhu kalibračních křivek imunoanalýzy histaminu na koncentraci peroxidasového konjugátu — Dependence of calibration curves of histamine immunoassay on the concentration of peroxidase conjugate
A — absorbance při 492 nm (absorbance at 492 nm)
c [ng.ml⁻¹] — koncentrace histaminu (histamine concentration); koncentrace peroxidasového konjugátu (concentration of peroxidase conjugate): ▲ 2,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ○ 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ● 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; △ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Optimální doba inkubace byla určena termodynamickým vyhodnocením kalibračních závislostí postupem, který uveřejnil Müller (1988). V tab. I jsou uvedeny vypočtené afinitní konstanty (K_a) monoklonální protilátky proti konjugátu histamin-benzochinon a hodnoty Gibbsovy energie (ΔG°) odpovídající tvorbě imunokomplexu. Ukázalo se, že používaná monoklonální protilátka nepředstavuje zcela homogenní populaci imunoglobulinů. Po půlhodinové inkubaci imunoreagencií se uplatní imunoglobuliny s největší afinitou k haptenu (histamin-benzochinon), ale není dosažena rovnováha. Té se dosáhne po dvouhodinové inkubaci, kdy je hodnota Gibbsovy energie minimální. V tomto okamžiku se na tvorbě imunokomplexu podílí všechny přítomné protilátky. Po čtyřech hodinách se začíná již projevovat nestabilita imunokomplexu, která má za následek zvýšení Gibbsovy energie.

I. Vliv délky inkubační doby na hodnoty zdánlivé afinitní konstanty (K_a) podle Müllera (1980) a Gibbsovy energie (G°) — Effect of incubation period on the values of apparent affinity constant (K_a) according to Müller (1980) and the Gibbs energy (G°)

Doba inkubace [h]	K_a [l. mol ⁻¹]	$-\Delta G^\circ$ [J. mol ⁻¹]
0,5	$1,75 \times 10^7$	$4,08 \times 10^4$
1,0	$1,07 \times 10^7$	$3,96 \times 10^4$
2,0	$0,81 \times 10^7$	$3,89 \times 10^4$
4,0	$1,20 \times 10^7$	$3,99 \times 10^4$

Využitím určených optimálních koncentrací a metodického postupu enzymové analýzy (viz metody) byla uskutečněna všechna dále uvedená stanovení histaminu. Detekční limit, stanovený tímto postupem, definovaný jako nejnižší koncentrace histaminu rozlišitelná od nuly, zvětšená o trojnásobek směrodatné odchylky, je 7 ng/ml. Detekční limit lze u kapalných vzorků snížit o jeden řád. Docílíme toho snadno tím, že ke vzorku přidáme koncentrovanou kyselinu chloristou, aby její výsledná koncentrace byla 0,4 mol/l.

Imunoanalýzu lze dále optimalizovat změnou koncentrace 1,4-benzochinonu používaného pro derivatizaci analyzovaného histaminu. Z obr. 3 je vidět, že při nižších koncentracích histaminu je výhodnější používat rovněž nižší koncentrace benzochinonu.

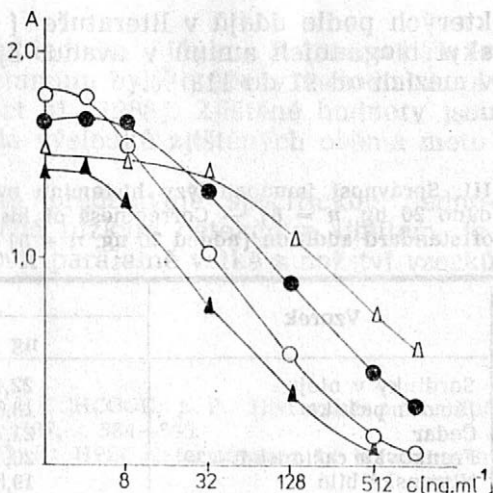
Specifita stanovení

Principem imunochemických metod je interakce antigenu (stanovovaná látka) a specifického činidla (protilátka). Nejedná se tedy o chemickou reakci za vzniku kovalentních vazeb mezi reaktanty, nýbrž o tvorbu komplexu, ve kterém jsou antigen s protilátkou vzájemně poutány nevazebnými interakcemi (elektrostatická, hydrofobní, van der Waalsovy síly, vodíkové můstky). Protilátka tedy rozlišuje spíše prostorovou než chemickou strukturu antigenu. Z těchto důvodů je nutné ověřit, zda látky strukturálně podobné histaminu, které se vyskytují v poživatinách, neruší jeho stanovení. V úvahu přicházejí zvláště histidin, z něhož převážně histamin vzniká, jakož i další významné biogenní aminy, např.

3. Závislost průběhu kalibračních křivek imunoanalýzy histaminu na koncentraci 1,4-benzochinonu používaného pro derivatizaci analyzovaných vzorků — Dependence of calibration curves of histamine immunoassay on the concentration of 1,4-benzoquinone used for deriving the analysed samples

A — absorbance při 492 nm (absorbance at 492 nm)

c [ng.ml⁻¹] — koncentrace histaminu (histamine concentration); koncentrace benzochinonu použitého k derivatizaci (concentration of benzoquinone used for deriving): ○ 15 μg.ml⁻¹; ● 75 μg.ml⁻¹; ▲ 150 μg.ml⁻¹



tyramin a tryptamin. Křížové reakce možných interferentů jsme testovali po jejich derivatizaci 1,4-benzochinonem, tedy stejným postupem, jako při stanovení histaminu. Smyslem těchto pokusů, shrnutých v tab. II, bylo nalézt takovou koncentraci testované látky, která vytěsňuje z vazby na protilátku 50 % konjugátu histamin-benzochinon-peroxidasa. Křížové reakce jsou pak vyjadřovány poměrem koncentrace histaminu, která vyvolává stejný účinek, ku koncentraci testované látky v procentech. Jak je z tab. II zřejmé, žádná z testovaných látek významně stanovení histaminu neruší.

II. Křížové reakce při imunoanalýze histaminu — Cross reaction in histamine immunoassay

Sloučenina	Křížová reakce [%]
Histamin	100
Histidin	0,0005
1-methyl-histamin	0,005
Tryptamin	0,003
5-hydroxy-tryptamin (serotonin)	0,003
Tyramin	0,001
3-hydroxy-tyramin	méně než 0,0005
Spermidin	méně než 0,0005
n-butylamin	méně než 0,0005

Ověření správnosti metody

Správnost výsledků získaných metodou enzymové imunoanalýzy byla dále ověřována při stanovení histaminu v různých vzorcích poživatin metodou standardního přídávku (tab. III). Byly vybrány poživatiny, ve

kterých podle údajů v literatuře [Ramantanis, 1984] přichází výskyt biogenních aminů v úvahu. Zjištěné hodnoty recovery se pohybují v mezích od 91 do 112 %.

III. Správnost imunoanalýzy histaminu ověřená metodou standardního přídatku (přidáno 20 ng, $n = 8$) — Correctness of histamine immunoassay verified by the method of standard addition (added 20 ng, $n = 8$)

Vzorek	Nalezeno	
	ng $\pm$ S. D.	[%]
Sardinky v oleji	22,4 $\pm$ 3,2	112
Játrová paštika	18,9 $\pm$ 2,1	94,5
Čedar	21,7 $\pm$ 2,8	109
Frankovka račianská	20,3 $\pm$ 0,6	102
Nitranské bílé	19,8 $\pm$ 0,4	99,0
Becherovka	20,8 $\pm$ 0,8	104
Kozel 10°	18,1 $\pm$ 0,9	91,0

Imunoanalýza vzorků

Vyvinutou metodou bylo analyzováno velké množství vzorků. Výběr analýz je shrnut v tab. IV. Pro všechny druhy vzorků bylo ověřováno recovery (srovnej s tab. III). Obsah histaminu ve většině vzorků je zanedbatelný. Výsledky se shodují s typickými údaji publikovanými v od-

IV. Obsah histaminu v poživatinách ($n = 8$) — Histamine content in edibles ($n = 8$)

Vzorek	Histamin [mg . kg ⁻¹ $\pm$ S. D.]	Vzorek	Histamin [mg . kg ⁻¹ $\pm$ S. D.]
S ý r y		V í n a	
Čedar	1,1 $\pm$ 0,2	bílá:	
Eidam uzený	1,4 $\pm$ 0,2	Ryzlink rýnský	0,38 $\pm$ 0,03
Primátor	2,2 $\pm$ 0,3	Nitranské	0,32 $\pm$ 0,05
Zlato	méně než 0,01	Rulandské	0,09 $\pm$ 0,01
Koliba	méně než 0,01	červená:	
Niva	13,0 $\pm$ 1,4 (12,2 $\pm$ 0,2)	Frankovka	0,9 $\pm$ 0,1
		Kláštorné	1,2 $\pm$ 0,2
R y b y		dezertní:	
Filé z makrely	0,14 $\pm$ 0,02	Kom	5,4 $\pm$ 0,4
Sardinky		Becherovka	méně než 0,01
v oleji	0,94 $\pm$ 0,11	P i v o	
Řezy ze sledů	4,1 $\pm$ 0,2	Pito	0,38 $\pm$ 0,01
Makrela		Kozel 10°	0,40 $\pm$ 0,03
v oleji	1,2 $\pm$ 0,2	Pragovar 12°	1,8 $\pm$ 0,1 (1,6 $\pm$ 0,2)
Játrová paštika	2,1 $\pm$ 0,4	Tmavý měšťan	1,3 $\pm$ 0,2

Hodnoty uvedené v závorkách byly stanoveny izotachoforeticky [Values given in round brackets were defined isotachophoretically]

borné literatuře, které shrnul v přehledném článku Ramantanis (1984). Vzorky s vyšším obsahem histaminu byly ověřeny metodou kapilární izotachoforézy (Voldřich et al., 1988). Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v závorkách v tab. IV. Shoda výsledků zjištěných oběma metodami je uspokojivá.

Enzymová imunoanalýza histaminu představuje specifickou, jednoduchou a rychlou metodu s dostatečně nízkým detekčním limitem, jejíž předností je rovněž možnost stanovit paralelně velké množství vzorků různých poživatin.

Literatura

- DRAUGHON, F. R. — TAOAMGARAN, M. — HITCHCOCK, J. P.: Histamine production in soy extended tuna salads. *J. Food Sci.*, 52, 1987, s. 584—595.
- GOUYGOU, J. P. — SINQUIN, C. — DURAND, P.: HPLC determination of histamine in fish. *J. Food Sci.*, 52, 1987, s. 925—927.
- GUESDON, J.-L. — CHEVRIER, D. — MAZIE, J. C. — DAVID, B. — AVEAMEAS, S.: Monoclonal anti-histamine antibody. *J. Immunol. Meth.*, 87, 1986, s. 69—78.
- INGLES, L. D. — BACK, J. F. — GALIMORE, D. — TINDALE, R. — SHAW, K. J.: Estimation of biogenic amines in foods. *J. Sci. Food agric.*, 36, 1986, s. 402—406.
- MÜLLER, R.: Calculation of average antibody affinity in anti-hapten sera from data obtained by competitive radioimmunoassay. *J. Immunol. Meth.*, 34, 1980, s. 345—352.
- RAMANTANIS, S., von: Histamin. Tyramin und Tryptamin in Lebensmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 35, 1984, s. 73—96.
- RAUCH, P. — HOCHER, I. — KAŠ, J.: Sandwich enzyme immunoassay of hen egg lysozyme in foods. *J. Food Sci.*, 55, 1990, s. 103—105.
- SUHREN, G., von — HEESCHEN, W. — TOLLE, A.: Untersuchungen zum Nachweis von Histamin und Tyramin in Milchprodukten. *Milchwissenschaft*, 37, 1982, s. 143—147.
- VOLDŘICH, M. — HRDLÍČKA, J. — OPATOVÁ, H.: Stanovení histaminu v rybách metodou kapilární izotachoforézy. *Potravinářské Vědy*, 6, 1988, č. 2, s. 99—103.
- ZEE, J. A. — SIMARD, R. E. — L'HEUREUX, L.: Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. *J. Food Prot.*, 46, 1983, s. 1044—1049.

Došlo dne 27. 7. 1990

РАУХ, П. — РЫХЕТСКИ, П. — ГОХЕЛ, И. З. ВОЛДРЖИХ, М. — БИЛЕК, Р. — ГУЕСДОН, Й.-Л. (Химико-технологический институт Прага; Научно-исследовательский институт эндокринологии, Прага; Институт Пастера, Париж): Ферментативный иммуноанализ гистамина в пищевых продуктах. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 9—16.

Разработали конкурентноспособный ферментативный иммуноанализ по определению гистамина в пищевых продуктах. Определили оптимальные концентрации применяемых моноклонального антитела, пероксидазного конъюгата и 1,4-бензохина, используемого для дериватизации гистамина. Расчитанные значения афинитной константы по Мюллеру ($K = 8,1 \cdot 10^6$ л/моль), как и энергии Гиббса ($\Delta G^\circ = -3,89 \cdot 10^4$ Дж/моль) образования иммунокомплекса позволили определить оптимальный срок инкубации анализируемых образцов с антителом. Определение не разрушает гистидин, тирамин, триптами, включительно некоторых их производных. Детекционный предел 7 нг/мл. В случае жидких образцов можно модификацией хода определения добиться значений порядком ниже. Правильность анализа гистамина в сырах, рыбе, вине и пиве была проверена методом стандартной добавки (выход 91—112 %) и в случае некоторых образцов изотакхофоретически.

гистамин; конкурентноспособный ферментативный иммуноанализ; сыр; рыба; вино; пиво

RAUCH, P. — RYCHETSKÝ, P. — HOCHÉL, I. — VOLDŘICH, M. — BÍLEK, R. — GUESDON, J.-L. (Institute of Chemical Technology, Praha; Research Institute of Endocrinology, Praha; Institut Pasteur, Paris): *Enzyme immunoassay of histamine in edibles*. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 9–16.

Competitive enzyme immunoassay was worked out to determine histamine in edibles. Optimum concentration of applied monoclonal antibody, peroxidase conjugate, were defined and so were the concentrations of 1,4-benzoquinone, used for histamine deriving. Calculated values of affinity constant according to Müller ($K_a = 8.1 \times 10^6$ l/mol) as well as the Gibbs energy ($\Delta G^\circ = -3.89 \times 10^4$ J/mol) of immunocomplex formation enabled to determine optimum period of incubation of analyzed samples with antibody. Determination does not interfere with histidine, tyramine and tryptamine including some of their derivatives. Detection limit of the method is 7 ng/ml. In liquid samples it is possible to obtain values lower even by an order with the help of process modification. Correctness of histamine analyses in cheeses, fish, wines and beer was verified by the method of standard addition (recovery 91–112 %) and in some samples isotachophoretically.

histamine; competitive enzyme immunoassay; cheese; fish; wine; beer

RAUCH, P. — RYCHETSKÝ, P. — HOCHÉL, I. — VOLDŘICH, M. — BÍLEK, R. — GUESDON, J.-L. (Hochschule für Chemie und Technologie, Praha; Forschungsinstitut für Endokrinologie, Praha; Institut Pasteur, Paris): *Enzymimmunoanalyse des Histamins in Nahrungsmitteln*. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 9–16.

Es wurde eine kompetitive Enzymimmunoanalyse (competitive enzyme immunoassay) zur Histaminsbestimmung in Nahrungsmitteln ausgearbeitet. Es wurden optimale Konzentrationen des angewendeten monoklonalen Gegenmittels, des Peroxidasekonjugats, sowie auch des 1,4-Benzochins, das zur Histaminsderivatisierung benutzt wird, bestimmt. Die berechneten Werte der Affinitätskonstante nach Müller ($K_a = 8,1 \times 10^6$ l/mol), sowie auch die Energie von Gibbs ($G^\circ = -3,89 \times 10^4$ J/mol) der Bildung des Immunokomplexes ermöglichten, die optimale Inkubationszeit von analysierten Proben mit dem Gegenmittel zu bestimmen. Das Histidin, das Tyramin und das Tryptamin sowie einiger ihrer Derivate stören nicht die Bestimmung. Das Sichtbarmachungslimit der Methode ist 7 ng/ml. Es ist möglich bei flüssigen Proben durch Modifikation des Prozesses die noch um eine Stufe niedrigeren Werte zu erzielen. Die Richtigkeit der Analysen des Histamins in Käsen, Fischen, Wein und Bier wurde mit Hilfe der Methode der Standardzugabe (recovery 91–112%) und bei manchen Proben isotachoretisch überprüft.

Histamin; kompetitive Enzymimmunoanalyse (competitive enzyme immunoassay); Käse; Fische; Wein; Bier

Adresy autorů:

Doc. ing. Pavel Rauch, DrSc., ing. Pavel Rychetský, ing. Igor Hochel, ing. Michal Voldřich, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Ing. Radek Bílek, CSc., Výzkumný ústav endokrinologický, Národní 8, 110 00 Praha 1
Dr. Jean-Luc Guesdon, Institut Pasteur, Paris

VYUŽITÍ REAKTIVNÍ EXTRAKCE PŘI ZÍSKÁVÁNÍ KYSELINY MLÉČNÉ Z FERMENTAČNÍHO BUJONU

J. Brát, E. Hauer, R. Marr, J. Hartl

BRÁT, J. — HAUER, E. — MARR, R. — HARTL, J. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha; Institut für Thermische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik, Graz, Rakousko): *Využití reaktivní extrakce při získávání kyseliny mléčné z fermentačního bujónu*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 17–22.

V práci byla srovnávána kinetika a účinnost extrakce kyseliny mléčné z modelového roztoku a fermentačního bujónu. K extrakci byly použity různé extrakční směsi na bázi organických aminů. Ukazuje se, že proces reaktivní extrakce lze využít i v případech získávání kyseliny mléčné z fermentačního bujónu. Způsob vedení procesu však ve větší míře ovlivňuje průběh a selektivitu extrakce.

reaktivní extrakce; kyselina mléčná; organické aminy; fermentace

Kyselina mléčná je využívána v řadě průmyslových aplikací [Schwall, Boehringer Sohn, 1979; Vickroy, 1985]. Vedle syntetických výrobních postupů lze kyselinu mléčnou získat rovněž fermentačním procesem. Světová roční produkce kyseliny mléčné činila v roce 1982 20–28 tisíc tun, z toho 50 % bylo vyrobeno fermentací [Vickroy, 1985]. Obecnou nevýhodou fermentací je skutečnost, že se v závěru výrobního procesu produkt nachází ve značně zředěných roztocích, což klade vyšší nároky na zpracování fermentačního bujónu. Brát et al. (1990) se ve své práci zabývali sledováním kinetiky reaktivní extrakce z modelového roztoku kyseliny mléčné.

Fermentační bujón obsahuje kromě žádaného produktu celou řadu dalších látek jako např. bílkoviny, peptidy, jiné organické kyseliny apod., které mohou do značné míry ovlivňovat proces reaktivní extrakce, zvláště děje na fázovém rozhraní vodné a organické fáze. V této práci jsou srovnávány výsledky získané na modelových roztocích [Brát et al., 1990] s extrakcí kyseliny mléčné z fermentačního bujónu.

MATERIÁL A METODY

Fermentační bujón byl připraven modifikovaným postupem, který navrhli Jørgensen a Nikolajsen (1987), s mikrobiální kulturou *Streptococcus cremoris*, kdy bylo použito desetinasobku glukosy ve výchozím substrátu, za anaerobních podmínek pod dusíkem při pH = 6,3 a teplotě 27 °C. Obsah složek substrátu v 1 dm³: 2 g kvasinového extraktu (Hefeextract, Merck, SRN), 2 g kaseinového peptonu (Pepton aus Casein, Merck, SRN), 100 g glukosy, 34 mg MgSO₄ · H₂O, 77 mg KH₂PO₄ · H₂O, 10 mg KCl, 148 mg NH₄Cl. Fermentační bujón obsahoval 0,205 mol kyseliny mléčné, dále 0,025 mol kyseliny mravenčí a 0,006 mol kyseliny octové v 1 dm³.

Obsah kyseliny mléčné byl stanovován v organické fázi titrací roztokem KOH (c = 0,1 mol/l) v isopropanolu na přístroji TitralabTM-System (výrobce Radiometr Copen-

hagen, Dánsko) s automatickou indikací bodu ekvivalence. Obsah kyseliny mléčné ve fermentačním bujónu byl vzhledem k obsahu některých dalších organických kyselin stanovován pomocí HPCL za podmínek: stacionární fáze iontoměnič PRP-X300 (Hamilton, Švýcarsko), mobilní fáze 0,5 mM H₂SO₄, průtok 0,8 ml/min, detekce UV 210 nm, nástřik 20 µl.

Jako reakční složka extrakční směsi byl použit terciální amin Hostarex A327, komerčně charakterizovaný minimálním obsahem terciálního aminu 95 %, maximálním obsahem sekundárního aminu 2 % a primárního 0,5 % s délkou uhlovodíkového řetězce C8—C10 v poměru přibližně 1:1 a hustotou 810 kg/m³, výrobce Hoechst, Frankfurt am Main, SRN, případně sekundární amin LA-2 střední molekulové hmotnosti 360—380 g/mol a hustoty 830 kg/m³, výrobce Rohm and Haas Company (USA), v kombinaci s isodekanolem od firmy Hoechst o hustotě 835 kg/m³ a bodem varu v rozmezí 215—225 °C a uhlovodíkovou frakcí ropy Shellsol T výrobce Shell Chemie komerčně charakterizovanou bodem varu 176—210 °C, hustotou 758 kg/m³ a obsahem aromatických uhlovodíků pod 0,5 %. Objemové poměry jednotlivých složek jsou uvedeny v tab. I.

Podobně jako v předchozí práci (Brát et al., 1990) byla kinetika extrakce sledována ve stoupajícím sloupci kapek organické fáze. Extrakce byla vzhledem k závislosti na pH prováděna za konstantní hodnoty pH = 4,5.

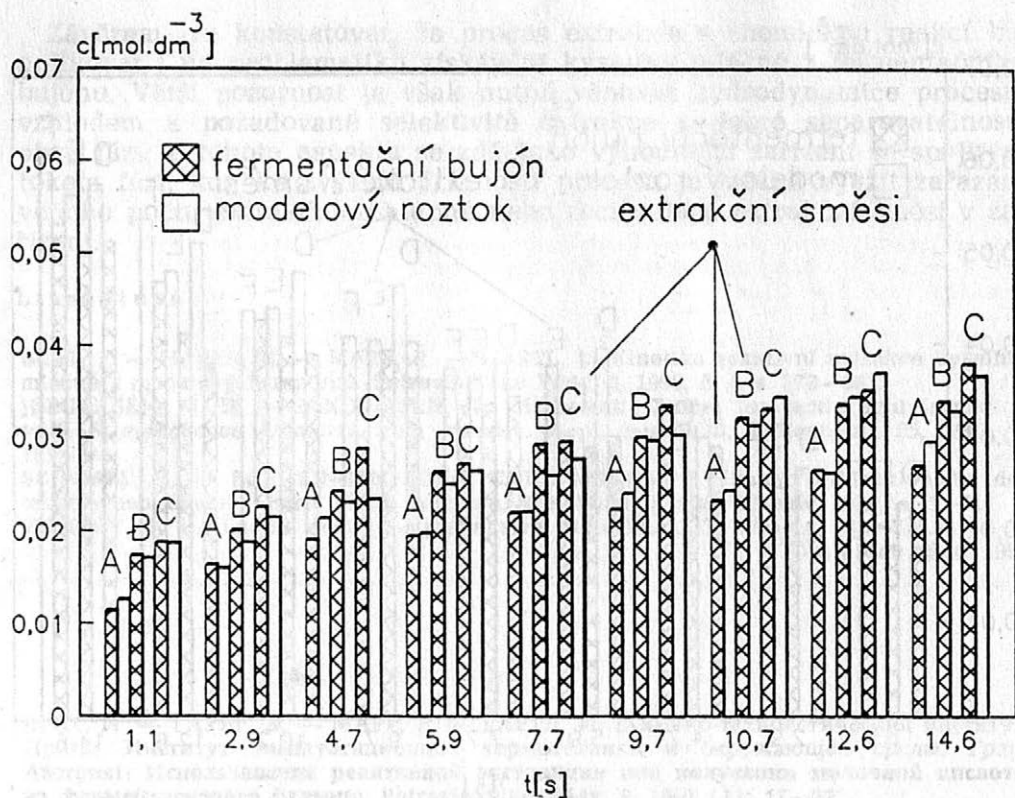
I. Složení extrakčních směsí [% obj.] — Composition of extraction mixtures [% vol.]

Označení směsi	Reakční složka	Isodekanol	Shellsol T
A	{A327} 30	30	40
B	{A327} 40	40	20
C	{A327} 50	50	0
D	{LA-2} 30	40	30
E	{LA-2} 30	30	40
F	{LA-2} 40	40	20

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vzhledem k tomu, že zákal a hnědé zbarvení fermentačního roztoku neumožňovaly měření časové závislosti koncentračních změn kyseliny mléčné v organické fázi, jsou výsledky kinetiky extrakce kyseliny mléčné z fermentativního bujónu znázorněny ve formě histogramu s průměrným časovým údajem získaným pro jednotlivá místa odběru vzorku při extrakci z modelového roztoku. Obr. 1 představuje srovnání kinetiky extrakce z fermentačního bujónu a modelového roztoku za použití tri(octyl/decyl)aminu (A327) jako reaktivní složky extrakční směsi, obr. 2 porovnává průběh extrakce se sekundárním aminem LA-2, jakožto reaktivní složkou.

Z obr. 1 je patrná velmi dobrá shoda kinetiky extrakce kyseliny mléčné z modelového roztoku a fermentačního bujónu pro sledování směsí s tri(octyl/decyl)aminem. V jednotlivých odběrových místech, a tedy i časových okamžicích od počátku extrakce byly získány srovnatelné hodnoty koncentrací kyseliny mléčné v organické fázi. Při extrakci se sekundárním aminem LA-2 byly hodnoty koncentrací kyseliny mléčné v organické fázi při extrakci z fermentačního bujónu poněkud nižší než při extrakci z modelového roztoku (obr. 2). Organická fáze byla ve všech případech transparentní, bez zjevného zhoršení barevných charakteristik, což svědčí i o dobré selektivitě procesu ve sledovaném ča-

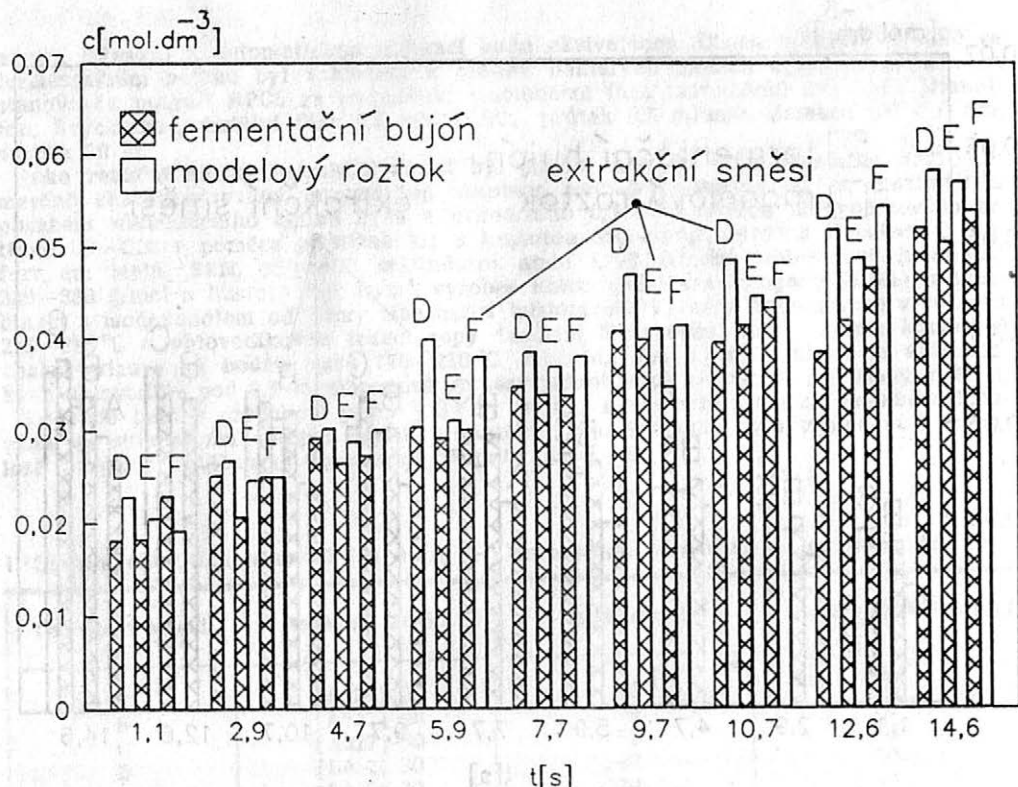


1. Srovnání kinetiky extrakce kyseliny mléčné z modelového roztoku a fermentačního bujónu za použití extrakčních směsí s tri(octyl/decyl)aminem — Comparison of the kinetics of lactic acid extraction out of model solution and fermentative culture medium, using extraction mixtures with tri(octyl/decyl)amine

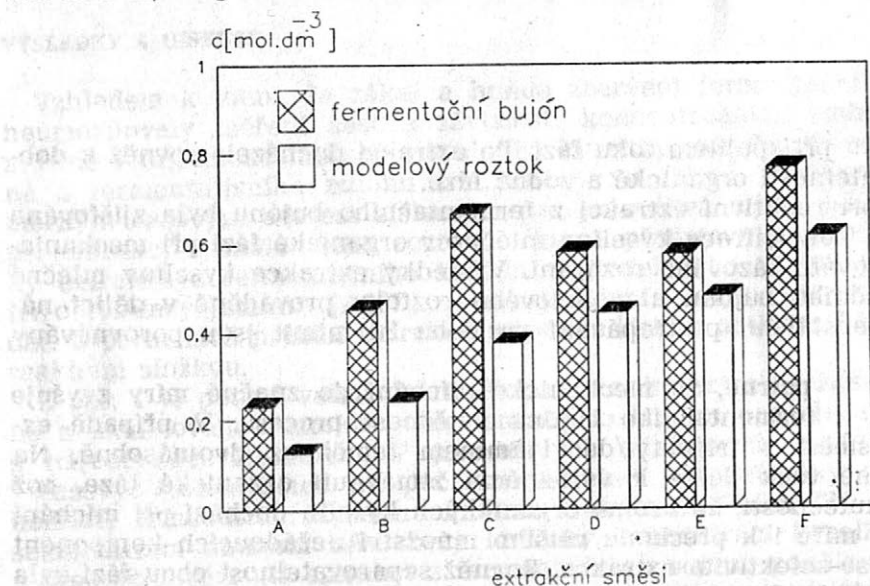
sovém úseku při spojitém toku fází. Po extrakci docházelo rovněž k dobré separovatelnosti organické a vodné fáze.

Rovněž při reaktivní extrakci z fermentačního bujónu byla zjišťována rovnovážná koncentrace kyseliny mléčné v organické fázi při mechanickém obnovování fázového rozhraní. Výsledky extrakce kyseliny mléčné z fermentačního bujónu a modelového roztoku prováděné v dělicí nálevce za neustálého protřepávání po dobu 20 minut jsou porovnávány na obr. 3.

Z obr. 3 je patrné, že mechanické míchání do značné míry zvyšuje u extrakce z fermentačního bujónu výtěžnost procesu. V případě extrakčních směsí s tri(octyl/decyl)aminem téměř až dvojnásobně. Na druhé straně však došlo k výraznému ztmavnutí organické fáze, což svědčí o skutečnosti, že kromě organických kyselin dochází při míchání ve zvýšené míře i k přechodu většího množství nežádoucích komponent a zhoršuje se selektivita extrakce. Rovněž separovatelnost obou fází byla podstatně horší. Po skončení extrakce bylo nutné obě fáze oddělit odstředěním.



2. Srovnání kinetiky extrakce kyseliny mléčné z modelového roztoku a fermentačního bujónu za použití extrakčních směsí se sekundárním aminem LA-2 — Comparison of the kinetics of lactic acid extraction out of model solution and fermentative culture medium, using extraction mixtures with secondary amine LA-2



3. Porovnání hodnot rovnovážných koncentrací kyseliny mléčné v organické fázi při extrakcích z modelového roztoku a fermentačního bujónu — Comparison of the values of equilibrated lactic acid concentrations in organic phases during extractions out of model solution and fermentative culture medium

Závěrem lze konstatovat, že proces extrakce s chemickou reakcí lze aplikovat i na problematiku získávání kyseliny mléčné z fermentačního bujónu. Větší pozornost je však nutné věnovat hydrodynamice procesu, vzhledem k požadované selektivitě extrakce a dobré separovatelnosti obou fází. Z tohoto aspektu se zdá jako výhodnější zařízení se spojitým tokem fází, kdy ke zvýšení účinnosti procesu je možné využít zařazení většího počtu extrakčních stupňů nebo recirkulace extrakční směsi v zařízení.

Literatura

- BRÁT, J. — HAUER, E. — MARR, R. — HARTL, J.: Kinetika reaktivní extrakce kyseliny mléčné z modelových roztoků. *Potravinářské Vědy*, 8, 1990, č. 4, s. 273—281.
- JØRGENSEN, M. H. — NIKOLAJSSEN, K.: Mathematic model for lactic acid formation with *Streptococcus cremoris* from glucose. *Appl. microbiol. Biotechnol.*, 25, 1987, s. 313—316.
- SCHWALL, H. — BOEHRINGEN SOHN, C. H.: Milchsäure. *Ullmann's Enzyklopädie der technischen Chemie*, Band 17, 4. Aufgabe, Weinheim, Verlag Chemie 1979, s. 1—7.
- VICKROY, T. B.: Lactid Acid. *Comprehensive Biotechnol.*, 3, 1985, s. 761—776.

Došlo dne 15. 6. 1990

БРАТ, Й. — ГАУЕР, Э. — МАРР, Р. — ГАРТЛ, Й. (Химико-технологический институт, Прага; Институт эксплуатационной термотехники и окружающей среды, Грац, Австрия): **Использование реактивной экстракции при получении молочной кислоты из ферментативного бульона.** *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 [1]: 17—22.

В работе сравнивалась кинетика и эффективность экстракции молочной кислоты из модельного раствора и ферментативного бульона. Для экстрагирования использовались разные экстракционные смеси на базе органических аминов. Оказывается, что процесс реактивной экстракции можно использовать и в случаях получения молочной кислоты из ферментативного бульона. Однако способ ведения процесса в большей мере влияет на ход и избирательность экстракции.

реактивная экстракция; молочная кислота; органические амины; ферментация

BRÁT, J. — HAUER, E. — MARR, R. — HARTL, J.: [Institute of Chemical Technology, Praha; Institut für Thermische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik, Graz, Austria]: *The use of reactive extraction for gaining acid out of fermentation culture medium.* *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 [1]: 17—22.

The given work compares kinetics and effectiveness of lactic acid extraction in model solution and fermentative culture medium. Different extraction mixtures on the basis of organic amines were used in the extraction process. It turned out that the process of reactive extraction could also be used in the cases of gaining lactic acid out of fermentative culture medium. The way how the process is carried out influences to a greater extent the course and selectivity of extraction.

reactive extraction; lactic acid; organic amines; fermentation

BRÁT, J. — HAUER, E. — MARR, R. — HARTL, J.: (Chemisch-technologische Hochschule, Praha; Institut für Thermische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik, Graz, Österreich): *Ausnutzung der reaktiven Extraktion bei der Milchsäuregewinnung aus dem Fermentationsbouillon*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 17—22.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kinetik und der Nutzeffekt der Milchsäureextraktion aus der Modelllösung und Fermentationsbouillon verglichen. Zur Extraktion wurden verschiedene Extraktionsgemenge auf der Basis von organischen Aminen angewendet. Es zeigt sich, dass man den Prozess der reaktiven Extraktion auch der Milchsäuregewinnung aus dem Fermentationsbouillon ausnützen kann. Die Art und Weise Prozessführung beeinflusst aber in grösserem Masse den Verlauf und die Selektivität der Extraktion.

reaktive Extraktion; Milchsäure; organische Amine; Fermentation

Adresy autorů:

Ing. Jiří Brát, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Dipl. Ing. Edgar Hauer, o. Univ. Prof., Dipl. Ing. Dr. Josef Hartl, techn. Rolf Marr, Institut für Thermische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik, Technische Universität, Inffeldgasse 25, Graz, Rakousko

ENZYMOVÉ ELEKTRODY PRO STANOVENÍ L-LAKTÁTU

E. Vrbová, M. Marek, B. Kleidus

VRBOVÁ, E. — MAREK, M. — KLEIDUS, B. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha; Výzkumný ústav výživy zvířat, Pohořelice u Brna): *Enzymové elektrody pro stanovení L-laktátu*. Potravinářské Vědy, 9, 1991, [1]: 23–32.

Biosenzory pro stanovení L-laktátu byly připraveny imobilizací laktátmonooxygenasy (dekarboxylující) nebo koimobilizací laktát oxidasy, laktátdehydrogenasy a katalasy na nylonovou sítku pomocí Ugiho reakce. Enzymové konjugáty byly fixovány na kyslíkové čidlo Clarkova typu. Připravené enzymové elektrody byly charakterizovány z hlediska vlivu pH a teploty na velikost odezvy biosenzoru, oblasti lineární závislosti odezvy na koncentraci substrátu, zdánlivé Michaelisovy konstanty $K_M(\text{app.})$ a stability biosenzorů. Připravené enzymové elektrody byly použity pro stanovení L-laktátu v mléčných výrobcích.

enzymová elektroda; biosenzor; L-laktát; mléčné výrobky

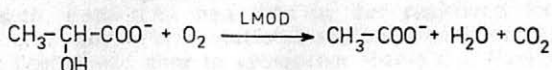
Rychlé, přesné, citlivé a dostatečně reprodukovatelné stanovení L-laktátu (dále laktátu) je velmi potřebné nejenom v oblasti klinické biochemie, kdy koncentrace laktátu v lidském organismu je důležitým ukazatelem jeho zdravotního stavu (Soutter et al., 1978; Walterová et al., 1983; Robinson, Sherwood, 1984), ale i v potravinářském průmyslu, zvláště v mlékárenství a při kontrole řady fermentačních procesů (Sechaud et al., 1988).

Kromě rutinních spektrofotometrických metod na bázi laktátdehydrogenasy (Hohorst, 1970; Noll, 1970; Hochella, 1970), flavocytochromu b_2 (Prats, 1977; Pompon, Lederer, 1983; Racek, 1985) a laktát oxidasy (Fujikawa et al., 1985; Bozimowski et al., 1985) bylo vyvinuto několik metod elektrochemické detekce využívajících převážně amperometrických biosenzorů. Enzymové elektrody s imobilizovanou laktátdehydrogenasou (L-LDH; Cenas et al., 1984; Blaedel, Engstrom, 1984; Laval et al., 1984) nebo flavocytochromem b_2 (Kulys, Svirnickas, 1979; Kulys, 1986) vykazovaly nízkou stabilitu při současně závislosti na přídavku (Durliat et al., 1979; Cenas et al., 1984; Blaedel, Engstrom, 1984; Laval et al., 1984; Vadgama et al., 1986) nebo koimobilizací akceptoru elektronů (Blaedel, Jenkins, 1976; Kulys, Malinauskas, 1979; Mahenc et al., 1980; Kulys et al., 1981; Kulys, Svirnickas, 1981; Ikeda et al., 1988).

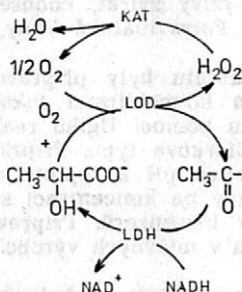
V případě enzymových elektrod na bázi laktát oxidasy (Karube et al., 1980; Matsunaga et al., 1981; Mizutani et al., 1983; Clark et al., 1984; Scheller et al., 1986; Bardeletti et al., 1986; Sechaud et al., 1989) nebo laktátmonooxygenasy (LMO; Mascini et al., 1983, 1984; Weigelt et al., 1987) byly připraveny velmi citlivé biosenzory zvláště po doplnění koimobilizovanými systémy (Mizutani et al., 1985; Schubert et al., 1985; Scheller et al., 1985; Wollenberger et al., 1987).

Náš příspěvek je věnován přípravě enzymových elektrod pro stanovení laktátu na bázi dvou odlišných enzymových systémů s amperometrickou detekcí a jejich porovnání z hlediska rychlosti odezvy, délky analýzy, stability a vhodnosti pro stanovení laktátu v reálných vzorcích mlékařenského průmyslu.

První systém spočívá v oxidativní dekarboxylaci laktátu za současné spotřeby kyslíku katalyzované laktátmonooxygenasou (dekarboxylující):



V případě druhého systému vzniká působením laktát oxidasy z laktátu pyruvát a kyslík je redukován na peroxid vodíku.



Vzhledem k tomu, že vznikající peroxid vodíku inhibuje laktát oxidasu, je pro jeho odstranění z reakční směsi výhodné koimobilizovat katalasu (KAT), i když tento enzym regeneruje polovinu spotřebovaného kyslíku zpět do reakce. Velikost odezvy biosenzoru, a tím i citlivost stanovení, se výrazně zvyšuje koimobilizací dalšího enzymu — laktát dehydrogenasy, která v přítomnosti NADH vznikající pyruvát převádí zpět na laktát, přičemž rovnováha této reakce je zcela posunuta ve směru tvorby laktátu.

MATERIÁL A METODY

L-Laktát-2-monooxygenasa [LMOD, E.C.1.13.12.4, z *Mycobacterium smegmatis*, 74,3 U/mg], laktát oxidasa [LOD, z *Pediococcus species*, 30 U/mg], L-laktát dehydrogenasa (L-LDH, E.C.1.1.1.27 z králíčího svalu, typ XI, 850 U/mg) a reduková forma β-nikotinamidadeninukleotidu, dvojsodná sůl, z kvasinek (NADH) byly získány od fy Sigma (USA). Katalasa [KAT, E.C.1.11.1.6, z hovězích jater, 2000 U/mg suspenze] byla získána od fy Reanal (Maďarsko), flavinadeninukleotid, dvojsodná sůl (FAD) a cyklohexylisokyanid od fy Fluka (Švýcarsko) a glutaraldehyd (25% vodný roztok) od fy Koch-Light Laboratories (Velká Británie). Standardní roztoky laktátu byly připraveny titrací 20% vodného roztoku kyseliny L-mléčné (dodané fy Koch-Light Laboratories, V. Británie) na pH 6,0 pomocí hydroxidu sodného ($c = 1 \text{ mol/dm}^3$) a doplněním citrátovým pufrům pH 6,0 na žádaný objem, ev. titrací kyseliny L-mléčné na pH 7,1 pomocí hydroxidu draselného ($c = 1 \text{ mol/dm}^3$) a doplněním draselno-fosfátovým pufrům, pH 7,1 s chloridem draselným ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$), chloridem hořečnatým ($c = 0,01 \text{ mol/dm}^3$) a FAD ($c = 0,01 \text{ mol/dm}^3$) na žádaný objem. Ostatní chemikálie analytické čistoty byly dodány s. p. Lachema, Brno. Pro imobilizace byla použita nylonová síťka UHELON 63 (Řempeno, Praha). Kyslíkové čidlo Clarkova typu (SOPS 31), nanoampérmetr se stabilizovaným zdrojem stejnosměrného polarizačního napětí a člen pro derivaci signálu byly vyrobeny s. p. Chemoprojekt, Satalice.

Imobilizace laktátmonooxygenasy na nylonovou síťku

Nylonová síťka byla hydrolyzována 25% kyselinou chlorovodíkovou po dobu 1 s. Poté byla síťka důkladně promyta destilovanou vodou a volně usušena. Na její hydrolyzovaný povrch bylo nanášeno 24 μl roztoku laktátmonooxygenasy připraveného roz-

puštěním 0,8 mg enzymového preparátu ve 200 μ l citrátového pufru, ($c = 0,1$ mol/dm³), pH 6,0, 5 μ l 5% vodného roztoku glutaraldehydu a 1 μ l cyklohexylisokyanidu. Po čtyřech dnech při 4 °C byla síťka promyta výše uvedeným pufrům a v tomto pufru také uchovávána.

Koimobilizace laktát oxidasy, laktát dehydrogenasy a katalasy na nylonovou síťku

Na povrch síťky, kde byla provedena parciální hydrolýza, bylo aplikováno 20 μ l roztoku směsi enzymů laktát oxidasy a laktát dehydrogenasy. Roztok byl připraven rozpouštěním 3 mg laktát oxidasy a 2 mg L-laktát dehydrogenasy ve 100 μ l draselno-fosfátového pufru ($c = 0,1$ mol/dm³), pH 7,1, obsahujícího 0,1 mol chloridu draselného, 0,01 mol chloridu hořečnatého a 0,01 mmol FAD v 1 dm³. K roztoku enzymů bylo dále pipetováno 2,5 μ l neředěné suspenze katalasy, 5 μ l 5% vodného roztoku glutaraldehydu a 1 μ l cyklohexylisokyanidu. Po čtyřech dnech při 4 °C byla síťka promyta výše uvedeným draselno-fosfátovým pufrům.

Příprava enzymových elektrod pro stanovení laktátu a způsob jejich použití

Nosič s imobilizovanými enzymy byl pevně fixován na povrchu Clarkova kyslíkového čidla. Enzymová elektroda byla vsunuta do temperované (30 °C) míchané reakční nádoby (1,5 ml), do které bylo pipetováno 1,4 ml citrátového pufru ($c = 0,1$ mol/dm³), pH 6,0 (v případě imobilizované laktát monooxygenasy) nebo 1,3 ml draselno-fosfátového pufru ($c = 0,1$ mol/dm³), pH 7,1 (obsahujícího 0,1 mol chloridu draselného, 0,01 mol chloridu hořečnatého a 0,01 mmol FAD v 1 dm³) a 100 μ l 0,1 mol NADH v 1 dm³ (v případě koimobilizovaných enzymů laktát oxidasy, L-laktát dehydrogenasy a katalasy). Standardní (při dané teplotě) obsah vzdušného kyslíku v pufru byl zajištěn intenzivním mícháním. Reakce byla startována nástřikem 100 μ l vzorku laktátu v příslušném pufru pH 6,0, resp. 7,1. Signál enzymové elektrody byl měřen nanoampérmetrem se stabilizovaným zdrojem stejnosměrného polarizačního napětí a členem pro derivaci signálu. Prostý signál i jeho derivace byly registrovány pomocí zapisovače TZ 4200 (Laboratorní přístroje, Praha, ČSFR).

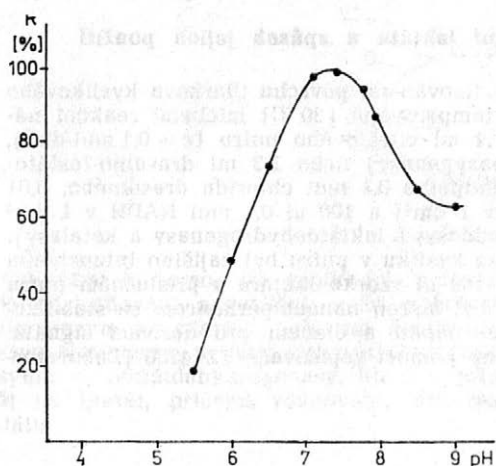
Charakterizace enzymových elektrod

Stanovení pH optima bylo prováděno v provzdušňovaném citrátovém ($c = 0,1$ mol/dm³) (LMD), resp. draselno-fosfátovém ($c = 0,1$ mol/dm³) pufru (LOD, L-LDH, KAT) obsahujícím chlorid draselný a FAD v rozmezí 4 až 9 pH jednotek v nadbytku substrátu (100 μ l laktátu ($c = 0,1$ mol/dm³)). Vliv teploty byl testován v teplotním rozmezí 22 až 66 °C v nadbytku substrátu při pH 6,0 (LMD), resp. 7,1 (LOD, L-LDH, KAT) způsobem shodným s výše uvedeným. Po každé změně hodnoty pH nebo teploty byl systém ustalován 10 minut.

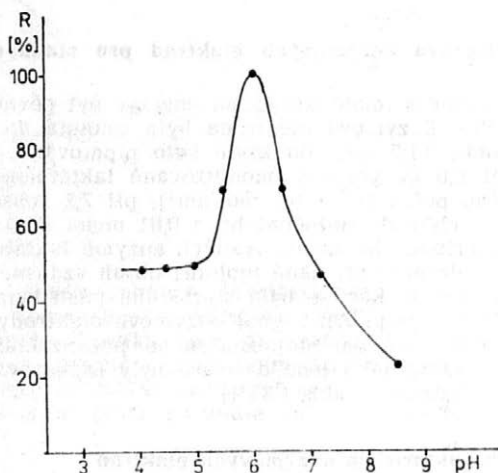
VÝSLEDKY A DISKUSE

Laktát monooxygenasa byla imobilizovaná kovalentní vazbou na nylonovou síťku metodou již dříve popsanou v našich pracích (Valentová et al., 1983; Vrbová, Marek, 1990). Stejným způsobem byly koimobilizovány i laktát oxidasa, L-laktát dehydrogenasa a katalasa (za přítomnosti glutaraldehydu a cyklohexylisokyanidu). Několikanásobné zvýšení odezvy vyvolané recyklem laktátu koimobilizací L-LDH v přítomnosti redukováné formy nikotinamidadenindinukleotidu (Mizutani et al., 1985; Wollenberger et al., 1987; Scheller et al., 1985) a ochrana enzymového systému před působením peroxidu vodíku včetně zabezpečení vyššího obsahu kyslíku (Shinbo et al., 1979; Vrbová, Marek, 1990) bylo již prokázáno dříve. Množství imobilizovaných enzymů bylo voleno tak, aby nejpomalejší a tedy rozhodující katalyzovanou reakcí byla přeměna laktátu na pyruvát.

Laktátové biosenzory byly charakterizovány z hlediska vlivu pH na velikost odezvy biosenzoru (obr. 1 a 2). Vzhledem k tomu, že aktivita LMOD je výrazně ovlivňována složením reakční směsi (Mascini et al., 1984), byla všechna měření prováděna v citrátovém pufru. Křivka pH optima tohoto enzymu vykazovala ostré maximum při pH 6,0, získaná hodnota byla ve shodě s literárními údaji pro volný i imobilizovaný enzym (Mascini et al., 1984; Weigelt et al., 1987). Optimum pH enzymového konjugátu LOD, L-LDH, KAT odpovídalo hodnotám $pH_{opt.}$ volné LOD (Mizutani et al., 1983), L-LDH (Henry et al., 1960; Bergmeyer et al., 1983) a $pH_{opt.}$ laktátového biosenzoru s LOD (Karube et al., 1980), tj. pH 7,3 až 7,4, přičemž 90 % aktivity si tato enzymová elektroda zachovala v rozmezí pH 6,8 až 7,7.



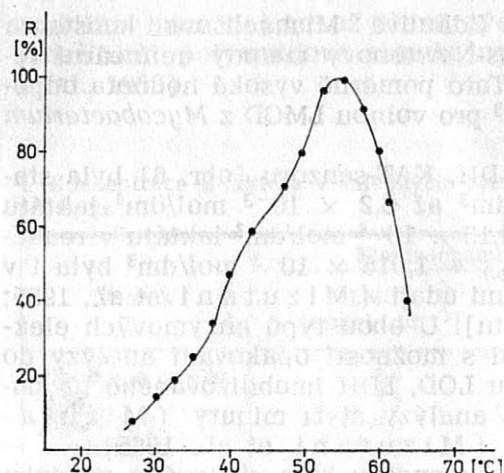
1. Vliv pH na velikost odezvy biosenzoru s LMOD — The effect of pH on the level of response of biosensor with LMOD



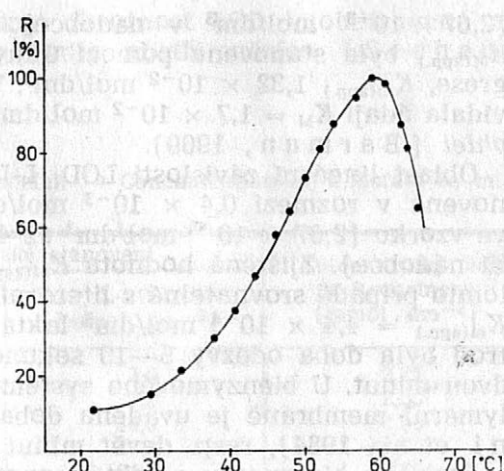
2. Vliv pH na velikost odezvy biosenzoru s LOD, L-LDH a KAT — The effect of pH on the level of response of biosensor with LOD, L-LDH and KAT

Vliv teploty se u LMOD-senzoru (obr. 3) zřetelně projevil v rozmezí od 40 do 60 °C, kdy byla odezva biosenzoru nejvyšší. Po překročení této teploty nastal prudký pokles aktivity enzymu způsobený jeho denaturací. V této oblasti připadlo na každý °C zvýšení odezvy o 3,6 %. Při 30 °C byl laktátový biosenzor ještě dostatečně aktivní, proto byla pro vlastní stanovení laktátu zvolena tato hodnota, především s ohledem na požadovanou stabilitu enzymové elektrody. Z průběhu teplotní závislosti odezvy LOD, L-LDH, KAT-senzoru (obr. 4), který je podobný teplotní závislosti LMOD-senzoru, byla zjištěna maximální odezva při teplotě 56 °C. Velikost odezvy biosenzoru při 30 °C byla i v tomto případě dostatečná.

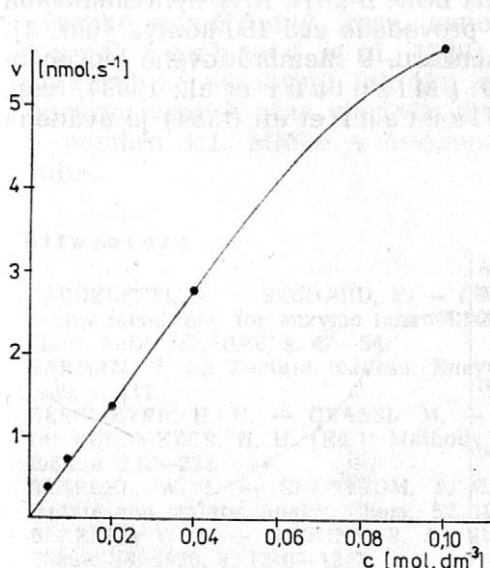
Z kalibrační křivky (obr. 5) byla určena oblast lineární závislosti odezvy LMOD-biosenzoru (rychlost úbytku kyslíku v reakční směsi) na koncentraci laktátu v rozsahu jednoho řádu se spodní hranicí stanovitelnosti 1×10^{-3} mol/dm³ laktátu v nástríku vzorku ($6,67 \times 10^{-5}$ mol/dm³ v reakční nádobce) a horní hranicí 4×10^{-2} mol/dm³ laktátu ve vzorku



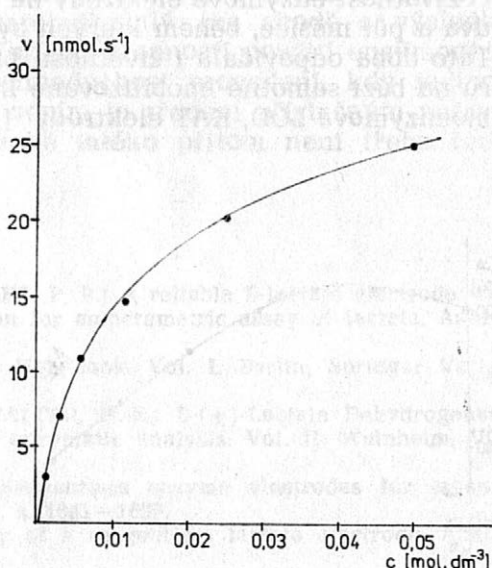
3. Vliv teploty na velikost odezvy biosenzoru s LMOD — The effect of temperature on the level of response of the biosensor with LMOD



4. Vliv teploty na velikost odezvy biosenzoru s LOD, L-LDH a KAT — The effect of temperature on the level of response of the biosensor with LOD, L-LDH and KAT



5. Kalibrační křivka pro stanovení laktátu s LMOD [c — koncentrace laktátu v nástríku vzorku; v — rychlost úbytku kyslíku v reakční směsi] — Calibration curve for determination of lactate with LMOD [c — concentration of lactate in the feed of a sample; v — rate of decrease in oxygen in the reaction mixture]



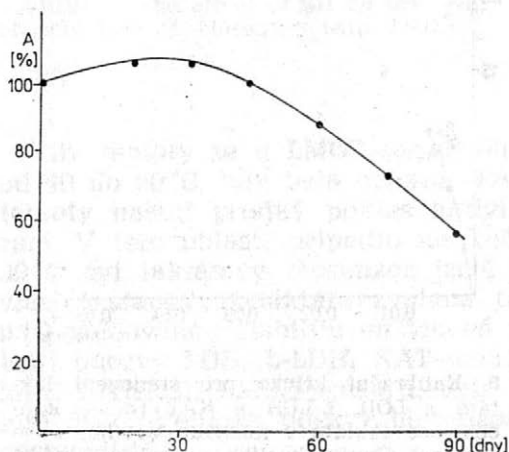
6. Kalibrační křivka pro stanovení laktátu s LOD, L-LDH a KAT [c — koncentrace laktátu v nástríku vzorku; v — rychlost úbytku kyslíku v reakční směsi] — Calibration curve to determine lactate with LOD, L-LDH and KAT [c — lactate concentration in the feed of a sample; v — rate of reduction in oxygen in reaction mixture]

($2,67 \times 10^{-3}$ mol/dm³ v nádobce). Zdánlivá Michaelisova konstanta $K_{M(\text{app.})}$ byla stanovena pomocí Gauss-Newtonovy metody nelineární regrese, $K_{M(\text{app.})} = 1,32 \times 10^{-2}$ mol/dm³. Tato poměrně vysoká hodnota odpovídala údaji $K_M = 1,7 \times 10^{-2}$ mol/dm³ pro volnou LMOD z *Mycobacterium phlei* (Barman, 1969).

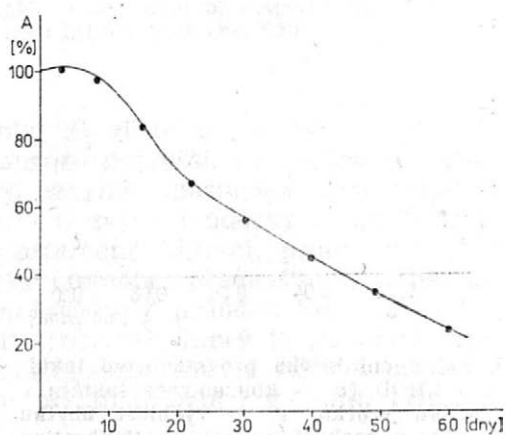
Oblast lineární závislosti LOD, L-LDH, KAT-senzoru (obr. 6) byla stanovena v rozmezí $0,4 \times 10^{-3}$ mol/dm³ až $6,2 \times 10^{-3}$ mol/dm³ laktátu ve vzorku ($2,67 \times 10^{-5}$ mol/dm³ až $4,13 \times 10^{-4}$ mol/dm³ laktátu v reakční nádobce). Zjištěná hodnota $K_{M(\text{app.})} = 1,015 \times 10^{-3}$ mol/dm³ byla i v tomto případě srovnatelná s literárními údaji (Mizutani et al., 1985; $K_{M(\text{app.})} = 4,4 \times 10^{-4}$ mol/dm³ laktátu). U obou typů enzymových elektrod byla doba odezvy 5–10 sekund s možností opakování analýzy do dvou minut. U bienzymového systému LOD, LDH imobilizovaného na polymerní membráně je uváděna doba analýzy čtyři minuty (Mizutani et al., 1984), resp. devět minut (Mizutani et al., 1985).

Stabilita biosenzoru s laktátmonooxygenasou byla sledována po dobu tří měsíců, kdy bylo s jediným enzymovým konjugátem provedeno asi 200 analýz (obr. 7). Na konci tohoto období poklesla aktivita biosenzoru na 55 % své původní hodnoty. Tento údaj byl srovnatelný s laktátovými biosensory, kde byla LMOD vázána na sítku kovalentní vazbou experimentálně náročnějším postupem přes tvorbu azidů karboxylových kyselin (životnost dva měsíce) (Mascini et al., 1984) nebo byla zachycena v matici želatiny chráněné dialyzační membránou (stabilita 55 dní) (Weigelt et al., 1987).

Životnost enzymové elektrody na bázi LOD, L-LDH, KAT byla sledována dva a půl měsíce, během kterých bylo provedeno cca 150 analýz (obr. 8). Tato doba odpovídala i životnosti biosenzoru. U membránového biosenzoru na bázi samotné imobilizované LOD (Mizutani et al., 1983), resp. bienzymové LOD, KAT elektrody (Mizutani et al., 1984) je uváděna



7. Stabilita biosenzoru s LMOD v závislosti na čase (A — aktivita) — Stability of biosensor with LMOD in dependence on time (A — activity)



8. Stabilita biosenzoru s LOD, L-LDH a KAT (A — aktivita) — Stability of biosensor with LOD, L-LDH and KAT (A — activity)

stabilita mezi dvěma až třemi týdny. Životnost LOD imobilizované na bioafinitní polyamidové membrány činila až tři měsíce [Sechaud et al., 1989].

I. Koncentrace L-laktátu v mléčných výrobcích — Concentration of L-lactate in milk products

Vzorek	Elektrochemické stanovení		Fotometrický set fy Boehringer [mmol . dm ⁻³]
	LMOD [mmol . dm ⁻³]	LOD, L-LDH, KAT [mmol . dm ⁻³]	
Plnotučné mléko	2,5	2,0	2,25
Malko	2,5	2,1	2,20
Jogurt bílý	56,0	54,0	54,50
Jovokokteil	48,6	48,6	48,00
Biokys	62,0	61,0	62,20

Připravené biosenzory byly využity pro stanovení obsahu laktátu v mléčných výrobcích (tab. I). Zjištěné hodnoty byly porovnány s koncentracemi laktátu určenými fotometrickým setem fy Boehringer. Elektrochemické stanovení pomocí enzymových elektrod bylo v obou případech v dobré shodě s výsledky získanými fotometricky. Případný interferující obsah pyruvátu u LOD, L-LDH, KAT-biosenzoru byl u mléka a mléčných výrobků neměřitelný, resp. zanedbatelně malý (ve shodě s výsledky v práci Sechaud et al., 1989). Velikou předností použití enzymových elektrod ke stanovení laktátu je jednoduchost provedení, kdy jedinou úpravou vzorků před vlastním stanovením je zředění příslušným pufrům v poměru 1:1. Mléko a kondenzované mléko přitom není třeba ředit vůbec.

Literatura

- BARDELETTI, G. — SECHAUD, F. — COULET, P. R.: A reliable L-lactate electrode with a new membrane for enzyme immobilization for amperometric assay of lactate. *Analyt. Chim. Acta*, 187, 1986, s. 47—54.
- BARMAN, T. E.: Lactate oxidase. *Enzyme Handbook*. Vol. I, Berlin, Springer Verlag, 1969, s. 111.
- BERGMAYER, H. U. — GRASSL, M. — WALTER, H.-E.: L-(+)-Lactate Dehydrogenase. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.): *Methods of enzymatic analysis*. Vol. II. Weinheim, VCH 1983, s. 232—233.
- BLAEDEL, W. J. — ENGSTROM, R. C.: Reagentless enzyme electrodes for ethanol, lactate and malate. *Analyt. Chem.*, 52, 1980, s. 1691—1697.
- BLAEDEL, W. J. — JENKINS, R. A.: Study of a reagentless lactate electrode. *Analyt. Chem.*, 48, 1976, s. 1240—1247.
- BOZIMOWSLI, D. — ARTISS, J. D. — ZAK, B.: Sensitive determination of cerebrospinal fluid pyruvate, lactate and glucose concentrations. *Clin. Chim. Acta*, 153, 1985, s. 63—69.
- CENAS, N. — ROZGAITE, J. — KULYS, J.: Lactate, pyruvate, ethanol and glucose-6-phosphate determination. *Biotechnol. Bioengng.*, 26, 1984, s. 551—553.
- CLARK, L. C. — NOYES, L. K. — GROOMS, T. A. — GLEASON, C. A.: Rapid electro-enzymic measurement of lactate in microsamples of spinal fluid. *Clin. Biochem.*, 17, 1984, s. 288—291.
- DURLIAT, H. — COMTAT, M. — MAHENC, J.: A device for the continuous assay of lactate. *Analyt. chim. Acta*, 106, 1979, s. 131—135.

- FUJIKAWA, K. — KOMATSUDA, I. — INONE, M. — MARUOKA, E. — IMATAKA, K. — NISHINA, T.: A microcolorimetric method for determination of blood lactate using lactate oxidase. *Rinsho Kagaku*, 14, 1985, s. 198—203.
- HENRY, R. J. — CHIAMORI, N. — GOLUB, O. J. — BERKMAN, S.: Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 34, 1960, s. 381—398.
- HOHORST, H.-J.: L-(+)-Lactat. Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.): *Methoden der enzymatischen Analyse*. Vol. II., Akademie-Verlag 1970, s. 1425—1429.
- HOCELLA, N. J.: L-(+)-Lactat. Bestimmung mit Analysenautomaten. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.): *Methoden der enzymatischen Analyse*. Vol. II., Akademie-Verlag 1970, s. 1438—1449.
- IKEDA, T. — SHIRAISHI, T. — SENDA, M.: An efficient method for entrapping ionic mediators in the enzyme layer of mediated amperometric biosensors. *Agric. biol. Chem.*, 52, 1988, s. 3187—3188.
- KARUBE, I. — MATSUNAGA, T. — TERAOKA, T. — SUZUKI, S.: Microbioassay of phenylalanine in blood sera with a lactate electrode. *Analyt. chim. Acta*, 119, 1980, s. 271—276.
- KULYS, J. J.: Enzyme electrodes based on organic metals. *Biosensors*, 2, 1986, s. 3—13.
- KULYS, J. J. — LAURINAVICIUS, V. — MALINAUSKAS, A. A. — PESLEKIENE, M. — SAMALIUS, A. — SVIRMICKAS, G.: Enzymic electrodes sensitive to metabolites. *Otkrytiya, Izobret., Prom. Obratzty, Tovarnye Znaki*, 47, 1981, s. 124.
- KULYS, J. J. — MALINAUSKAS, A. A.: Flow-through enzyme electrode based on dehydrogenases with regeneration of cofactor [NAD]. *Zhr. Anal. Khim.*, 34, 1979, s. 876—881.
- KULYS, J. J. — SVIRMICKAS, G.: Biochemical cells for the determination of lactate. *Analyt. chim. Acta*, 109, 1979, s. 55—60.
- KULYS, J. J. — SVIRMICKAS, G.: Reagentless lactate sensor based on cytochrome b_2 . *Analyt. chim. Acta*, 117, 1980, s. 115—120.
- KULYS, J. J. — SVIRMICKAS, G.: Device for lactate determination. 1981, *Sov. Pat.* 894 534.
- LAVAL, J.-M. — BOURDILLON, C. — MOIROUX, J.: Enzymic electrocatalysis: Electrochemical regeneration of NAD^+ with immobilized lactate dehydrogenase modified electrode. *J. Amer. chem. Soc.*, 106, 1984, s. 4701—4706.
- MAHENC, J. — COMTAT, M. — DURLIAT, H.: Apparatus and methods for measuring the concentration of a solution in a substrate oxidizable by an enzymic reaction. 1980, *Fr. Pat.* 2 439 995.
- MASCINI, M. — MOSCONE, D. — PALLESCHI, G.: A lactate electrode with lactate oxidase immobilized on nylon net for blood serum samples in flow systems. *Analyt. chim. Acta*, 157, 1984, s. 45—51.
- MASCINI, M. — PALLESCHI, G. — MOSCONE, D.: Lactate electrode obtained with lactate oxidase and an oxygen electrode for serum samples. *Analyt. Chem. Symp.*, Ser. 17, 1983, s. 603—608.
- MATSUNAGA, T. — KARUBE, I. — TERAOKA, N. — SUZUKI, S.: Rapid determination of phenylalanine with immobilized *Leuconostoc mesenteroides* and a lactate electrode. *Analyt. chim. Acta*, 127, 1981, s. 245—249.
- MIZUTANI, F. — SASAKI, K. — SHIMURA, Y.: Sequential determination of L-lactate and lactate dehydrogenase with immobilized enzyme electrode. *Analyt. Chem.*, 55, 1983, s. 35—38.
- MIZUTANI, F. — SHIMURA, Y. — TSUDA, K.: Catalytic assay of L-lactate or pyruvate with an enzyme based on immobilized lactate oxidase and lactate dehydrogenase. *Chem. Lett.*, 2, 1984, s. 199—202.
- MIZUTANI, F. — YAMANAKA, T. — TANABE, Y. — TSUDA, K.: An enzyme electrode for L-lactate with a chemically amplified response. *Analyt. chim. Acta*, 177, 1985, s. 153—166.
- NOLL, F.: L-(+)-Lactat. Bestimmung mit LDH, GPT und NAD. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.): *Methoden der enzymatischen Analyse*. Vol. II., Akademie-Verlag 1970, s. 1433—1437.
- POMPON, D. — LEDERER, F.: A cysteine cluster critical for flavin building in flavocytochrom b_2 from bakers's yeast. *Eur. J. Biochem.*, 131, 1983, s. 359—365.
- PRATS, M.: Complexes between L-(+)-lactate: cytochrom c oxidoreductase extracted from the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* or *Hansenula anomala* and horse heart cytochrom c. *Biochimie*, 59, 1977, s. 621—626.

- RACEK, J.: Determination of lactate concentrations in plasma using L-lactate ferri-cytochrome c oxidoreductase and tetrazolium salt. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 23, 1985, s. 883—885.
- ROBINSON, B. H. — SHERWOOD, W. G.: Lactic acidemia. *J. Inter. Metab. Dis.*, 7, Suppl. 1, 1984, s. 69—73.
- SECHAUD, F. — PEGUIN, S. — COULET, P. R. — BARDELETTI, G.: Fast and reliable organic acid determination in fermented milk using an enzyme electrode based analyser. *Process Biochem.*, 1989, s. 33—38.
- SECHAUD, F. — PEGUIN, S. — BARDELETTI, G.: Suivi de fermentation lactique a l'aide d'electrodes enzymatiques. Troisieme colloque national de bioelectrochimie asissois, 1988, s. 207—212.
- SHINBO, T. — SUGIURA, M. — KAMO, N.: Potentiometric enzyme electrode for lactate. *Analyt. Chem.*, 51, 1979, s. 100—104.
- SCHELLER, F. — SIEGBAHN, N. — DANIELSSON, B. — MOSBACH, K.: High sensitivity enzyme thermistor determination of L-lactate by substrate recycling. *Analyt. Chem.*, 57, 1985, s. 1740—1743.
- SCHELLER, F. — SCHUBERT, F. — OLSSON, B. — GORTON, L. — JOHANSSON, G.: Flow injection analysis of lactate and lactate dehydrogenase using an enzyme membrane in conjunction with a modified electrode. *Analyt. Lett.*, 19, 1986, s. 1691—1703.
- SCHUBERT, F. — KIRSTEIN, D. — SCHOEDER, K. L. — SCHELLER, F. W.: Enzyme electrodes with substrate and coenzyme amplification. *Analyt. chim. Acta*, 169, 1985, s. 391—396.
- SOUTTER, W. P. — SHARP, F. — CLARK, D. M.: Bedside estimation of whole blood lactate. *Brit. J. Anaesth.*, 50, 1978, s. 445—450.
- VADGAMA, P. — COVINGTON, A. K. — ALBERTI, K. G. M. M.: Amperometric enzyme electrode system for extracorporeal lactate monitoring based on lactate dehydrogenase. *Analyst*, 111, 1986, s. 803—807.
- VALENTOVÁ, O. — MAREK, M. — ALBRECHTOVÁ, I. — ALBRECHT, J. — KÁŠ, J.: Enzymic determination of glucose in foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 1983, s. 748—754.
- VRBOVÁ, E. — MAREK, M.: Application of the Ugi reaction for the preparation of enzyme electrodes. *Analyt. chim. Acta*, 239, 1990, s. 263—268.
- WALTEROVÁ, D. — STRÁNSKÝ, Z. — BARTEK, N. — SEIDLOVÁ, V.: Comparison of methods for determination of lactic acid by capillary isotachopheresis and commercial enzyme sets. *Biochem. Clin. bohemoslov.*, 12, 1983, s. 147—153.
- WEIGELT, D. — SCHUBERT, F. — SCHELLER, F.: Enzyme sensor for the determination of lactate and lactate dehydrogenase activity. *Analyst*, 112, 1987, s. 1155—1158.
- WOLLENBERGER, V. — SCHUBERT, F. — SCHELLER, F. — DANIELSSON, B. — MOSBACH, K.: Coupled reactions with immobilized enzymes in biosensors. *Stud. Biophys.*, 119, 1987, s. 167—170.

Došlo dne 26. 7. 1990

ВРБОВА, Э. — МАРЕК, М. — КЛАЙДУС, Б. (Химико-технологический институт, Прага; Научно-исследовательский институт питания животных, Погоржелице-Брно): Ферментные электроды, нужные для определения Л-лактата. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 23—32.

Биосенсоры для определения Л-лактата были приготовлены путем иммобилизации лактат-монооксигеназы (декарбоксилирующей) или коиммобилизации лактатоксидазы лактатдегидрогеназы и каталазы на нейлоновой сетке с помощью реакции Уги. Ферментные конъюгаты фиксированы на кислородном датчике типа Кларка. Приготовленные ферментные электроды охарактеризованы с точки зрения влияния pH и температуры на размер реакции биосенсора, области линейной зависимости реакции от концентрации субстрата, кажущейся константы $K_{M(app)}$ Михаелиса и стабильности биосенсоров. Приготовленные ферментные электроды послужили для определения Л-лактата в молочных продуктах.

ферментный электрод; биосенсор; Л-лактат; молочные продукты

VRBOVÁ, E. — MAREK, M. — KLEIDUS, B. (University of Chemical Technology, Praha; Research Institute of Animal Nutrition, Pohořelice u Brna): *Enzyme electrodes for L-lactate determination*. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 23—32.

Biosensors to determine L-lactate have been prepared by immobilization of lactate-monooxygenase (decarboxylating) or by co-immobilization of lactate-oxidase, lactate-dehydrogenase and catalase on the nylon net through Ugi reaction. Enzyme conjugates were fixed on the oxygen sensor of the Clark type. Prepared enzyme electrodes were characterized from the viewpoint of effect of pH and temperature on the level of response of biosensor, the area of linear dependence of response on the substrate concentration, apparent Michaelis constant $K_{M(app)}$ and the stability of biosensors. Prepared enzyme electrodes were used to determine L-lactate in milk products.

enzyme electrode; biosensor; L-lactate; milk products

VRBOVÁ, M. — MAREK, M. — KLEIDUS, B. (Hochschule für Chemie und Technologie, Praha; Forschungsinstitut für Tierernährung, Pohořelice u Brna): *Enzymeelektroden für die Bestimmung von L-Laktat*. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 23—32.

Biosensoren für die Bestimmung von L-Laktat wurden durch Immobilisation der Laktatmonooxygenase (dekarboxylierend) oder durch Koimmobilisation der Laktatoxidase der Laktatdehydrogenase und der Katalase auf das Nylonnetz mit Hilfe der Ugischen Reaktion vorbereitet. Enzymkonjugate wurden auf den Sauerstofffühler des Clark-Typen fixiert. Die vorbereiteten Enzymelektroden wurden aus der Sicht des Einflusses des pH-Wertes und der Temperatur auf die Reaktion des Biosensors, des Gebietes der linearen Abhängigkeit der Reaktion von der Substratkonzentration, der scheinbaren Michaelis-Konstante $K_{M(spp.)}$ und der Stabilität der Sensoren charakterisiert. Die vorbereiteten Enzymelektroden wurden zur Bestimmung von L-Laktat in Milchprodukten herangezogen.

Enzymelektrode; Biosensoren; L-Laktat; Milchprodukte

Adresy autorů:

Ing. Eva Vrbová, doc. ing. Miroslav Marek, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Bořivoj Kleidus, Výzkumný ústav výživy zvířat, Vídeňská 699, 691 23 Pohořelice u Brna

ZMĚNY REOLOGICKÉHO CHOVÁNÍ MASA V ZÁVISLOSTI NA STUPNI DESINTEGRACE A NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH

P. Pipek, V. Sinevič

PIPEK, P. — SINEVIČ, V. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha): *Změny reologického chování masa v závislosti na stupni desintegrace a na vnějších podmínkách*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 33–44.

Byl sledován vliv stupně desintegrace, teploty a obsahu tuku na reologické chování hrubě desintegrovaného masa a na časové změny reologických veličin v klidu a při působení mechanické síly. Maso předřezané na řezačce (průměr otvorů desky 13 mm, není-li uvedeno jinak) bylo homogenizováno na pásové míchače s přídatkem 2,5 %hm. soli a 10 %hm. vody. Reologické chování vzorků bylo sledováno pomocí rotační reometrie. Vliv stupně desintegrace se projevil maximem meze toku při průměru otvorů řezací desky 6–8 mm. Od okamžiku namíchání vzorků docházelo k nárůstu meze toku, která dosáhne během 24 hodin maximální, konečné hodnoty. Působením mechanické síly (míchání, čerpání) se mez toku sníží; je-li poté maso ponecháno v klidu, mez toku opět roste a dosáhne prakticky původní hodnoty. Rostoucí teplota snižuje hodnotu meze toku (v rozmezí 0–25 °C), má vliv i na rychlost nárůstu meze toku po namíchání. Všechny uvedené závislosti jsou významně ovlivněny obsahem tuku. Byla potvrzena úzká souvislost reologických veličin a obsahu volné vody (měřeno kapilárním volumetrem).

reologie; desintegrované maso; teplota; desintegrace; obsah tuku; časové změny; míchání; čerpání

Reologické chování předsoleného předřezaného masa je možné vyjádřit reologickým modelem (Pipek et al., 1989) ve tvaru

$$\tau = \tau_0 + K \cdot D^n$$

Hodnoty meze toku τ_0 , koeficientu konzistence K a indexu toku n jsou závislé na stupni desintegrace (velikosti částic), chemickém složení a teplotě, mění se i v závislosti na mechanickém namáhání (působení vnějších sil) a době uložení.

Literární údaje o tomto jejich chování se týkají většinou jemně mletého masa (homogenátů), případně dla salámů. S postupující desintegrací (zmenšující se velikostí částic) dla dochází k poklesu meze toku a viskozity. Zároveň roste i vaznost (Tóth, Hamm, 1968). Toto zvýšení vaznosti souvisí s uvolněním vláknité struktury masa. Lze proto předpokládat, že desintegrace svalových struktur mletím vede ke vzrůstu hydratace, tj. při výrobě měkkých salámů dochází k vazbě vody. Čím je maso intenzivněji mleté, tím větší je vaznost. Maso mleté na řezačce má tedy menší vaznost než maso kutrované. Zatímco v řezačce jsou oddělena svalová vlákna a rozrušeny buněčné membrány, při kutrování jde desintegrace hlouběji (Hamm, 1972).

Vliv mletí na vaznost (a tím zřejmě i na reologické chování) spočívá v tom, že rozrušením sarkolemmatu dojde k uvolnění myofibril, případně k jejich desintegraci

na filamenta, a zvyšuje se tak botnavost aktomyosinového systému. Čím je tedy struktura svaloviny silněji rozrušena, tím méně je bráněno v příjmu vody (Hamm, 1972).

Kromě vlastní desintegrace se podílí na změně reologického chování i působení mechanických sil, např. během míchání či čerpání. Při homogenizaci nařezaného masa dochází s postupující dobou homogenizace k botnání masa (Hamm, 1972).

Ponechají-li se čerstvě vyrobené svalové homogenáty nebo dílo stát v klidu, zvyšují se hodnoty viskozity a meze toku, přičemž při opětovném mechanickém působení na hmotu tyto hodnoty opět klesají (Tóth, Hamm, 1968, 1969). Pravděpodobně dochází při stání jemných homogenátů k tvorbě nových vazeb mezi částicemi, přičemž tyto vazby se porušují, pokud v důsledku působení vnějších sil dochází k vzájemnému pohybu částic (Hamm, 1972). Reologické chování masa je tedy časově závislé a rovněž závislé na intenzitě mechanického namáhání, jak již bylo uvedeno dříve (Pipek et al., 1989; Rede, Hamm, 1973).

Gorbatov et al. (1967) zjistili v případě díla, že během prvních dvou hodin po výrobě díla nedochází k žádným změnám reologických vlastností, po této době však dojde ke spontánnímu zpevnění díla, přičemž maxima se dosahuje po 9–10 hodinách. Také při stání hrubě mletého masa (štesů) byl pozorován nárůst meze toku (Pipek et al., 1989). Na rozdíl od údajů Gorbatova však byl pozorován nárůst ihned po namíchání. Tento nárůst byl zpočátku velmi prudký, postupně se zpomaloval a během 24 hodin bylo dosaženo maximální hodnoty meze toku, která se již dále prakticky neměnila.

Reologické chování masa je silně ovlivňováno obsahem tuku. Tento vliv byl sledován zejména u díla, kde byl např. pozorován růst zdánlivé viskozity s rostoucím obsahem tuku, přičemž při zvýšení obsahu tuku z 11 na 18 % došlo ke zvýšení meze toku τ_0 , nebyl však ovlivněn koeficient konzistence K a index toku n (Burge, Acton, 1984). Změny reologického chování souhlasí se známými vztahy mezi vazností a uzavřením tukových částic svalovými bílkovinami, dispergací tuku a měknutím tuku při vzestupu teploty ze 2 na 18 °C (Burge, Acton, 1984).

Reologické chování masa je tedy silně ovlivněno teplotou, která ve značné míře ovlivňuje konzistenci tuku, a tím i díla (Hamm, Rede, 1975). Se stoupající teplotou (v rozmezí 15–30 °C) dochází k poklesu viskozity i meze toku u díla obsahujícího tuk (Kiessling, Raeuber, 1981a, b). Dále je možné zjistit, že s rostoucím obsahem tuku v díle se vliv teploty na jeho reologické chování zvyrazňuje (Hamm, Rede, 1975).

Vliv obsahu tuku souvisí i s obsahem vody. Se vzrůstem obsahu vody v díle nejprve botnají svalová vlákna, teprve po jejich nasycení se začne zvětšovat vrstva bílkovinného roztoku mezi vlákny. Čím je dílo tučnější, tím méně svalová vlákna nabotnají, protože tuk neváže vodu (Kosoj, 1979). U díla s malým obsahem vody je vrstva bílkovinného roztoku mezi částicemi malá a tuk obklopující svalovou tkáň zvyšuje vazné síly mezi částicemi a způsobuje zvýšení meze toku. Při zvýšení obsahu tuku a vody roste mezivrstva vody mezi částicemi, síla spojení mezi částicemi se snižuje a mez toku se sníží (Kosoj, 1979).

V předložené studii byl sledován vliv uvedených parametrů na chování hrubě desintegrovaného masa. Chování díla není možné mechanicky převést na chování výše uvedených systémů vzhledem k rozdílné velikosti částic; dochází zde k jiným jevům zejména s ohledem na tvorbu bílkovinného roztoku a nižší úroveň rozptýlení tuku.

Bylo sledováno reologické chování různých typů výrobního masa (vepřového i hovězího) s rozdílným obsahem tuku, rozmělněného do různého stupně desintegrace a vystaveného rozdílným režimům mechanického namáhání.

MATERIÁL A METODY

V této studii bylo sledováno reologické chování různých typů výrobního masa (vepřového a hovězího) s rozdílným obsahem tuku, rozmělněného do různého stupně desintegrace a vystaveného rozdílným režimům mechanického namáhání.

Pro přípravu vzorků bylo maso o příslušném složení nařezáno na řezačce, přičemž průměr otvorů v desce řezačky byl většinou 13 mm; pouze při sledování vlivu stupně desintegrace bylo použito řady desek s různou velikostí otvorů [3, 4, 6, 8, 10, 13 a 20 mm]. Předřezané maso bylo homogenizováno s přidavkem 10 % vody a 2,5 % dusitanové solící směsi (směs NaCl a 0,5–0,6 % NaNO₂) v míchačce s pásovými míchadly po dobu tří minut.

Takto připravené směsi hrubě mletého masa byly naplněny do měřicích válcových nádobek o průměru 71 mm a výšce 117 mm. Do masa byly zasunuty měřicí axiálně rýhované válce a povrch vzorků byl zatížen závažím o hmotnosti 2 kg po dobu deseti minut, aby došlo k dokonalému zaplnění drážek vzorkem, odstranily se případné vzduchové bubliny a došlo k dokonalému ustředění měrných válců. U většiny vzorků se při přípravě i vlastním měření pohybovaly teploty v rozmezí $7 \pm 2^\circ\text{C}$, pouze při sledování teplotní závislosti byla teplota nastavována v rozmezí 0 až 25°C .

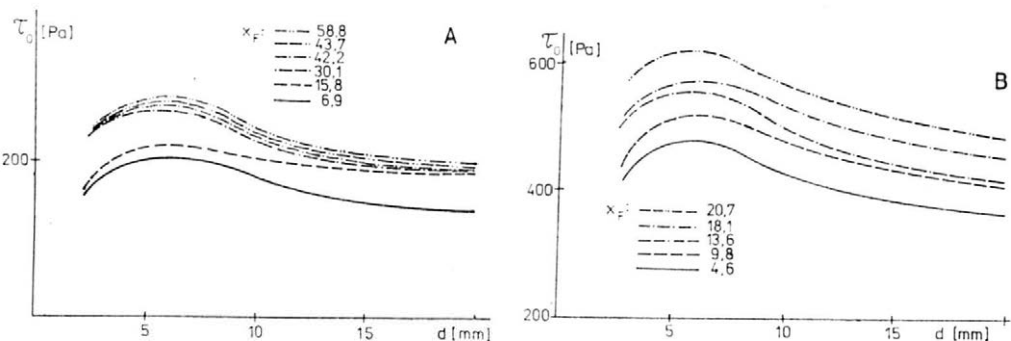
K vlastnímu měření reologických vlastností byl použit rotační viskozimetr Rheotest II. Byla měřena závislost tečného napětí na rychlosti smykové deformace a dále mez toku τ_0 jako napětí, při němž dojde k prvnímu pohybu měřicího válce v materiálu; tento okamžik byl indikován sepnutím elektrického obvodu a rozsvícením žárovky. Podrobnější popis metodiky měření i vyhodnocování veličin meze toku τ_0 , koeficientu konzistence K a indexu toku n uvádějí ve své práci Pipek et al. [1989].

Paralelně byl v některých případech sledován i obsah volné vody, a to pomocí kapilárního volumetru podle Hofmanna (výrobce August Grönert, SRN); vaznost byla pak udávána v μl vzduchu vytěsněného kapilárně nasátou vodou z pórů měrné sádkové destičky. Analýza chemického složení vycházela ze stanovení obsahu tuku na základě měření hustoty pomocí přístroje MH-03.

VÝSLEDKY A DISKUSE

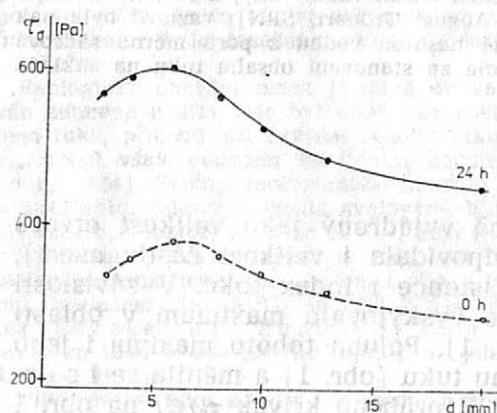
Stupeň desintegrace (d), konvenčně vyjádřený jako velikost otvorů v desce řezačky (tomuto rozměru odpovídala i velikost částic masa), ovlivňoval mez toku, koeficient konzistence i index toku. V závislosti meze toku na stupni desintegrace se vyskytovalo maximum v oblasti velikosti částic zhruba 6–8 mm (obr. 1). Poloha tohoto maxima i jeho výška je závislá na druhu masa, obsahu tuku (obr. 1) a měnila se i s časem ponechání masa v klidu (obr. 2). Z průběhu křivek $\tau_c(d)$ na obr. 1 lze vidět shodný vliv obsahu tuku pro oba druhy nařezaného masa na hodnoty meze toku, tj. při dané velikosti částic se s rostoucím obsahem tuku x_F zvyšují i hodnoty τ_0 .

Pokud se porovnávají průměrné hodnoty τ_0 pro vepřové a hovězí maso, lze na základě výsledků v obr. 1 konstatovat, že hodnoty τ_0 pro vepřové maso jsou významně nižší.

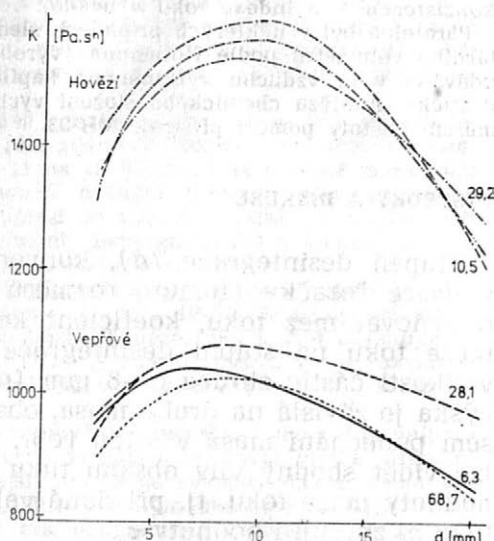


1. Závislost meze toku τ_0 na stupni desintegrace d při různých obsazích tuku (A — vepřové maso, B — hovězí maso) — Dependence of yield stress τ_0 on comminution degree d at different fat contents (A — pork, B — beef)

Stupeň desintegrace ovlivňoval i hodnotu koeficientu konzistence K a indexu toku n (obr. 3 a 4). Koeficient konzistence rostl s rostoucí velikostí částic, dosáhl maxima v oblasti 8–10 mm a poté opět klesal. U hovězího masa byly zjištěny významně vyšší hodnoty koeficientu konzistence K ; přitom u obou typů masa, tj. u hovězího a vepřového, lze z průběhu hodnot koeficientu konzistence odvodit závěr o relativně slabším vlivu obsahu tuku na hodnoty K ve srovnání s jeho vlivem na průběh meze toku τ_0 (obr. 1), což je možné přisoudit faktu, že hodnoty K se získají experimentálně a výpočetně složitější cestou nežli hodnoty τ_0 . Porovnáním hodnot K pro hovězí a vepřové maso lze při zhruba stejném obsahu tuku (29,2, resp. 28,1 %) rovněž ocenit vliv rozdílné struktury masa (rozměry svalových vláken, podíl pojivové tkáně) i kvality tukové tkáně.



2. Závislost meze toku τ_0 na stupni desintegrace d ihned po namíchání vzorku a po 24 hodinách ponechání v klidu (hovězí maso, 20,7 % tuku) — Dependence of the yield stress τ_0 on comminution degree d immediately after mixing the sample and 24 hours later after having left the meat at rest (beef, 20,7 % of fat)

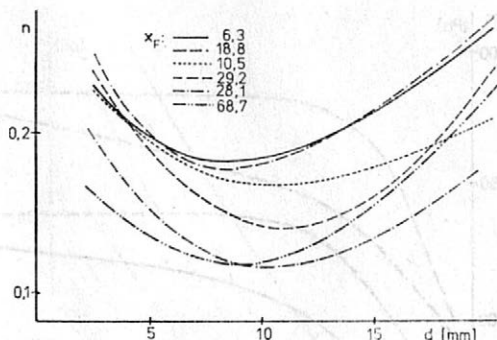


3. Závislost koeficientu konzistence K na stupni desintegrace d u hovězího a vepřového masa o různém obsahu tuku — Dependence of consistency coefficient K on the comminution degree d in beef and pork with different fat contents

V průběhu hodnot indexu toku n (obr. 4) lze vidět opačnou tendenci ve srovnání s koeficientem K (obr. 3), tj. s rostoucí velikostí částic hodnoty n klesají, dosáhnou minima v oblasti 8–10 mm a poté opět rostou. Nejsou zde patrné jednoznačné vlivy druhu masa (hovězí, resp. vepřové), ani obsahu tuku.

Výše uvedeně změny reologického chování desintegrovaného masa lze vysvětlit poškozením jednotlivých svalových struktur. Při jemnějším mletí (od velikosti částic zhruba 6 mm a níže) dochází s postupující desintegrací k poklesu meze toku shodně s údaji, které uveřejnili Tóth a Hamm (1968), týkajícími se jemně mletého masa. S pokračující desintegrací roste vaznost, tj. ubývá volné vody, snižuje se tak vazebná interakce mezi částicemi, což se společně se snižujícím mechanickým

4. Závislost indexu toku n na stupni desintegrace d u hovězího a vepřového masa o různém obsahu tuku — Dependence of the creeping index n on the comminution degree d in beef and pork with different fat contents



odporem proti pohybu pro zmenšující se částice projevuje ve snižování hodnot meze toku.

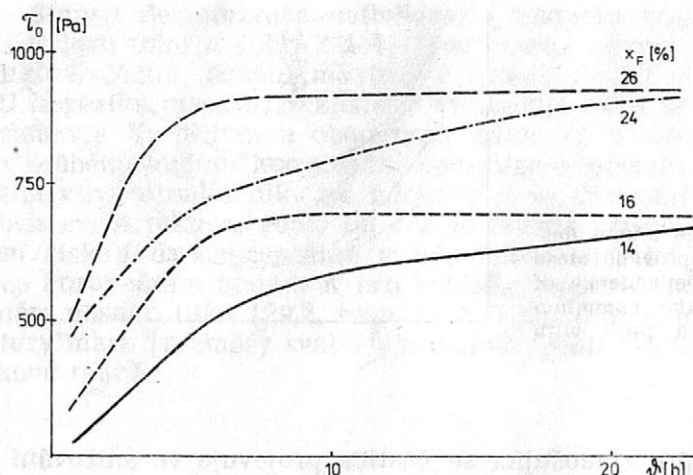
Při hrubším mletí, tj. při velikosti částic zhruba od 6 mm výše, se se zvětšující se velikostí částic (tj. se snižujícím se stupněm desintegrace) zhoršují podmínky pro botnění, klesá tedy vaznost, tj. zvyšuje se obsah volné vody.

Zároveň však zvětšující se velikost částic znamená, že částice si navzájem více brání v pohybu, což se projevuje zvýšením meze toku, vliv má i vytváření nebo porušení vazeb mezi strukturami částic masa, zejména vazby mezi bílkovinnými strukturami.

Vznik maxima a opětovný pokles hodnot meze toku je pak zřejmě vyvolán rostoucím významem poklesu vaznosti a naopak méně se projevuje vzájemné bránění si částic v pohybu. Ve stejné oblasti, kde měla mez toku maximum, se objevily i u dalších sledovaných veličin extrémy: u koeficientu konzistence K maximum a u indexu chování v toku n minimum. Obsah tuku ovlivňoval pouze absolutní hodnoty meze toku, na průběh uvedených závislostí a polohu extrémů neměl výrazný vliv.

O časově podmíněném chování desintegrovaneho předsoleného masa byla již zmínka v dříve publikované práci (Pípek et al., 1989). Při podrobnějším studiu změn deformační historie se potvrdilo, že mez toku u masa, které je ponecháno po namíchání v klidu, roste od okamžiku míchání, resp. mechanického namáhání, nejprve velmi prudce, tento nárůst se postupně zpomaluje a během 24 hodin je většinou dosaženo maximální hodnoty, která se dále nemění. Uvedená skutečnost má velký praktický význam pro případnou dopravu předsoleného masa pomocí potrubní či šnekové dopravy. Znamená to, že je na jedné straně žádoucí maso přečerpávat pokud možno ihned po namíchání, na druhé straně je třeba počítat se zvýšením meze toku, ke kterému dojde v zásobnících. Při vyprazdňování, k němuž dochází samozřejmě po době delší než je 24 hodin, tzn. v době, kdy maso již dosáhlo maximální hodnoty meze toku, je proto třeba počítat s tímto zvýšením a příslušně dimenzovat vyprazdňovací otvory.

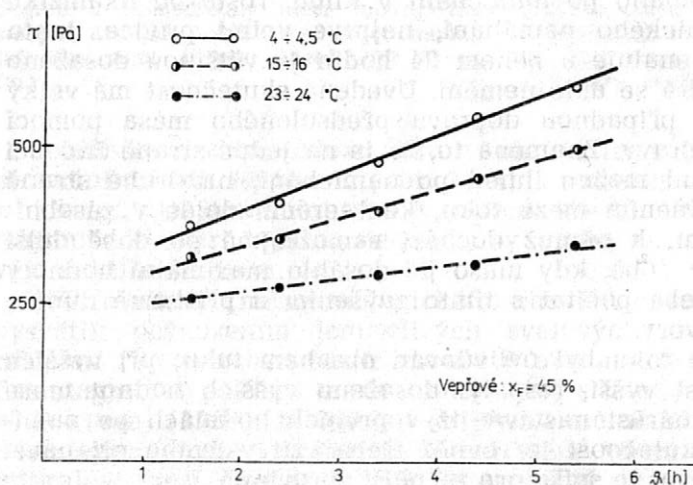
Průběh nárůstu meze toku byl ovlivňován obsahem tuku; při vyšších obsazích tuku je nárůst vyšší, resp. je dosaženo vyšších hodnot meze toku; přitom rozdílný nárůst nastává již v prvních hodinách po namíchání (obr. 5). Tuto skutečnost je rovněž třeba vzít v úvahu při návrzích zařízení a dimenzovat je spíše pro tučnější surovinu.



5. Časové změny meze toku τ_0 od okamžiku namíchání při různých obsazích tuku x_F (vepřové maso) — Time changes of the yield stress τ_0 from the moment of mixing at different fat contents x_F (pork)

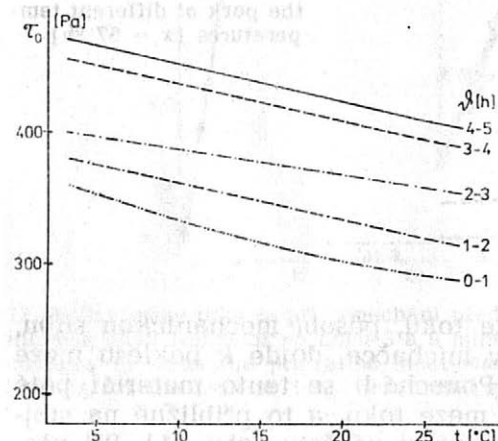
Počáteční nárůst meze toku byl dále ovlivňován teplotou (obr. 6). Je patrné, že při nižší teplotě je hodnota meze toku τ_0 vyšší a změny τ_0 jsou s časem výraznější. Přitom bylo ověřeno, že vliv teploty je výraznější u masa s vyšším obsahem tuku (obr. 7 a 8). Z toho je patrné, že změny reologického chování nařezaného masa s teplotou probíhají zejména v tukové fázi. Z obr. 7 a 8 je dále patrný pokles meze toku s rostoucí teplotou a tento pokles je charakterizován pro různé „stáří“ masa zhruba stejnou směrnicí pro hovězí maso (obr. 7), resp. přibližně stejnou konstantou v exponenciální závislosti poklesu hodnot τ_0 pro vepřové maso (obr. 8).

Podobně jako mez toku se od okamžiku namíchání měnila i vaznost, která byla sledována zjišťováním obsahu volné vody kapilárním volumetrem. Jak postupně rostla mez toku, rostla i vaznost, resp. klesal obsah volné vody (obr. 9). I v tomto případě bylo zjištěno, že obsah volné vody, resp. jeho pokles po namíchání je závislý na teplotě, tzn. že při vyšších teplotách byl obsah volné vody nižší, resp. poklesl na nižší hodnoty (obr. 10). Z obr. 10 lze také zjistit relativně velký odstup křivky

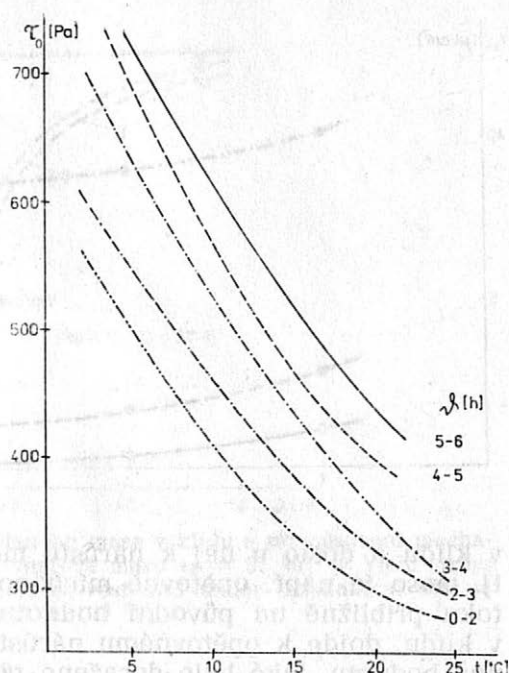


6. Vliv teploty t na časový průběh meze toku τ_0 předsoledného předřezaného vepřového masa ($x_F = 45\%$) po namíchání — The influence of temperature t on time changes of yield stress τ_0 of pre-salted pre-cut pork ($x_F = 45\%$) after mixing

the yield stress τ_0 in beef ($x_F = 13.6\%$) in different periods after mixing in beef ($x_F = 13.6\%$)



7. Vliv teploty t na mez toku τ_0 v různých obdobích po namíchání u hovězího masa ($x_F = 13,6\%$) — The effect of temperature t on the yield stress τ_0 in different periods after mixing in beef ($x_F = 13.6\%$)



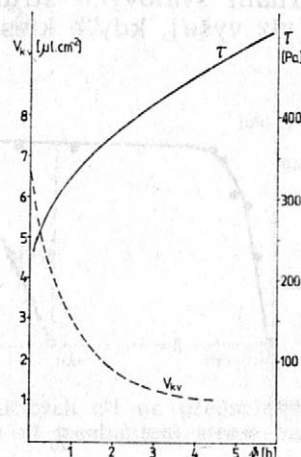
8. Vliv teploty t na mez toku τ_0 v různých časech po namíchání vzorků před-soleného vepřového masa ($x_F = 58,6\%$) — The effect of temperature t on the yield stress τ_0 in different periods after mixing the samples of pre-salted pork ($x_F = 58.6\%$)

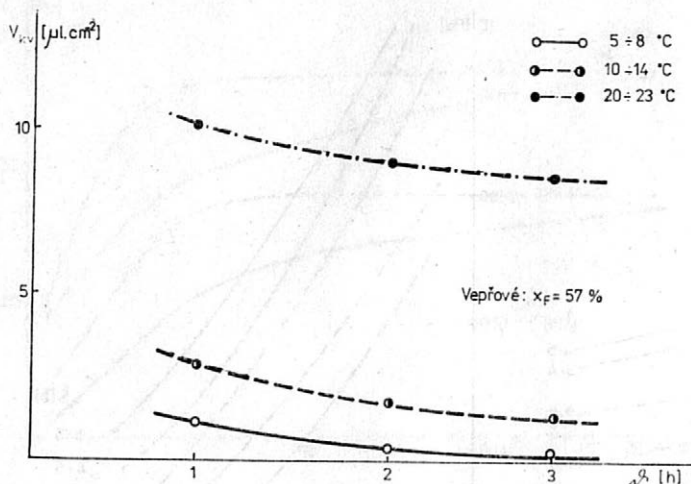
pro teploty 20–23 °C, který může být důsledkem toho, že tato měření jsou provedena při teplotách, při nichž dochází k měknutí tukové tkáně.

V souvislosti s nárůstem meze toku bylo rovněž sledováno, jak se mění mez toku v případě, že na systém masa působí mechanická síla. Bylo zjištěno, že pokud se na maso, které bylo po namíchání ponecháno

mechanická síla, při níž dochází k měknutí tukové tkáně, je třeba sledovat, jak se mění mez toku a obsah volné vody V_{kv} u hovězího masa ($x_F = 16,3\%$) — Time dependence of the yield stress τ_0 and free water content V_{kv} in beef ($x_F = 16.3\%$)

9. Časová závislost meze toku τ_0 a obsahu volné vody V_{kv} u hovězího masa ($x_F = 16,3\%$) — Time dependence of the yield stress τ_0 and free water content V_{kv} in beef ($x_F = 16.3\%$)

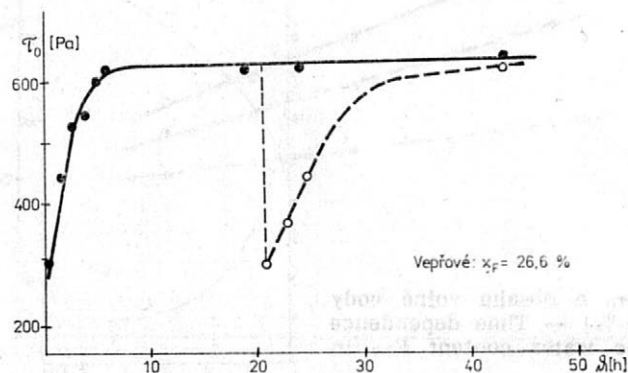




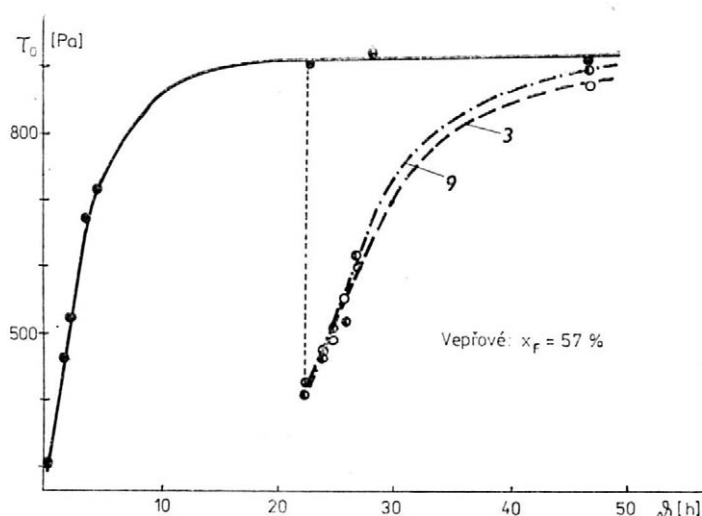
10. Vliv teploty t na pokles obsahu volné vody V_{kv} po nasolení vepřového masa při různých teplotách ($x_F = 57 \%$) — The effect of temperature t on the reduction of free water content V_{kv} after salting the pork at different temperatures ($x = 57 \%$)

v klidu a došlo u něj k nárůstu meze toku, působí mechanickou silou, tj. maso je např. opětovně mícháno v míchačce, dojde k poklesu meze toku přibližně na původní hodnotu. Ponechá-li se tento materiál poté v klidu, dojde k opětovnému nárůstu meze toku, a to přibližně na stejnou hodnotu, jaké bylo dosaženo při prvním nárůstu (obr. 11). Při přemíchávání dochází k porušení původně vytvořených vazeb. Lze rovněž předpokládat i vytlačení části volné vody, takže mez toku klesá a v dalším období se vazby mezi částicemi i vazba vody postupně obnovuje. Pokusně bylo zjištěno, že pro porušení těchto vazeb je postačující doba míchání tři minuty, přičemž její prodloužení (např. na devět minut) už nemá podstatný vliv na pokles meze toku (obr. 12). Rovněž nárůst meze toku během následujícího ponechání přemíchaného masa v klidu nebyl významně ovlivněn dobou míchání.

Při opakovaném přemíchávání materiálu došlo sice opět k poklesu meze toku, a to přibližně na původní hodnotu, při následujícím míchání však již nebylo dosaženo maximální hodnoty meze toku jako při prvním míchání (obr. 13). Vysvětlení zde lze hledat v porušení materiálu při opakovaných mechanických vlivech, při nichž nepochybně dochází k poškození svalových struktur, podobně jako při intenzivnější desintegraci (viz výše), kdy s klesající velikostí částic mez toku rovněž klesá.

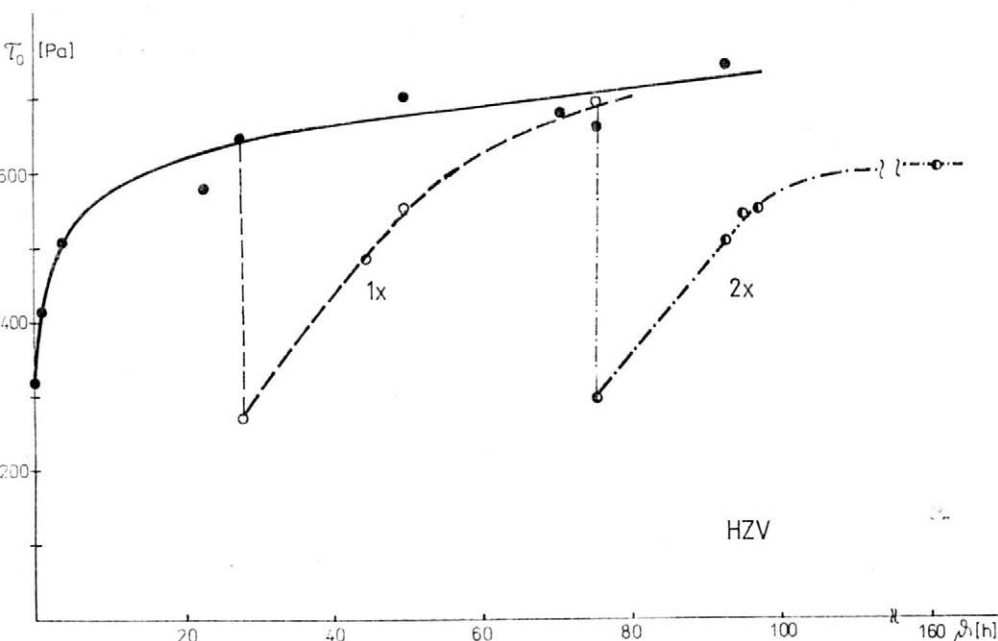


11. Změny meze toku při ponechání přesoleného masa v klidu a při působení mechanických vlivů (míchání po dobu 3 minut; vepřové maso $x_F = 26,6 \%$) — Yield stress changes when the pre-salted meat was left at rest and under mechanical effects (mixing for the time of 3 minutes; pork $x_F = 26.6 \%$)

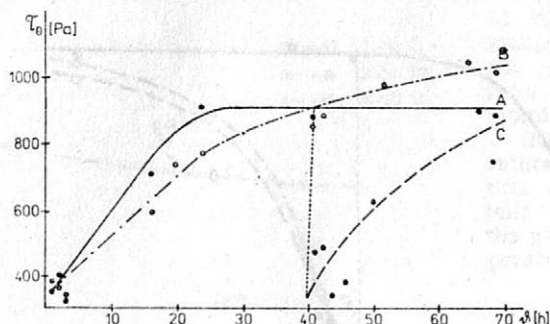


12. Změny meze toku τ_0 při ponechání předsoleného masa v klidu a při působení mechanických vlivů (míchání po dobu 3 a 9 minut, vepřové maso $x_F = 57\%$) — Yield stress changes τ_0 when the pre-salted meat was left at rest and under mechanical effects (mixing for the time of 3 and 9 minutes, pork $x_F = 57\%$)

Vedle vlivu mechanického působení formou míchání byl ověřen i vliv průchodu předsoleného masa ledvinovým čerpadlem, a to jednak ihned po namíchání a dále po 40 hodinách ponechání v klidu v zásobníku (obr. 14). I zde se ukázalo, že je-li materiál ponechán v klidu (po namí-



13. Změny meze toku τ_0 při opakovaném působení mechanických sil na předsolené hovězí maso — Yield stress changes τ_0 at repeated effects of mechanical stress on pre-salted beef



14. Vliv průchodu hovězího masa čerpadlem na změny meze toku τ_0 . A — maso po namíchání; B — maso, které bylo ihned po namíchání přečerpáno; C — maso přečerpáno po 40 hodinách od namíchání (po tu dobu ponecháno v zásobníku) — The effect of beef passage through the pump on the yield stress τ_0 changes A — meat after mixing; B — the meat which was overpumped after mixing; C — the meat overpumped 40 hours later after mixing (for that time having been left in a storage reservoir)

chání či po přečerpání), dochází k nárůstu meze toku tak, jak se postupně vytvářejí příčné vazby. Materiál, který byl po namíchání ihned přečerpán, měl nárůst meze toku pomalejší, bylo však dosaženo vyšších konečných hodnot. Byl-li materiál po 40 hodinách opětovně přečerpán (při vyprazdňování zásobníku), došlo k poklesu meze toku na původní hodnotu (podobně jako při míchání), a po ponechání materiálu v klidu mez toku opětovně vzrostla na původní hodnotu.

Z výše uvedených skutečností tedy vyplývá, že reologické chování masa je možné ovlivnit různým stupněm jeho desintegrace, dále pak působením mechanických sil i teplotou. Uvedené skutečnosti je tedy třeba vzít v úvahu při návrhu zařízení a nastavení jeho optimálního provozu.

Seznam symbolů

d	stupeň desintegrace (průměr otvoru desky)	[mm]
D	rychlost smykové deformace	[s ⁻¹]
K	koefficient konzistence	[Pa · s ⁿ]
n	index toku	[—]
t	teplota	[°C]
x_F	obsah tuku	[%]
V_{kv}	obsah volné vody	[μl · cm ⁻²]
ϑ	čas	[s [min, h]]
τ	tečné napětí	[Pa]
τ_0	mez toku	[Pa]
τ_{024}	hodnota τ_0 po 24 hodinách ponechání materiálu v klidu	[Pa]

Literatura

- BURGE, T. L. — ACTON, J. C.: Rheological properties of comminuted meat batters and the relationship to constituent interactions. J. Food Technol., 19, 1984, č. 3, s. 719—724.
- GORBATOV, A. V. — KOSOJ, V. D. — POLJAKOVA, L. K.: Vlijanije vremeni starenija i temperatury na sdvigovyje svojstva farša. Pišč. Technol., 1967, č. 5, s. 177.
- HAMM, R.: Kolloidchemie des Fleisches. 1. ed. Berlin, Hamburg, Paul Parey Verlag 1972, 275 s.

HAMM, R. — REDE, R.: Zur Rheologie des Fleisches VII. Fleischwirtschaft, 55, 1975, č. 1, s. 99—102.
 KIESSLING, I. — RAEUBER, H. J.: Struktur und strukturmekanische Eigenschaften von Brät frischer Rohwurst I. Fleisch, 35, 1981a, č. 11, s. 216—218.
 KIESSLING, I. — RAEUBER, H. J.: Struktur und strukturmekanische Eigenschaften von Brät frischer Rohwurst II. Fleisch, 35, 1981b, č. 12, s. 236—238.
 KOSOJ, V. D.: Izmenenije strukturno-mechaničeskich svojstv kolbasnogo farša v zavisimosti ot vlagosoděržanija, žirnosti i davlenija. Mjasnaja Ind. SSSR, 57, 1979, č. 4, s. 39—44.
 PIPEK, P. — SINEVIČ, V. — VOTAVOVÁ, L.: Reometrie hrubě desintegrovaného masa. Potravinářské Vědy, 7, 1989, č. 2, s. 103—112.
 REDE, R. — HAMM, R.: Zur Rheologie des Fleisches VI. Fleischwirtschaft, 53, 1973, č. 9, s. 1279—1285.
 TÓTH, L. — HAMM, R.: Zur Rheologie des Fleisches III. Fleischwirtschaft, 48, 1968, č. 12, s. 1651—1660.
 TÓTH, L. — HAMM, R.: Zur Rheologie des Fleisches IV. Fleischwirtschaft, 49, 1969, č. 5, s. 637—642.

Došlo dne 2. 7. 1990

ПИПЕК, П. — СИНЕВИЧ, В. (Химико-технологический институт, Прага): Изменение реологического поведения мяса в зависимости от степени дезинтеграции и от внешних условий. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 33—44.

Изучалось влияние степени дезинтеграции, температуры и содержания жира на реологическое поведение грубо дезинтегрированного мяса и на временные изменения реологических величин в покое и при воздействии механической силы. Мясо, предварительно нарезанное на режущем аппарате (диаметр отверстий доски 13 мм, если не указано иначе) гомогенизировалось на полосном смесителе с добавлением 2 % (массовые) соли и 10 % (массовые) воды. Реологическое поведение образцов изучалось при помощи ротационной реометрии. Влияние степени дезинтеграции проявилось максимумом предела текучести в случае диаметров режущей доски 6—8 мм. С момента смешения образцов получалось возрастание предела текучести, причем максимальное и одновременно конечное значение предела текучести получают в течение 24 часов. Воздействием механической силы (замешивание, качание) предел текучести понижается. В случае, если мясо оставлено в покое, то предел текучести опять возрастает и практически достигает первоначального значения. Повышающаяся температура понижает значение предела текучести (в пределах 0—28 °C), она влияет и на скорость нарастания предела текучести после замешивания. Все указанные зависимости находятся под значительным влиянием содержания жира. Подтвердили узкую связь реологических величин и содержания свободной воды (измеряемой капиллярным волнометром).

реология; дезинтегрированное мясо; температура; дезинтеграция; содержание жира; изменения времени; замешивание; качание

PIPEK, P. — SINEVIČ, V. (Institute of Chemical Technology, Praha): *Changes of rheological properties of meat in dependence on comminution degree and external conditions*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 33—44.

The effect of comminution degree, temperature and fat content on rheological properties of coarsely comminuted meat and time changes of rheological quantities were examined both at rest and in exposure to mechanical stress. Meat, pre-cut in a cutter (diameter of board holes — 13 mm, if not stated otherwise), was homogenized on belt-type mixer with addition of 2.5 % of salt weight and 10 % of water weight. Rheological properties of samples were observed by rotation rheometry. The effect of comminution degree was manifested by maximum yield stress at the hole diameter of the cutter board of 6—8 mm. From the moment of mixing the samples, the yield stress increased and reached its maximum final value in 24 hours. The action of mechanical stress [mixing, pumping] caused reduction of the yield stress; when the meat is then left at rest the yield stress will increase again and it will practically reach its previous value. Growing temperature decreases creeping limit value (within 0—25 °C), and also influences rate at which yield stress increases after

mixing. All the given dependences are significantly affected by fat content. A narrow relationship was proved between rheological values and free water content (measured by capillary volumeter).

rheology; comminuted meat; comminution; temperature; fat content; time changes; mixing; pumping

PIPEK, P. — SINEVIČ, V. (Chemisch-technologische Hochschule, Praha): *Veränderungen des rheologischen Verhalten des Fleisches in Abhängigkeit von dem Desintegrationsgrad und den Aussenbedingungen*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 33—44.

Es wurde der Einfluss des Desintegrationsgrads, der Temperatur und des Fettgehaltes auf das rheologische Verhalten des grobdesintegrierten Fleisches untersucht, sowie die zeitbedingte Veränderungen von rheologischen Grössen während Stehenlassen und während der Einwirkung der mechanischen Belastung. Das vorgewolfte Fleisch (Scheibenlochdurchmesser von 13 mm falls nicht anders angegeben) wurde in einem Mischer mit der Zugabe von 2,5 % Salz (NPS) und 10 % Wasser homogenisiert. Das Fließverhalten von Fleischproben wurde mit Hilfe von der Rotationsrheometrie untersucht. Der Einfluss des Desintegrationsgrades wurde durch ein Maximum der Fließgrenze beim Scheibenlochdiameter von 6 bis 8 mm charakterisiert. Die Fließgrenze nahm ab dem Zeitpunkt des Mischens zu und erreichte während 24 Stunden einen maximalen Endwert. Durch mechanische Belastung nimmt die Fließgrenze ab; während anschliessendem Stehenlassen steigt sie praktisch auf den ursprünglichen Wert. Mit steigender Temperatur (im Bereich von 0 bis 25 °C) nimmt die Fließgrenze ab, die Temperatur hat auch einen Einfluss auf den Anstieg der Fließgrenze nach dem Mischen. Alle obengenannten Abhängigkeiten werden bedeutend durch den Fettgehalt beeinflusst. Es wurde ein enger Zusammenhang von rheologischen Grössen und dem Gehalt an freiem Wasser (der mit dem Kapillarvolumeter gemessen wurde) bestätigt.

Rheologie; desintegriertes Fleisch; Temperatur; Desintegration; Fettgehalt; zeitbedingte Veränderungen; Mischen; Pumpen

Adresa autorů:

Doc. ing. Petr Pipek, CSc., ing. Václav Sinevič, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

M. Loučka, M. Vinklárková

LOUČKA, M. — VINKLÁRKOVÁ, M. [Vysoká škola chemicko-technologická, Praha]: *Optimalizace procesu kontinuální sterilace a pasterace*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 45—54.

Byl odvozen a na příkladu ilustrován algoritmus řízení kontinuální sterilace, přičemž kritériem optimality je dosažení požadovaného sterilizačního účinku a předepsané konečné teploty výrobku za předpokladu synchronizace s pracovním taktům předřazených operací. Algoritmus spočívá buď ve stanovení teploty sterilizační lázně (úloha I), nebo ve výpočtu rychlosti posunu pásu aplikací numerického řešení nelineární rovnice (úloha II). V závěru jsou diskutovány alternativy technické realizace automatického řízení kontinuální sterilace s využitím navrženého algoritmu.

kontinuální sterilace; algoritmus řízení; matematický model; teplota média; rychlost posunu pásu

Kontinuální pasterace a sterilace kyselých potravin v atmosférickém uspořádání má rozsáhlé uplatnění v konzervářenském průmyslu. Řízení této technologické operace je komplexní úlohou, která zahrnuje sestavení algoritmu řízení, výběr akčních a měřených veličin, identifikaci topné i chladicí soustavy, jakož i projekt osazení měřicími a regulačními prvky a prověření jejich funkce ve zkušebním provozu.

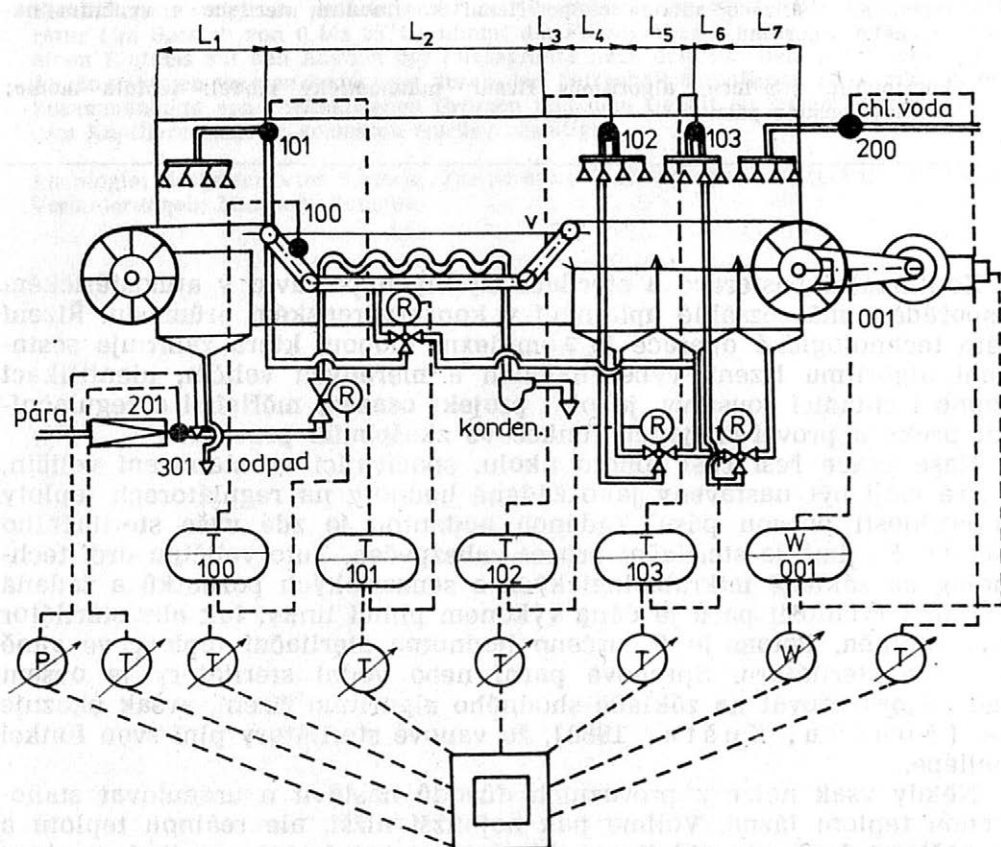
Naše práce řeší část tohoto úkolu, spočívající ve stanovení veličin, které mají být nastaveny jako žádané hodnoty na regulátorech teploty a rychlosti posunu pásu. Žádanou hodnotou je zde výše sterilizačního účinku F_s , jimž je sterilizační proces zabezpečen. Tuto veličinu určí technolog na základě mikrobiologických a senzorických poznatků a žádaná hodnota rychlosti pásu je dána výkonem plnicí linky, tak aby sterilátor byl zaplněn. Potom je F_s určeno hodnotou sterilizační teploty ve vaně vodního sterilátoru. Sprchové parní nebo vodní sterilátory je ovšem možné provozovat na základě shodného algoritmu řízení, avšak ukazuje se (Loučka, Kušta, 1988), že vanové sterilátory plní svou funkci nejlépe.

Někdy však nelze z provozních důvodů nastavit a uregulovat stanovenou teplotu lázně. Volíme pak nejbližší nižší, ale reálnou teplotu a vypočteme k ní odpovídající rychlost pásu, která sice nezajistí synchronizaci s pracovním taktům linky, avšak vyhoví požadavku dosažení F_s . Výpočet teploty sterilace ze zadané rychlosti posunu pásu budeme označovat jako úlohu a výpočet rychlosti posunu pásu na základě pevně stanovené teploty jako úlohu II.

Schéma a popis kontinuálního vanového sterilátoru

Na obr. 1 jsou zakresleny podstatné prvky konstrukce sterilátoru vyrobeného Vývojovými dílnami Slovlik Trenčín. Lze si tak učinit představu o strojním vybavení sterilátoru s úpravami, které navrhli Loučka, Kušta [1988]. Měřicí, regulační a akční členy jsou do schématu zakresleny pro demonstraci minimální varianty ASŘTP kontinuální sterilace. Jde o autonomní regulační obvody, které udržují okamžité hodnoty teplot (obvod 100, 101, 102, 103) a rychlosti posunu (obvod 001) ve stanovených mezích. Kromě toho jsou tyto veličiny indikovány ukazovacími přístroji a registrovány zapisovači. Dále pak jsou měřeny a zapisovány i teploty chladicí vody a topné páry, jakož i její tlak (obr. 1).

Pro úplnost uvedme, že teplosměnné médium je ve sprchových sekcích voda, vodní sterilizační lázeň je ohřívána topným parním hadem. Obsah sterilizační vany je promícháván recirkulačním čerpadlem.



1. Schéma kontinuálního vanového sterilátoru s vyznačením měřených a regulačních veličin — Diagramme of a vat-type continuous sterilizer, the measured and controlled characteristics are indicated

Teoretické základy odvození algoritmu

V našich dřívějších pracích [Loučka, Klein, 1983; Loučka et al., 1987] jsme dokázali platnost dynamického modelu sdílení tepla při sterilaci. Zopakujeme některé základní vztahy, z nichž naše odvození vychází.

Sterilační účinek je dán integrálem

$$\int_0^b 10 \frac{T_k(t) - T_r}{z} dt \quad [1]$$

$$y' + \alpha y = kax \quad [2]$$

kde: $y(t)$ — časový průběh odezvy na signál $x(t)$

obecně platí pro lineární soustavu

$$y(t) = \int_0^t h(t - \tau) \cdot x(\tau) \cdot d\tau \quad [3]$$

kde: $h(\tau)$ — charakteristika funkce plynoucí z rovnice [2] [Loučka et al., 1987].

Tvar vstupního signálu můžeme pokládat za lineární funkci času. Toto tvrzení je vlastně jediným zjednodušujícím předpokladem naznačeného postupu, jestliže je konstanta v rovnici [2] stanovena s dostatečnou přesností.

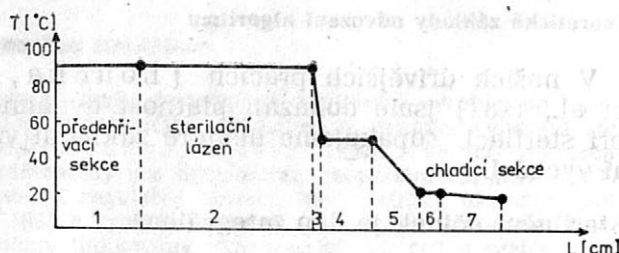
Konstantu α stanovíme experimentálně z průběhu teplot v konzervě a v jejím okolí [Loučka, Klein, 1983]. Lze ji určit i z odezvy na definovaný signál, např. na skokovou teplotní změnu. Podrobně se metodami stanovení konstant α zabývá ve své práci Kysela (1989). Zde se rovněž dokazuje, že nejlepší výsledky lze dosáhnout měření teplotních průběhů přímo v provozním zařízení a vyhodnocením s použitím kritéria

$$\frac{(F_{\text{exp}} - F_{\text{mod}}^{(\alpha)})}{F_{\text{exp}}} = \varphi(\alpha) \quad [4]$$

Z literárních údajů [Loučka, Klein, 1983] vyplývá, že relevantní teplotní profil v nejhůře prohřívaném místě konzervy je možné předpovědět jako dynamickou odezvu na teplotní změnu prostředí. Tyto změny lze považovat podle toho, co je známo o běžných typech sterilátorů, za lineární po všech úsecích [Loučka et al., 1987].

Je tedy také přípustné skládat postupně tyto odezvy na jednotlivé úseky lineárních změn a získat tak celý teplotní profil uvnitř konzervy jako jejich sjednocení. Tak je vytvořen tzv. teplotní polygon lázně (obr. 2), který může obsahovat i izolované body nespojitosti. Formulujeme úlohu o optimální sterilaci a dosadíme do známé formule pro sterilační úči-

2. Teplotní polygon sterilizačního média v kontinuálním sterilátoru — A temperature polygon of sterilization medium in a continuous sterilizer



nek vyjádřený rovnicí [1]. Získáme tak po triviální úpravě pro první úsek polygonu

$$F = F(\delta_1, \alpha_1, \Delta T_{01}, A_1) \quad [5]$$

kde jsou veličiny α_i známy pro každý úsek teplotního polygonu. Z vlastností sterilátoru a počáteční teploty stanovíme A_i a T_{01} . Zde $\delta_i = L_i/w$ znamená dobu zdržení v i -tém úseku kontinuálního sterilátoru, $\Delta T_{0i} = T_{Li} - T_{ki}$ je rozdíl teplot v i -tém uzlovém bodu polygonu. Jsou-li známy délky úseků L_i , lze vypočítat teploty T_{ki} na základě znalosti dynamiky a konstantní α_i . Mezi neznámé veličiny je třeba zařadit rychlost posunu pásu w a distribuci teploty T_{Li} ve všech úsecích, α_i nemusí být ve všech úsecích stejné, avšak předem stanovené. Pro dosažení potřebného sterilizačního účinku je třeba, aby platilo

$$\sum_{i=1}^7 F(\delta_i, \alpha_i, \Delta T_{0i}, A_i) = F_0 \quad [6]$$

Teplotu v oplachovací sekci zvolíme tak, aby splňovala požadavek dovoleného teplotního nárazu, chladičí sekce kromě tohoto požadavku musí vyhovovat bilanci směšovačů (obr. 1) a dále pak splňovat podmínku, aby konečná teplota $T_{k7} < 40^\circ\text{C}$. K tomu poskytuje užitečný nástroj rovnice [3], aplikovaná na teplotní polygon chladičí sekce. Rovnice [6] umožňuje převést tento technický problém na známou matematickou úlohu numerického řešení nelineární rovnice

$$\Phi(w, T_{12}) = 0 \quad [7]$$

Nyní můžeme úlohu I formulovat tak, že zvolíme $w = w_0$ a máme rovnici o jedné neznámé

$$\Phi(w_0, T_{12}) = 0 \quad [8]$$

Obdobně úloha II vznikne dosazením $T_{12} = T_{120}$, takže

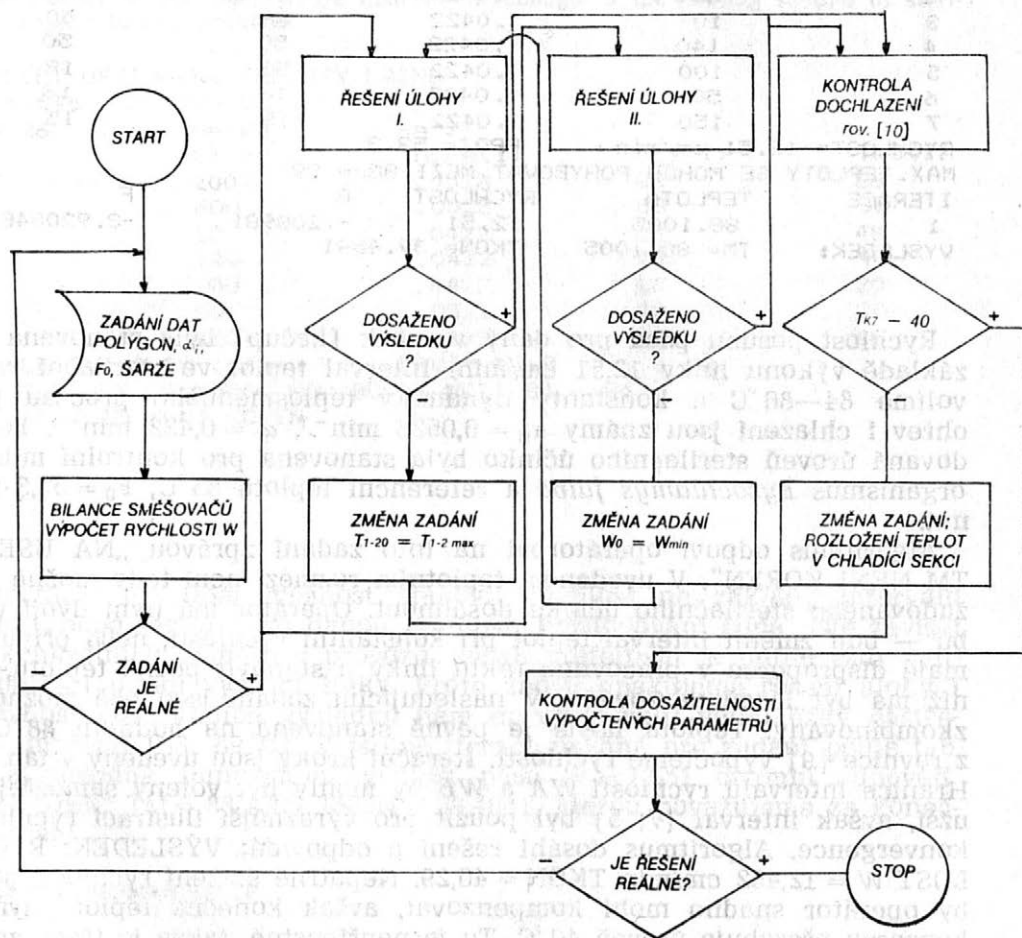
$$\Phi(w, T_{120}) = 0 \quad [9]$$

V obou případech z rovnice [3] vyplývá (Loučka et al., 1987)

$$T_{k7} - T_{12} = \alpha e^{\alpha \tau} \int_0^{\tau} e^{-\alpha t} \cdot x(t) dt \quad [10]$$

kde $\tau = \sum_{i=3}^7 \theta_i$ a $x(t)$ značí teplotní úseky polygonu v chladicí sekci, takže vzhledem k předpokládané nespojitosti integrandu je třeba integrál v rovnici [10] brát ve smyslu Lebesgueovy definice.

Algoritmus komplexního řešení úlohy řízení je ilustrován na obr. 3.



3. Stručný vývojový diagram algoritmu off-line řízení kontinuálního sterilátoru — Concise flow chart of the off-line control algorithm of continuous sterilizer

Příklad výpočtu

Prvotní zadání úlohy je uvedeno v tab. I, která obsahuje délky úseků $[L(i)]$ k nim příslušné počáteční (TLI) a konečné (TLO) teploty sterilizačního média.

I. Zadání dat pro úlohu I. Distribuce teplot lázně a požadovaná rychlost posunu pásu
— Formulation of data for problem No. I. The temperature distribution and velocity of conveyer belt

VÝPOČET OPTIMÁLNÍ TEPLoty LAZNE

Z= 6.546	TR= 85			
DO= 26	TO= 62	K= 7		
I	L(I)	ALFA(I)	TLI(I)	TLO(I)
1	200	.0528	88	88
2	600	.0528	88	88
3	10	.0422	88	50
4	140	.0422	50	50
5	100	.0422	50	18
6	50	.0422	18	18
7	150	.0422	18	15
RYCHLOST= 12.51 cm/min		FPOZ= 53.3		
MAX. TEPLoty SE MOHOU POHYBOVAT MEZI 88 - 89				
ITERACE	TEPLOTA	RYCHLOST	G	F
1	88.1005	12.51	-.208981	-3.92084E-03
VYSLEDEK:	TM= 88.1005	TKON= 39.4841		

Rychlost posunu pásu pro daný výrobek (kečup) byla stanovena na základě výkonu linky 12,51 cm/min. Interval teplot ve sterilizační vaně volíme 84–86 °C a konstanty dynamiky teplosměnného procesu pro ohřev i chlazení jsou známy $\alpha_H = 0,0528 \text{ min}^{-1}$, $\alpha_c = 0,422 \text{ min}^{-1}$. Požadovaná úroveň sterilizačního účinku byla stanovena pro kontrolní mikroorganismus *Bysochlamys fulva* a referenční teplotu 85 °C; $F_0 = 53,3$ minut.

Algoritmus odpoví operátorovi na toto zadání zprávou „NA USEKU TM NENI KOREN“. V uvedeném teplotním rozmezí není tedy možné požadovaného sterilizačního účinku dosáhnout. Operátor má nyní dvojí volbu — buď změnit interval teplot při konstantní rychlosti, nebo připustit malé disproporce v pracovním taktu linky a stanovit pevně teplotu, na niž má být lázeň udržována. V následujícím zadání jsou obě možnosti zkombinovány. Teplota lázně je pevně stanovena na hodnotu 88 °C a z rovnice [9] vypočteme rychlosti. Iterační kroky jsou uvedeny v tab. II. Hranice intervalů rychlostí WA a WB by mohly být voleny samozřejmě užší, avšak interval (7;15) byl použit pro výraznější ilustraci rychlosti konvergence. Algoritmus dosáhl řešení a odpovídá: VÝSLEDEK: RYCHLOST $W = 12,452 \text{ cm/min}$ TKON = 40,29. Nepatrné snížení rychlosti pásu by operátor snadno mohl kompenzovat, avšak konečná teplota uvnitř konzervy přesahuje úroveň 40 °C. To je nepřijatelné, takže je třeba změnit zadání tak, že budou sníženy teploty v chladicí sekci. Z bilance (která není součástí algoritmu) směšovačů v chladicí sekci vyplyne maximálně přípustná varianta snížení teplot podle tab. III.

II. Iterační výpočet úlohy II — Iteration steps for calculation of velocity of conveyer belt. Problem No. II

VYPOCET OPTIMALNI RYCHLOSTI Z INTERVALU:

WA= 7 WB= 15 FPOZ= 53.3

ITERACE	TEPLOTA	RYCHLOST	G	FI
1	88	13.8205	-13.5347	-.253934
2	88	13.183	-8.77888	-.164707
3	88	12.7955	-4.9453	-.0927825
4	88	12.5851	-2.72428	-.0511122
5	88	12.4715	-.469913	-8.81639E-03
6	88	12.452	-.270527	-5.07555E-03

VYSLEDEK: RYCHLOST W= 12.452cm/min TKON= 40.2892

III. Změna zadání distribuce teplot v chladičí sekci sterilátoru. Výsledek získán jedinou iterací — The temperature distribution change in the cooling section of sterilizer. Results in first iteration

VYPOCET OPTIMALNI TEPLoty LAZNE

Z= 6.546 TR= 85

DO= 26 TO= 62

K= 7

I	L(I)	ALFA(I)	TLI(I)	TLO(I)
1	200	.0528	88	88
2	600	.0528	88	88
3	10	.0422	88	48
4	140	.0422	48	48
5	100	.0422	48	20
6	50	.0422	20	20
7	150	.0422	20	18

RYCHLOST= 12.51 cm/min FPOZ= 53.3

MAX. TEPLoty SE MOHOU POHYBOVAT MEZI 84 - 86

NA USEKU TM NENI KOREN

Operátor má opět možnost stanovit rychlost na základě intervalu teploty nebo teplotu pro danou rychlost. Rozhodování bude jistě záviset od konkrétních poměrů v provozu, avšak preferovat je nutné vždy synchronizaci prvků výrobní linky. Proto znovu opakujeme řešení úlohy I a znalost dosavadních výsledků nám dovoluje volit velmi úzký nástřelový interval [88; 89 °C]. V jediné iteraci získané pro zadání podle tab. III a původně stanovenou rychlost pásu $W = 12,51$ cm/min odpověď: VÝSLEDEK: TM = 88,1005 TKON = 39,4841, kterou považujeme za konečné řešení.

Technická realizace ASRTP

Koncepce osazení kontinuálního sterilátoru měřicí a regulační technikou může být různá. O volbě úrovně regulace rozhodují poměry ekonomické, jejichž posouzení je mimo rámec této práce.

Řízení je možné realizovat v zásadě těmito stupni řídicí techniky:

1. autonomní regulátory,
2. hierarchickým uspořádáním — číslicový vícekanálový regulátor,
3. přímé spojení s počítačem.

Autonomní regulátory odpovídají zhruba schématu na obr. 1. Potřebují však zvláštní obsluhu a údržbu, je třeba použít několik prvků, jejichž cena roste s počtem jednotek a je třeba je podle výsledků výpočtů nastavovat.

Tak tomu není v případě ad 3. Počítač je přímo spojen s měřicími a akčními členy a kromě výpočtu rychlosti pásu a teplot lázně zároveň tyto veličiny nastavuje a udržuje na požadované úrovni. Navíc má počítač možnost přechodu na různé (havarijní) režimy a zbývá mu kapacita i pro řízení dalších operací. Jeho výpadek však znamená pro provoz katastrofu, na rozdíl od autonomního regulačního systému podle obr. 1, který může operovat i při poruše centra.

Toto dilema odstraňuje hierarchické uspořádání číslicového systému, v němž vystupuje centrální regulátor-počítač napojený na číslicový regulátor, umožňující jak autonomní, tak počítači podřízený zásah do procesu. Takové uspořádání dovoluje i postupné budování plně automatizované výrobní linky.

ZÁVĚR

Byl vypracován racionální algoritmus řízení procesu kontinuální sterilace výrobků ve skleněných nebo plechových obalech. Program v jazyce BASIC dovoluje řešení dvou typů úloh, které představují podstatnou část rozhodování technologa v této oblasti.

Teoreticky se vychází z matematického modelu odvozeného a verifikovaného dříve [Loučka, Klein, 1983; Loučka et al., 1987]. Podstatou je řešení rovnice [8] a [9], které určují optimum provozu zařízení.

Příklad výpočtu ukazuje postup, jak je možné dosáhnout řešení, které splňuje veškeré technologické požadavky, jakož i energetické podmínky závodu. Z uvedeného vyplývají i alternativy technické realizace řídicího algoritmu, které jsou zhodnoceny a doporučena koncepce hierarchického řízení digitálním regulátorem.

Seznam symbolů

A	— směrnice úseku teplotního polygonu	$[^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}]$
h	— charakteristická funkce v konvolučním integrálu	$[-]$
F	— sterilizační účinek	$[\text{min}]$
T	— teplota	$[^{\circ}\text{C}]$
L	— délka úseku sterilátoru	$[\text{cm}]$
x	— vstupní signál	$[-]$
y	— výstupní signál	$[-]$
z	— směrnice letalitní čáry	$[^{\circ}\text{C}]$
w	— rychlost posunu pásu	$[\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}]$
α	— dynamická konstanta konzervy	$[\text{min}^{-1}]$
θ	— časový úsek teplotního polygonu	$[\text{min}]$

Index:

mod	— hodnota vypočtená z matematického modelu
exp	— hodnota stanovená experimentálně
L	— lázeň
k	— konzerva

Literatura

LOUČKA, M. — KLEIN, S.: Matematický model dynamiky ohřevu a chlazení potravin konzervovaných sterilací. *Potravinářské Vědy*, 1, 1983, č. 1, s. 43—52.

LOUČKA, M. — CAUDROVÁ, J. — KYSELA, J. — HRDLÍČKA, J.: Výpočet sterilačního účinku v konzervě na základě teploty v lázni. *Potravinářské Vědy*, 5, 1987, č. 1, s. 41 až 54.

LOUČKA, M. — KUŠTA, J.: Rozbor funkce kontinuálních atmosférických sterilátorů pracujících v ČSSR a možnosti řízení procesu. In: Sbor. Konzervářské dny 1988. Brno 1988, s. 45—56.

KYSELA, J.: Studium variability termosterilačního procesu, možnosti jeho modelování a prognózy. [Kandidátská disertace.] Praha 1989 — Vysoká škola chem.-technologická.

Došlo dne 15. 3. 1990

ЛОУЧКА, М. — ВИНКЛАРКОВА, М. (Химико-технологический институт, Прага): Оптимизация процесса проточной стерилизации и пастеризации. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 45—54.

В работе формулирован алгоритм управления непрерывной стерилизации и его аппликация показана на практическом примере. Критерием оптимальности управления является достижение требуемого стерилизационного эффекта и предписанной конечной температуры продукта, исходя из предположения синхронизации с другими аппаратами производственной линии. Алгоритм состоит или в определении температуры стерилизационной среды (задача I.) или в расчете скорости движения конвейера (задача II.) исходя из численного решения нелинейного уравнения. В заключении работы разобраны возможности технической реализации автоматического управления непрерывной стерилизацией, позволяющего использовать предложенный алгоритм.

непрерывная стерилизация; алгоритм управления; математическая модель; температура среда; скорость движения конвейера

LOUČKA, M. — VINKLÁRKOVÁ, M. (Institute of Chemical Technology, Praha): *Optimization of the processes of continuous sterilization and pasteurization*. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 45—54.

The control algorithm of continual sterilization plant has been derived. The reaching of requested sterilization effect and regular end temperature of product is represented as criterion of optimality with respect of synchronization with other elements of production line. The algorithm is based on either the determination of sterilization medium temperature (problem No I) or calculation of the velocity of conveyor belt. For this aim two different nonlinear equations are solved numerically. The possibilities of technical realization of automatically controlled continual sterilizer for application of algorithm are presented.

continual sterilization; control algorithm; mathematical model; temperature of medium; velocity of conveyor belt

LOUČKA, M. — VINKLÁRKOVÁ, M. (Chemisch-technologische Hochschule, Praha): *Optimierung des Prozesses der kontinuierlichen Sterilisation und Pasteurisation*. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991 (1): 45—54.

Es wurde der Führungsalgorithmus der kontinuierlichen Sterilisation abgeleitet und an einem Beispiel illustriert, wobei das Optimalitätskriterium die Erreichung der erforderlichen Sterilisationswirkung und vorgeschriebenen Endtemperatur der Produkts unter Voraussetzung einer Synchronisierung mit dem Arbeitstakt vorhergehender Operationen darstellt. Der Algorithmus beruht entweder auf der Temperaturfestlegung des Sterilisierungsbades (Aufgabe I), oder auf der Berechnung der Geschwindigkeit der Bandver-

schiebung durch Applikation der numerischen Lösung einer unlinearen Gleichung (Aufgabe II). Abschließend werden Alternativen der technischen Realisierung der automatischen Führung der kontinuierlichen Sterilisierung mit Ausnutzung des vorgeschlagenen Algorithmus erörtert.

Kontinuierliche Sterilisation; Führungsalgorithmus; mathematisches Modell; Mediumtemperatur; Geschwindigkeit der Bandverschiebung

Adresa autorů:

Ing. Miloslav Loučka, CSc., ing. M. Vinklárková, Vysoká škola chemicko-technická, Technická 5, 166 28 Praha 6

TESTOVÁNÍ TOXINOGENITY KMENŮ *PENICILLIUM CAMEMBERTI*: STANOVENÍ CYKLOPIAZONOVÉ KYSELINY

V. Ostrý, J. Ruprich, L. Knesel, M. Polster

OSTRÝ, V. — RUPRICH, J. — KNESEL, L. — POLSTER, M. (Centrum hygieny potravinových řetězců, IHE Brno; KHES Brno): *Testování toxigenity kmenů Penicillium camemberti: stanovení cyklopiazonové kyseliny*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 55—63.

Sbírkové kmeny *Penicillium camemberti* č. 302—1049 jsme testovali na produkci cyklopiazonové kyseliny (CPK) metodou chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Všechny 20 testovaných kmenů produkovalo mykotoxin CPK na sladidlovém agaru se sójovým peptonem (při teplotě 25 °C, po dobu 21 dní). Uvedená živná půda je tedy vhodnou screeningovou půdou pro testování toxigenity kmenů *Penicillium camemberti* z hlediska produkce CPK. Na tekuté půdě podle Dornera poskytlo za stejných podmínek pět kmenů (č. 1002, 1046, 1047, 1048, 1049) negativní výsledek, avšak některé kmeny měly produkci CPK dokonce vyšší než na uvedené agarové půdě.

mykotoxiny; cyklopiazonová kyselina; kulturní mykoflóra; *Penicillium camemberti*; toxigenita; TLC; HPLC

Kmeny kulturní mykoflóry mají v mlékárenském průmyslu mimořádný význam především z technologického hlediska. Zvláštní postavení mezi sýrařskými kulturami mají kmeny *Penicillium camemberti* a *Penicillium caseicolum*, které kromě bakteriálních kultur zajišťují svoji lipolytickou a proteolytickou činností správný průběh zrání sýrů camembertského typu. Působením produkovaných enzymů přispívají ke vzniku požadovaných chuťových a aromatických látek, charakteristických pro tento druh sýra.

Vedle uvedených technologických vlastností je potřebné hodnotit kmeny *Penicillium camemberti* také z hygienicko-toxikologického hlediska.

Při dlouhodobých krmných pokusech s myceliem kmene *Penicillium camemberti* var. *candidum* III.C3 zjistil Gibel [1971] tvorbu sarkomů, adenomů a karcinomů u testovaných krys kmene Wistar. Někteří autoři však nezjistili podobné toxické nebo karcinogenní vlivy po krmění spor a mycelia [Lafont et al., 1976; Polster, 1976 — osobní sdělení; Frank et al., 1975, 1977; Schoch et al., 1984] nebo po testování extraktů z mycelia na tkáňových kulturách a embryích [Lafont et al., 1976; Krusch et al., 1977].

Od začátku 70. let se u kmenů *Penicillium camemberti* používaných při výrobě sýrů sleduje produkce různých mykotoxinů [Kiermeier, Groll, 1970; Mintzlauff Machnik, 1973; Engel, Milczewski, 1977; Kiermeier, 1977]. V roce 1974 Orth a Frank [cit. — Reiss, 1981] testovali kmeny *Penicillium camemberti* na produkci aflatoxinů, PR-toxinu, patulinu, sterigmatocystinu a cyklopiazonové kyseliny (CPK). U testovaných kmenů nezjistili produkci žádného z uvedených mykotoxinů. Still et al. [1978] však zjistili, že kmeny *Penicillium camemberti* cyklopiazonovou

kyselinu produkují. Cyklopiazonová kyselina (CPK) je tetramická indolová kyselina a patří ke středně toxickým mykotoxinům. Z hlediska toxicity se CPK může manifestovat ve větším množství orgánů a zdá se podle dosavadních toxikologických studií, že CPK působí jako enteronefrotoxin u drůbeže, prasat a psů a hepatotoxin u krys.

Uvedení autoři zjistili produkci CPK u většiny testovaných kmenů *Penicillium camemberti* s maximem 1,5 mg CPK na 20 ml půdy v Petriho misce. Le Bars (1979a, b), Leistner, Eckard (1979) a Schoch et al. (1983, 1984) zjistili produkci CPK dokonce u všech kmenů poměrně početných sérií (15–69), přičemž se produkce pohybovala v rozmezí 0,5–2,0 mg CPK na 1 kg živné půdy (Le Bars, 1979a) a 0,035 až 4,0 mg na 500 ml živné půdy (Schoch et al., 1983, 1984). Všichni tito autoři sledovali produkci CPK při teplotě 25 °C, avšak i kultivace při 4 °C po dobu 33 dnů vedla k produkci CPK (Le Bars, 1979b). Také čeští autoři (Šimůnek, Polster, 1985; Veselý et al., 1985; Lohnický, Šimůnek, 1987; Ostrý, Polster, 1987; Mrva, 1989) zjistili produkci CPK u všech testovaných kmenů *Penicillium camemberti* včetně těch, které se používají v technologii sýru Hermelín. Lajzová (1987) zjistila podstatně vyšší produkci CPK na žemli (1,6–16 mg CPK na kg živné půdy) než v kapalně půdě (0–15 mg). Vliv různých půd, tj. sladidového agaru, žemle a ječných krup, na produkci CPK sledovala Šimová (1988), která zjistila, že CPK byla produkována ve všech případech.

V zahraničí řeší otázku produkce CPK u kmenů *Penicillium camemberti* používaných v mlékárenském průmyslu výběrem netoxinogenních kmenů, které CPK údajně neprodukují. Tyto kmeny si však současně zachovávají vhodné technologické vlastnosti.

Kmeny, které jsou používány k přípravě expedičních plísňových kultur nebo sbírkových kmenů, jsou originální francouzské kultury, kultury ze SRN a Dánska, popř. kmeny izolované z originálních francouzských sýrů Camembert (Teplý, 1984). Samson et al. (1977) uvádějí ve své práci o taxonomii druhů rodu *Penicillium* pro produkční kmeny pro sýry typu camembert pouze jeden druh, a to *Penicillium camemberti*. Do tohoto druhu jsou zahrnuty i kmeny, označované dříve jako *Penicillium caseicolum*, *Penicillium album*, *Penicillium albidum*, *Penicillium rogeri*, *Penicillium aromaticus*, *Penicillium epsteinii*. V katalogu sbírky čistých mlékařských kultur (1986) je uváděn druh *Penicillium camemberti*, ale nachází se zde i některé kmeny označené jako *Penicillium camemberti* var. *rogeri* (syn. *Penicillium caseicolum*). Liší se od sebe proteolytickými a lipolytickými vlastnostmi a makrohabitem. Sýry vyrobené s použitím kmenů uváděných jako *Penicillium caseicolum* mají jemnější strukturu a nápadnější vůni než sýry vyrobené za použití *Penicillium camemberti*. Proto je vhodné vlastnosti choub využívat ve směsi, která může tvořit expediční kulturu (Teplý, 1984).

Nové poznatky (Pitt et al., 1986; Polonelli et al., 1987) ukazují, že kmeny *Penicillium camemberti* reprezentují vlastně domestikované kmeny *Penicillium commune*, od nichž se mohou lišit produkcí některých farmakologicky a fyziologicky účinných metabolitů (regulovasin A, kyselina cyklopaldová, kyselina cyklopolová, palitanin aj.), které se u startovacích kmenů *Penicillium camemberti* nemají a nesmí tvořit.

Cílem práce bylo ověřit vhodnost použití sladidového agaru se sójovým peptonem jako živné půdy k sledování toxinogenity kmenů *Penicillium camemberti* stanovením cyklopiazonové kyseliny metodami TLC a HPLC.

MATERIÁL A METODY

Použité testované kmeny

Kmeny *Penicillium camemberti* (č. 302–1049) byly získány od dr. L. Pokorné ze Sbírký čistých mlékařských kultur v Praze (byly expedovány na šikmém sladidovém agaru).

Příprava standardu cyklopiazonové kyseliny (CPK)

Čistý mykotoxin byl připraven postupem, který popsali Ostrý, Polster (1989). Spektrální kvalita a kvantita byla kontrolována UV-VIS spektrografií (Specord M-40 a Hewlett Packard HP 5988 A). Hmotové spektrum CPK stanovené v systému přímého vstupu (DIP) na hmotovém spektrometru HP 5988 A je znázorněno na obr. 1.

Výšetřování kmenů *Penicillium camemberti* na produkci cyklopiazonové kyseliny (CPK)

Kultivační půdy

- a) Sladinový agar se sójovým peptonem
(30 g sledovaného extraktu, 3 g sójového peptonu, 15 g agaru, doplnit na 1 l destilovanou vodou), Sterilizace (120 °C, 20 minut) a rozlítí (po 16 ml půdy) na skleněné Petriho misky (Ø 9 cm).
- b) Tekutá půda podle Dornera
(10 g sójového peptonu, 20 g kvasničního autolyzátu, 40 g glukosy a 100 g sacharosy, doplnit na 1 l destilovanou vodou). Sterilizace (v Kochově hrnci 3krát 1 hodinu) a rozlítí (po 50 ml) do Erlemayerových baněk (250 ml).

Očkování

Sterilní kličkou nebo preparační jehlou přeneseme na živnou půdu spory a kousek mycelia kmenů *Penicillium camemberti*.

Kultivace

Byla prováděna při teplotě 25 °C po dobu 21 dní.

Příprava extraktu z kmenů *Penicillium camemberti* kultivovaných na sladinovém agaru se sójovým peptonem

Petriho misky s porostem *Penicillium camemberti* byly zality malým množstvím chloroformu. Obsah misky byl pak přenesen do třetí misky a rozetřen s bezvodým síranem sodným do sytké konzistence. K vzorku bylo přidáno 2 ml HCl ($c = 6$ mol/l) a 100 ml chloroformu a vzorek byl extrahován 10 minut. Filtrací vzorku byl získán hrubý chloroformový extrakt.

Reextrační čistící postup:

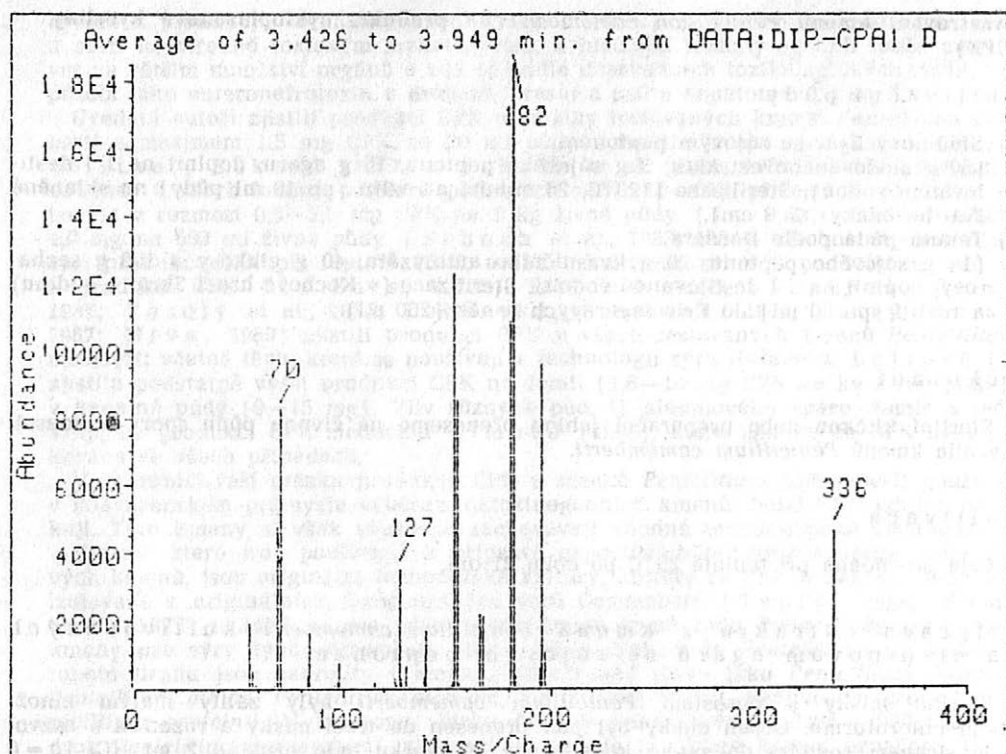
Získaný extrakt byl extrahován 150 ml NaHCO_3 ($c = 1$ mol/l) po dobu 10 minut. Zásaditá fáze o pH = 8–9 oddělena od chloroformové fáze v dělicí nálevce, okyselená HCl ($c = 6$ mol/l) na pH = 2 a extrahována 100 ml chloroformu pět minut. Chloroformový extrakt byl pak odvodněn bezvodým síranem sodným a odpařen při teplotě 60 °C do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 500 μl chloroformu u metody TLC a v 500 μl methanolu u metody HPLC.

Příprava extraktů z kmenů *Penicillium camemberti* kultivovaných na kapalně půdě podle Dornera

K vzorku bylo přidáno 2 ml HCl ($c = 6$ mol/l) a 100 ml chloroformu. Vzorek byl extrahován 10 minut. Filtrací a dělením v dělicí nálevce bylo odděleno mycelium, chloroformovaný extrakt 1 a živná půda. Mycelium bylo po okapání vysušeno do konstatování hmotnosti a zváženo. Po zvlhčení chloroformem bylo utřeno s bezvodým síranem sodným do sytké konzistence. Vzorek byl po přidání 2 ml HCl ($c = 6$ mol/l) a 100 ml chloroformu extrahován 10 minut. V dělicí nálevce byl oddělen chloroformový extrakt 2. Oba dva chloroformové extrakty (1 a 2) byly zahuštěny při 60 °C na objem přibližně 100 ml. Získaný chloroformový extrakt byl zpracován v procesu reextračního čistícího postupu obdobně jako u kmenů *Penicillium camemberti* vyrostlých na sladinovém agaru se sójovým peptonem.

Stanovení cyklopiazonové kyseliny (CPK) metodou chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografické desky SILUFOL byly omyty v methanolu, impregnovány 8% kyselinou šťavelovou v methanolu a aktivovány při teplotě 80 °C po dobu 40 minut. Na desku bylo nanášeno 10–80 μl extraktu vzorku a CPK (25–300 ng na skvrnu). Vyvíjecí směs byla toluen:octan ethylnatý:kyselina mravenčí (5:4:1). Skvrny byly detekovány postříkáním 1% roztokem p-dimethylaminobenzaldehydu (ve směsi 75 ml ethanolu



Average of 3.426 to 3.949 min. from DATA:DIP-CPA1.D

a 25 ml konc. HCl]. Stanovení CPK bylo semikvantitativní, a to srovnáním barevné intenzity vzestupné řady koncentrací standardu CPK. Mez citlivosti byla asi 25 ng na skvrnu.

Stanovení cyklopiazonové kyseliny (CPK) metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC)

Ke stanovení byl použit kapalinový chromatograf Hewlett Packard HP 1090 L s integrátořem HP 3393 A, vybavený UV detektorem.

Kolony: HP 3 NH₂, 3 μ m, 60×4,6 mm (Hewlett Packard)

Mobilní fáze: methanol + octan amonný ($c = 0,2$ mol/l) (1:1)

Průtok: 1,8 ml/min. Teplota: 25 °C

Linearita odezvy UV detektoru při 280 nm: 0,1 μ g–1 mg/ml

Praktická citlivost stanovení: 3 μ g CPK/kg vzorku.

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
55.00	1922	97.00	82	139.00	299	167.00	2073
57.00	488	98.00	728	140.00	1687	181.00	10839
58.00	39	115.00	128	152.00	46	182.00	18510
67.00	50	125.00	250	153.00	167	183.00	315
69.00	4735	126.00	42	154.00	12261	195.00	584
70.00	8235	127.00	3531	155.00	8510	196.00	9561
83.00	319	128.00	230	156.00	79	197.00	1019
84.00	1614	130.00	624	166.00	2162	336.00	4666
96.00	32						

1. Hmotové spektrum kyseliny cyklopiazonové stanovené v systému přímého vstupu (DIP) na hmotovém spektrometru Hewlett-Packard HP 5988 A — The mass spectrum of cyclopiazonic acid determined in the DIP system on a Hewlett-Packard HP 5988 A mass spectrometer

VÝSLEDKY A DISKUSE

Všech 20 testovaných sbírkových kmenů *Penicillium camemberti* (č. 302—1049) produkovalo na sladinném agaru se sójovým peptonem cyklopiazonovou kyselinu (CPK). Testovány byly také kmeny 1046, 1047, 1048, 1049, které nejsou zatím zařazeny do katalogu sbírky čistých mlékařských kultur Laktoflora. Výsledky stanovení CPK jsou uvedeny v tabulce I.

Výsledky produkce CPK u kmenů *Penicillium camemberti* na tekuté půdě podle Dornera jsou uvedeny v tab. II. Většina kmenů produkuje

I. Produkce kyseliny cyklopiazonové kmeny *Penicillium camemberti* na sladinném agaru se sójovým peptonem metodou TLC a HPLC — Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium camemberti* strains in wort agar with soybean peptone — TLC and HPLC

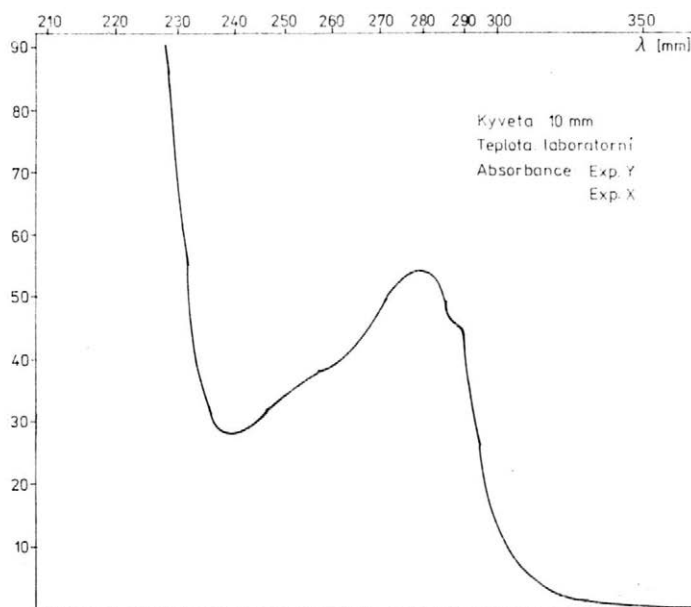
Kmen	TLC	HPLC	Kmen	TLC	HPLC
	[mg na kg živné půdy]			[mg na kg živné půdy]	
302	1	1,060	801	0,1	0,242
304	0,2	0,134	918	0,4	0,477
305	1	1,229	929	0,05	0,010
309	0,3	0,298	999	0,4	0,406
313	1,3	1,113	1000	0,05	0,004
337	1,1	1,024	1002	0,05	0,004
338	0,07	0,076	1046	0,05	0,004
730	0,05	0,051	1047	0,05	0,004
797	1	1,493	1048	0,05	0,016
799	0,05	0,023	1049	0,2	0,195

II. Produkce kyseliny cyklopiazonové kmeny *Penicillium camemberti* na tekuté půdě podle Dornera — Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium camemberti* strains in a liquid medium after Dorner

Kmen	TLC		HPLC	
	[mg na kg živné půdy]	[mg na kg suchého mycelia]	[mg na kg živné půdy]	[mg na kg suchého mycelia]
302	8	276	7,69	265,26
305	0,2	4,5	0,18	4,07
309	0,1	2,6	0,06	1,52
313	0,05	1,6	0,03	1,05
337	0,3	9,2	0,32	9,67
338	0,4	10,6	0,37	9,75
730	1	27	1,01	27,31
797	0,2	6,3	0,21	6,65
799	0,1	2,6	0,12	2,99
801	0,2	6,8	0,14	4,78
918	0,1	2,7	0,12	3,06
929	0,4	11,8	0,40	11,83
999	0,2	9,3	0,26	11,98
1000	0,05	1,6	0,07	2,09
1002	0	0	0	0
1046	0	0	0	0
1047	0	0	0	0
1048	0	0	0	0
1049	0	0	0	0

CPK. Kmeny 1002, 1046, 1047, 1048, 1049 neprodukovaly CPK v takovém množství, které bylo možné stanovit metodou HPLC a TLC. Množství CPK bylo stanoveno na 1 kg tekuté živné půdy a dále na 1 kg suchého mycelia uvedených kmenů.

U CPK, extrahované z kmenů *Penicillium camemberti*, bylo stanoveno UV spektrum v methanolu (příklad spektra u kmene č. 302 — obr. 2). Na obr. 3 je pro porovnání znázorněno UV spektrum standardu CPK v methanolu (2 $\mu\text{g/ml}$).



2. UV spektrum CPK extrahované z kmene *Penicillium camemberti* v methanolu — UV spectrum of CPA extracted from a *Penicillium camemberti* strain in methanol

Srovnáním produkce CPK u kmenů *Penicillium camemberti* na dvou odlišných kultivačních půdách byly zjištěny významné rozdíly u kmenů 302, 305, 313, 338, 730, 797 a 929. Interpretace těchto výsledků je však složitá vzhledem k rozdílnosti použitých živných půd.

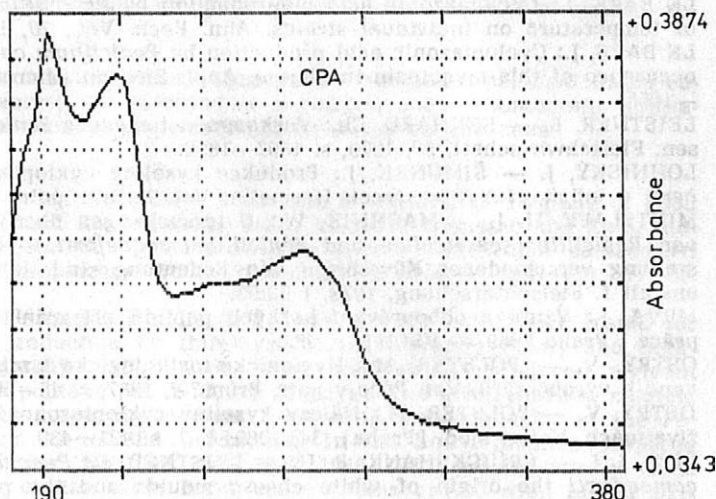
Byl sledován také vztah produkce CPK a původu kmenů *Penicillium camemberti*. Kmeny 302 a 730 (francouzského původu) kultivované na kapalně půdě podle Dornera produkovaly na 1 kg suchého mycelia nejvíce CPK ze všech testovaných kmenů.

Bylo potvrzeno zjištění (Mrva, 1989) o vyšší tvorbě CPK u čs. expediční kultury (797, 799) proti kmenu z NDR (1047), který však měl podle autora horší technologické vlastnosti.

Šikmé sladinné agary s přidavkem 10% sterilního mléka jsou používány ke kultivaci matečných kmenů *Penicillium camemberti* a CPK se na nich tvoří za tři až pět dní při teplotě nad 20 °C. Expediční kultura *Penicillium camemberti* je pěstována na zemi, která je dobrým substrátem pro produkci CPK (Lajzová, 1987; Šimová, 1988). Při sledování nových možností kultivace expedičních kultur na ovesných vločkách, k dosažení lepší manipulace s kulturami, byla zjištěna poměrně vysoká produkce CPK i na tomto substrátu (Ostrý — nepublikováno).

Date : 01-11-1989
Time : 09:10:02
Operator : Not Entered

Sample Name : CPA	Function : Absorbance
Solvent Name : metanol	Wavelength Range : 190 to 380 nanometers
Concentration : 2	Integration Time : 1 seconds
Units : ug.ml-1	Std Deviation : OFF



3. UV spektrum standardu CPK v methanolu —
UV spectrum of CPA
standard in methanol

Sladinový agar se sójovým peptonem se nám zdá být vhodnou screeningovou půdou pro testování CPK ve spojení s jejím průkazem chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Výsledky obou metod jsou srovnatelné (tab. I).

Z hygienicko-toxikologického hlediska je žádoucí, aby kmeny, které se používají v mlékárenském průmyslu při výrobě plísňových sýrů, neprodukovaly žádné toxické metabolity, které by mohly ohrozit zdraví konzumentů. Orgány hygienické služby by proto měly provádět kontrolu a testování toxinogenity uvedených kmenů *Penicillium camemberti*.

Literatura

- ENGEL, G. — MILCZEWSKI, K. E.: Die gesundheitliche Unbedenklichkeit von *Penicillium caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti*. *Milchwissenschaft*, 32, 1977, s. 517—520.
- FRANK, H. K. — ORTH, R. — REICHLE, G. — WUNDER, W.: Fütterungsversuche an Forellen mit Camembert- und Roquefort-Kulturen. *Milchwissenschaft*, 30, 1975, s. 594 až 597.
- FRANK, H. K. — ORTH, R. — IVANKOVIC, S. — KUHLMANN, M. — SCHMAHL, D.: Investigations on carcinogenic effects of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* in rats. *Experientia*, 33, 1977, s. 515—516.
- GIBEL, W. — WEGNER, K. — WILDNER, P.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage einer karzinogenen Wirkung von *Penicillium camemberti* var. *candidum*. *Arch. Geschwulstforsch.*, 38, 1971, s. 1—6.
- KIERMEIER, F. — GROLL, D.: Zur Aflatoxin B₁ — Bildung in Käsen. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 143, 1970, s. 81—89.
- KIERMEIER, F. — WEISS, G. — BEHRINGER, G. — MILLER, M.: Über das Vorkommen und den Gehalt an Aflatoxin M₁ in Käsen des Handels. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 163, 1977, s. 268—271.

- KRUSCH, U. — LOMPE, A. — ENGEL, G. — MILCZEWSKI, K. W.: Die gesundheitliche Unbedenklichkeit von *Penicillium caseicolum*, *Penicillium camemberti* und *Penicillium roqueforti*. Milchwissenschaft, 32, 1977, s. 713—715.
- LAFONT, P. — LAFONT, J. — PAYEN, J. — CHANY, E. — BERTIN, G. — FRAYSSINET, C.: Toxin production by 50 strains of *Penicillium* used in the cheese industry. Food Cosmet. Toxicol., 14, 1976, s. 131—139.
- LAJZOVÁ, R.: Sledování tvorby vybraných metabolitů plísní. [Diplomová práce.] Praha 1987 — VŠCHT, s. 44.
- LE BARS, J.: Cyclopiazonic acid bioproduction by *Penicillium camemberti* Thom, effect of temperature on individual strains. Ann. Rech. Vet., 10, 1979a, č. 4, s. 601—602.
- LE BARS, J.: Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. Appl. Environ. Microbiol., 38, 1979b, č. 6, s. 1052—1055.
- LEISTNER, L. — ECKHARD, Ch.: Vorkommen toxigener *Penicillien* bei Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft, 59, 1979, s. 1892—1896.
- LOHNISKÝ, J. — ŠIMŮNEK, J.: Produkce kyseliny cyklopiazonové *Penicillium camemberti* a jejich výskyt v sýrech Hermelín. Vet. Péče v potr. Prům., 4, 1987, s. 56—59.
- MINTZLAFF, H. J. — MACHNIK, W.: Untersuchungen über das Toxinbildungsvermögen von *Penicillium caseicolum* und *Penicillium roqueforti* — Stämmen, die für die Herstellung verschiedener Käsesorten von Bedeutung sind. Jahresber. Kulmbach, Bundesanstalt f. Fleischforschung, 1973, I 52/53.
- MRVA, J.: Vznik a odbourávání hořkých peptidů při zrání sýra Hermelín. [Diplomová práce.] Praha 1989 — VŠCHT, s. 46.
- OSTRÝ, V. — POLSTER, M.: Hygienicko-toxikologická problematika mykoflóry používané k výrobě sýrů. Vet. Péče v potr. Prům., 4, 1987, s. 48—50.
- OSTRÝ, V. — POLSTER, M.: Nálezy kyseliny cyklopiazonové a jejich producentů v poživatinách. Veter. Med. [Praha], 34, 1989, č. 7, s. 421—430.
- PITT, J. I. — CRUICKSHANK, R. H. — LEISTNER, L.: *Penicillium commune*, *Penicillium camemberti* the origin of white cheese moulds and the production of cyclopiazonic acid. Food Microbiol., 3, 1986, s. 363—371.
- POLONELLI, L. — MORACE, G. — ROSA, R. — CASTAGNOLA, M. — FRISVAD, J. C.: Antigenic characterization of *Penicillium camemberti* and related common cheese contaminants. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1987, č. 4, s. 872—878.
- REISS, J.: Mykotoxine in Lebensmitteln. New York, G. Fischer Verlag 1981, s. 549.
- SAMSON, R. A. — ECKHARD, Ch. — ORTH, R.: The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses. Antonie van Leeuwenhoek, 43, 1977, s. 261—274.
- SCHOCH, U. — LÜTHY, J. — SCHLATTER, Ch.: Mykotoxine in schimmelgereiften Käsen. Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg., 74, 1983, s. 50—59.
- SCHOCH, U. — LÜTHY, J. — SCHLATTER, Ch.: Mykotoxine von *Penicillium roqueforti* und *Penicillium camemberti* in Käse. Milchwissenschaft, 39, 1984, č. 10, s. 583—584.
- STILL, P. — ECKHARD, Ch. — LEISTNER, L.: Bildung von Cyclopiazonsäure durch *Penicillium camemberti* — Isolat von Käse. Fleischwirtschaft, 58, 1978, č. 5, s. 876—877.
- ŠIMOVA, M.: Aktivita plísňových kultur z hlediska dosažení standardnosti sýru, vzniku peptidů hořké chuti a tvorby mykotoxinů. [Diplomová práce.] Praha 1988 — VŠCHT, s. 52.
- ŠIMŮNEK, J. — POLSTER, M.: Kyselina cyklopiazonová, mykotoxin narůstajícího významu, producenti, výskyt a detekce. In: Problematika mykotoxinů z hlediska potravinářské praxe a veterinární praxe. Brno, ČSVTS 1985, s. 35—39.
- TEPLÝ, M.: Čisté mlékařské kultury. Praha, SNTL 1984, s. 295.
- VESELÝ, D. — VESELÁ, D. — BERANOVÁ, M.: Problematika mykotoxinů v sýrech. In: Sbor. Předn. Mikrofóra masných a drůbežářských výrobků a novinky v taxonomii. Liblice, ČSAV 1985, s. 76—77.

Došlo dne 25. 5. 1990

ОСТРЫ, В. — РУПРЫХ, Й. — КНЕСЕЛ, Л. — ПОЛСТЕР, М. (Центр гигиены пищевых цепей, Институт гигиены и эпидемиологии Брно; Областная санитарно-эпидемиологическая станция, Брно): Тестирование токсигенности штаммов *Penicillium camemberti*: определение циклопiazоновой кислоты. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 55—63.

Коллекционные штаммы *Penicillium camemberti* № 302—1049 тестировали на продукцию циклопiazоновой кислоты методом хроматографии в тонком слое и жид-

костной хроматографии высокого давления. Всех 20 тестируемых штаммов продуцировало микотоксин циклопиазоновой кислоты на солодовом агар-агаре с добавкой соевого пептона (при температуре 25 °C, в течении 21 дня). Указанная питательная среда — это подходящая отсеивная среда для тестирования токсиногенности штаммов *Penicillium camemberti* с точки зрения циклопиазоновой кислоты. На жидкой среде по Дорнеру при одинаковых условиях пять штаммов (№ 1002, 1046, 1047, 1048, 1049) проявилось с отрицательным результатом, однако некоторые штаммы продуцировали даже больше циклопиазоновой кислоты, чем штаммы, указанные на агаровой среде.

микотоксины; циклопиазоновая кислота; культурная микрофлора; *Penicillium camemberti*; токсиногенность; хроматография в тонком слое; жидкостная хроматография в тонком слое; жидкостная хроматография высокого давления

OSTRÝ, V. — RUPRICH, J. — KNESEL, L. — POLSTER, M. (Center of Hygiene of Food Chains, Institute of Hygiene and Epidemiology Brno; Regional Hygienic and Epidemiological Station Brno): *Verification of toxinogenicity of the Penicillium camemberti strains: determination of cyclopiazonic acid*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 55—63.

The *Penicillium camemberti* strains as collection items No 302—1049 were tested for cyclopiazonic acid (CPA) production by thin-layer chromatography (TLC) and high-pressure liquid chromatography (HPLC). All 20 verified strains produced mycotoxin CPA in wort agar with soya peptone (at 25 °C, for 21 days). The given nutrient medium was consequently a suitable screening medium for testing toxinogenicity of the *Penicillium camemberti* strains as to CPA production. In the liquid medium prepared according to Dorner, five strains (No 1002, 1046, 1047, 1048, 1049) provided in the same conditions negative results; on the other hand, some strains proved even higher CPA production than in the given agar medium.

mycotoxins; cyclopiazonic acid; culture mycoflora; *Penicillium camemberti*; toxinogenicity; TLC; HPLC

OSTRÝ, V. — RUPRICH, J. — KNESEL, L. — POLSTER, M. (Zentrum für Hygiene von Nahrungsmittelketten, IHE Brno; KHES Brno): *Testen der Toxinogenität von den Stämmen Penicillium camemberti: die Bestimmung der Zyklapiazonsäure*. Potravinářské Vědy, 9, 1991 (1): 55—63.

Die Sammlungsstämmen *Penicillium camemberti* Nr. 302—1049 wurden auf der Produktion der Cyclopiazonsäure (CPK) mit Hilfe der Methode der Chromatographie auf der dünnen Schicht (TLC) und der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) getestet. Alle 20 getesteten Stämme produzierten das Mykotoxin CPK auf dem Würzenagar mit dem Sojapepton (bei Temperatur 25 °C, nach 21 Tagen). Der angeführte Nährboden ist also ein geeigneter Screeningboden für Testung der Toxinogenität von den Stämmen *Penicillium camemberti* vom Gesichtspunkt der Produktion von CPK. Auf dem flüssigen Boden nach Dorner zeigten fünf Stämme (Nr. 1002, 1046, 1047, 1048, 1049) unter gleichen Bedingungen ein negatives Ergebnis, aber manche Stämme hatten die Produktion von CPK sogar höher als auf dem angeführten Agarboden.

Mykotoxine; Cyclopiazonsäure; Kulturmykoflora; *Penicillium camemberti*; Toxinogenität; TLC; HPLC

Adresy autorů:

MVDr. Vladimír Ostrý, CSc., MVDr. Jiří Ruprich, CSc., doc. RNDr. Miroslav Polster, CSc., Centrum hygieny potravinových řetězců, IHE, Palackého 1—3, 612 42 Brno
RNDr. Lubomír Knesel, KHES, Cornova 68, 600 00 Brno

BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST

V dubnu 1990 byla založena samostatná **Biotechnologická společnost**, která bude sdružovat všechny zájemce o biotechnologie s cílem co největší vzájemné informovanosti.

Společnost je řádně zaregistrována (IČO 00570397), má své stanovy, své hospodaření a stala se členem Svazu vědeckotechnických společností.

Biotechnologická společnost bude vydávat vlastní informační časopis BIOPROSPECT, jehož nulté číslo vyšlo v prosinci 1990.

Biotechnologická společnost počítá s činností regionálních poboček, které budou ustanoveny na základě přání členů. Společnost chce podporovat co nejširší účast našich biotechnologů v nejrůznějších mezinárodních organizacích, redakčních radách zahraničních časopisů apod. a informovat členy společnosti o činnosti těchto organizací. Na stránkách svého časopisu chce poskytovat co nejobsáhlejší informace odborné (přehledné články), informace o mezinárodních i domácích konferencích a sympozích, uvádět charakteristiky domácích i zahraničních výrobců a výzkumných institucí, informovat o nových knihách a časopisech, uvádět inzerci všeho druhu a podávat zprávy o činnosti vysokých škol a pracovišť ČSAV.

Přihlášku do Biotechnologické společnosti můžete získat na adrese: Ing. Jana Schováňková, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6. Členský příspěvek činí 40 Kčs.

ZNAČENÉ SLOUČENINY PŘI SLEDOVÁNÍ SLOŽEK POŽIVATIN

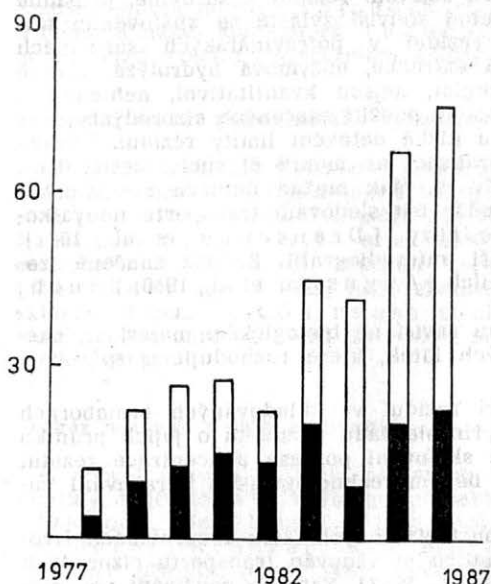
Značené sloučeniny (ZS) se již více než půlstoletí používají k řešení problematiky disciplín chemicko-biologického vědního základu. V této oblasti představují významný vědecký přístup a vydobily si zde své nezastupitelné místo.

Moderní věda o potravinách hledá stále nové a nové metody studia chemických a biochemických pochodů probíhajících v potravinářských surovinách, polotovarech a výrobcích. Vzhledem ke zvyšující se intenzifikaci výroby zemědělsko-potravinářského komplexu jsou současně potřebné nové přístupy ke zjišťování přítomnosti cizorodých látek v potravinách.

K řešení uvedených úkolů má současná potravinářská věda řadu metodických přístupů. Své místo mezi nimi mají i postupy využívající ZS, které jsou užitečným pomocníkem nejen při osvětlování některých otázek chemie potravin, ale zvláště se uplatní při tzv. dynamické analýze (Janíček et al., 1962). ZS umožňují potravinářsky významné sloučeniny nejen stanovit, ale i ozřejmit jejich úlohu vzhledem k trvanlivosti a jakosti potravin, jakož i jejich uplatnění ve výživě (Janíček, Halačka, 1985).

Význam ZS při řešení problémů potravinářského výzkumu i praxe vzrůstá teprve v posledním desetiletí (obr. 1). Jedná se však většinou o práce zahraničních autorů. V naší republice se používají ZS v potravinářském výzkumu dosud jen ojediněle.

Pod pojmem ZS rozumíme nízko- i vysokomolekulární látky, na které je kovalentně vázána vhodná značka (Stenesh, 1975). Jako značky se používají zvláště radioaktivní i stabilní nuklidy, enzymy, fluorofory, ale i jiné vhodné detekovatelné markery (Káš, Rauch, 1983).



1. Celkový počet prací využívajících značených sloučenin v jednotlivých letech (podle FSTA)

□ v analýze poživatin; ■ při stopování složek poživatin

Zavedení značky do nízko- nebo vysokomolekulární sloučeniny umožní sledovat (stopovat) tuto sloučeninu i v nejsložitějších systémech, dovolí ji rozlišit od stejné, ale neznačené sloučeniny a detekovat ji i ve velmi nízkých koncentracích řádu pmol a amol. Je samozřejmým předpokladem, že ZS se nesmí ve svém chemickém chování ani biologické aktivitě lišit od neznačené. Právě okolnost, že v chemii pracujeme v experimentu vždy s různými sloučeninami, může náhrada libovolné z nich učinit

tento metodický postup zcela univerzální. Můžeme stopovat, ve které části pokusného systému se ZS hromadí, jak se v tomto systému transportuje, se kterými složkami systému integruje, do které reakce nebo sledu reakcí vstupuje, do jaké míry je z potravy využitelná, resp. jaký je její osud v organismu. O praktickém využití ZS rozhodují přednosti tohoto přístupu před jinými metodami.

Sledování distribuce a transportu

ZS jsou zvláště vhodné ke studiu distribuce a transportu přirozených složek potravin i cizorodých látek v potravinovém řetězci. Umožňují určit nejen distribuci, ale i pohyb sledované sloučeniny v pokusném objektu, přičemž dynamické hledisko je pro poznání pochodů probíhajících v potravinářských surovinách, polotovarech a výrobcích nepochybně mnohem cennější. Znalost distribuce testovaných sloučenin nám umožňuje lépe pochopit některé jejich interakce se složkami potravin, reakce, kterých se zúčastní, včetně složitých pochodů, probíhajících při výrobě a skladování potravin.

Pro ilustraci je uvedeno několik příkladů možných aplikací ZS při řešení problémů potravinářského výzkumu i praxe. Jako značek bylo v těchto postupech využito většinou radionuklidů.

V oblasti technologie mléka a mléčných výrobků je možné sledovat distribuci fosfatových emulgačních solí, vápníku, železa a jiných biogenních prvků, jakož i syřidlových enzymů v syrovátce a zrnu, lipoproteinové lipasy a některých vitamínů mezi kasein, syrovátku a lipidovou frakci (Sundheim, Beggtsson-Olivecrona, 1986). Obdobně cenné poznatky pro cereální chemii a technologii představuje znalost distribuce biogenních prvků a lipidů v závislosti na různých podmínkách zpracování těchto surovin (Garcia et al., 1977). Distribuci, ale i v průběhu difúze sodíkových iontů a vody u uzenářských výrobků lze měřit pomocí radionuklidů ^{3}H a ^{22}Na .

V posledních letech je nejvíce prací zaměřeno na sledování distribuce a transportu reziduí cizorodých látek, zvláště pesticidů do potravinářských surovin rostlinného a živočišného původu. ZS se uplatní zvláště při modelových pokusech, ve kterých je cílem zjistit distribuci cizorodých látek a dobu setrvání reziduí v surovině, případně průběh jejich odbourávání. Obtíže jiných metod souvisí zvláště se zjišťováním tzv. neextrahovatelného nebo vázaného podílu reziduí v potravinářských surovinách (Stratton Wheeler, 1986). Používaná extrakce, enzymová hydrolýza, včetně technik využívajících destilace za vyšších teplot, nejsou kvantitativní, nehledě na pracnost a zdoluhavost takových postupů. Výhodou použití značených cizorodých látek v těchto pokusech je zjednodušení postupu a nízké detekční limity reziduí. Úprava vzorků spočívá obvykle pouze v jejich mineralizaci na mokré či suché cestě. Tuto operaci vykoná automatické zařízení. Mnohdy je však možná detekce sledovaných sloučenin bez úpravy vzorků. Příkladem tu může být sledování transportu nonyalkoholu, jako inhibitoru klíčení, do bramborové hlízy (Drauschke et al., 1981). Zachycení inhibitoru slupkou prokázali autoři autoradiografií. Rovněž značené izothiokyanáty byly využity při transportních studiích (Augustin et al., 1986; Rauch, Boháčenko, 1981).

Charakterizace reziduí vázaných na surovinu závisí na biologickém materiálu, chemickém složení použitého preparátu cizorodých látek, které rozhodujícím způsobem ovlivňují podstatu vazby reziduí na surovinu.

Série prací symposia věnovaného distribuci reziduí ve skladovaných bramborách a cereáliích (Hadjimetriou, 1986) přinesla řadu poznatků o jejich průniku do suroviny, o jejich lokalizaci v ní, včetně sledování poklesu koncentrace reziduí během skladování, jakož i jejich degradace během technologického zpracování surovin.

Neméně závažné jsou studie sledující distribuci cizorodých látek v surovinách živočišného původu. Hlavní zřetel v této problematice je věnován transportu cizorodých látek, zvláště pesticidů do mléka (Lynch et al., 1987). Zatímco používání pesticidních přípravků je v zemědělství současné epochy nezbytností, představuje aplikace anabolických hormonů v živočišné výrobě některých států velké zdravotní nebezpečí pro konzumenty. Jsou proto nezbytné metody pro sledování těchto mnohdy kancerogenních látek v potravinovém řetězci. ZS se pro tato sledování velmi dobře hodí. Uplatní se však i při sledování mykotoxinů (Goto, Hsieh, 1985; Prelusky et al., 1987), různých toxických organických sloučenin (Kinzell et al., 1985), jakož i při studiu migrací komponent obalových materiálů do potravin (Figge, 1983; Mirchi et al., 1989).

Sledování interakcí složek potravin

Poměrně málo prací se zabývá studiem interakcí v potravinách pomocí ZS. Neodpovídá to významu, které interakce potravinářsky významných sloučenin mají. Značených bílkovin bylo např. využito při studiu rovnováhy bílkovin v kaseinových micelách a při sledování interakcí mezi bílkovinami a lipidy při výrobě instantní dětské mléčné výživy (Rowley, Richardson, 1985). Detailní rozbor interakcí bílkovin s tanniny podal Asquith (1985). ZS umožňují studovat rovněž interakce nízkomolekulárních látek s makromolekulami. Sem patří sledování interakcí dietní vlákniny s vitaminy (Omayer et al., 1983) i cizorodými látkami (Sjoedin et al., 1985).

Sledování osudu složek potravin

ZS jsou široce používané při zjišťování využitelnosti (bioavailability) různých významných složek potravin z nutričního hlediska a při sledování osudu cizorodých látek v potravinách i v organismu. Jak se ukazuje v posledních letech, objevuje se stále více prací, které se zabývají využitelností složek potravin po různých fyzikálních nebo chemických zákrocích na potraviny (Johnson et al., 1985). Rovněž je sledována využitelnost různých aditiv, významných z nutričního či technologického hlediska, kterými jsou potraviny obohacovány (Cohen, 1980). Problematika sledování metabolického osudu sloučenin významných z potravinářského hlediska se v posledních letech stále častěji objevuje na stránkách potravinářských časopisů. Hlavním důvodem je tu zřejmě ta okolnost, že mnohé problémy souvisí více se změnami potravinářských technologií, které bezprostředně mají i nutriční důsledky. ZS nám dovoří lépe poznat nejen využití sledovaných složek potravin, ale i jejich další přeměny v organismu (Johnson, Weaver, 1986; Khan et al., 1987). Paleta sloučenin, jejichž využitelnost byla sledována pomocí ZS, je rovněž pestrá. Uveďme alespoň sledování využitelnosti aminokyselin, zvláště lysinu (Cecchi, Resmini, 1977), bílkovin, lipidů (Borchardt et al., 1982), ale i minerálů, zejména železa (Rauch et al., 1990). V posledních letech je aktuální studium vlivu vlákniny na využitelnost různých složek potravy (Sjoedin et al., 1985). Pozornost byla věnována však i nutričním účinkům emulgátorů (Rauch, Káš, 1984), jako jsou např. lecitiny, estery organických kyselin s glycerolem, estery sacharosy apod.

Sledování reakcí potravinářsky významných sloučenin

Pomocí ZS můžeme sledovat i jejich účast v reakcích, které probíhají v potravinářských surovinách i během jejich technologického zpracování a při skladování finálních produktů. Příkladem tu může být sledování postupných přeměn lysinu při studiu Maillardovy reakce (Saito et al., 1980), sledování tvorby červených a hnědých kondenzačních produktů při stárnutí červeného vína pomocí značených anthokyanů (Bourzeix et al., 1985) nebo sledování reakcí sloučenin způsobujících zákaly při skladování piva (McGuinness et al., 1975). V potravinách probíhají také reakce katalyzované enzymy, které lze rovněž sledovat pomocí ZS (Oldam, 1977; Rauch et al., 1981).

Průkaz pravosti a stáří poživatin

K určení pravosti a stáří některých poživatin lze využít přirozeně se vyskytující nuklidy, nejčastěji ^{14}C . Měřením radioaktivity octa lze rozpoznat syntetický a přírodní původ octa, vína, brandy a také oxidu uhličitého a ethanolu v šumivých vínech (Krueger, Krueger, 1985; Martin et al., 1985a). Stejným způsobem je možné ověřit přírodní původ skořice, vanilinu (Hoffman, Salb, 1980) a některých komponent aromatu (Drevon et al., 1980). Je dokonce možné dokázat použití cereálií při výrobě piva. Při rozlišování původu poživatin je nezbytné brát ohled na jedenáctiletý cyklus kolísání obsahu radioaktivního oxidu uhličitého v ekosféře. Nejenom tato okolnost ztěžuje zjištění pravosti potravin. Vyskytly se i případy, kdy falšovatelé přidávali $^{14}\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ do destilátů, aby vzbudili dojem pravosti a stáří nápoje. Proto bylo potřebné vypracovat složitější kritéria hodnocení, která by nebylo možné obcházet. To se skutečně podařilo zavedením doplňkových měření i některých stabilních, přirozeně se vyskytujících nuklidů hmotovou spektrometrií. Měření přirozené radioaktivity ^3H , ^{14}C

a obsahu ^2H , ^{13}C , ^{18}O ve vzorcích a následným výpočtem poměrů $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ znemožnilo falšovat pravost poživatin (Schmid et al., 1981). Tato metoda úspěšně rozlišuje pravost octa, ovocných sirupů, cukru, medu, alkoholických nápojů, tuků, masa, vajec, mléčných výrobků, ryb, potravinových aditiv a aromatu. Uvedený metodický přístup umožní rozpoznat, zda při kandování ovoce byl použit med nebo cukr (Doner et al., 1979) a rozlišit přírodní šťávy od roztoků cukru (Parker, 1982).

Měření obsahu deuteria umožní přesně identifikovat druh evropského piva nebo prokázat ředění džusů, neboť směrem k rovníku obsah deuteria ve vodě vzrůstá (Martin et al., 1985b). Nedávno bylo zjištěno, že rok sklizně, např. čaje, lze stanovit změním ^{228}Ra a ^{228}Th (Kobashi, Tominaga, 1985).

V tomto literárním přehledu neuvádím měření kontaminace poživatin radionuklidy, které se dostaly do potravinového řetězce v důsledku činnosti člověka. Jedná se totiž o problém, který při výrobě potravin nemůže ovlivnit, přestože je z hygienického hlediska kontaminace radionuklidy nežádoucí. Přesná měření však dokázala, že 80 až 90 % radioaktivity, kterou přijímáme potravou, pochází z přirozeně se vyskytujícího radionuklidu ^{40}K .

Technické aplikace

ZS pomáhají i při řešení některých technických problémů. Umožňují testovat funkci cukrovarnických krystalizátorů i jiných cukrovarnických (Hirschmüller, 1972) a pekárenských (Dolinin, Sakharov, 1976) zařízení. V oblasti masného průmyslu se uplatnily při vývoji technologie spařování na porážkové lince i při nepřímém stanovení hmotnosti, obsahu tuku a bílkovin jatečných zvířat měřením přirozené radioaktivity ^3H nebo ^{40}K celotělovým radiometrem (Jones et al., 1984). Pomocí ZS lze rovněž sledovat proces mytí láhví a sanitace v potravinářských závodech, kontrolu dokonalého promíchání potravinářských aditiv a krmných směsí, jakož i testování potravinářských strojů a zjišťování indexu zamoření zrní při skladování různými škůdci (Wiggin, Gladstone, 1956). Umožňují to radionuklidy s velmi krátkým poločasem rozpadu.

Závěr

Literární přehled ukazuje jednu oblast, a to sledování (stopování) pomocí ZS. Druhou velkou oblast představuje využití ZS v analýze poživatin, kterému bude věnováno zvláštní sdělení (Rauch et al., 1991). Některé poznatky lze získat pouze pomocí ZS, jiné snadněji než jinými metodami. Proto je potřebné se věnovat rozvoji těchto metod pro potřeby zemědělsko-potravinářské sféry.

Tento přehled shrnuje pouze nejvýznamnější příklady využití ZS. Úplná rešerše, zahrnující více než dvě stovky prací, přesahuje publikační možnosti časopisu a je k dispozici u autora.

Na základě analogií s ostatními chemicko-biologickými vědními disciplínami a podle vývojového trendu posledních let (obr. 1) lze předpokládat další zvýšení podílu ZS na řešení problémů potravinářského výzkumu i praxe.

Literatura

- ASQUITH, T. N.: Evidence for functional heterogeneity both between and within four sources of condensed tannin. University microfilms order no. 85-29,252, Purdue Univ., Lafayette, Illinois 1985.
- AUGUSTIN, J. — DROBNICA, L. — KOUŘIL, F.: Izothiokyanáty (XVI): Příprava izothiokyanatů označených radionuklidem ^{35}S na funkčně skupině NCS. Chem. Zvesti, 20, 1986, s. 687—691.
- BORCHARDI, M. — NOACK, R. — AUST, L.: *In vivo* incorporation of ^{14}C -acetate into liver and plasma lipids of postnatally overfed rats. Nahrung, 26, 1982, s. 151—156.
- BOURZEIX, M. — HEREDIA, N. — FLAUZY, C. — TACCHINI, M.: Use of a radioactive anthocyanin to control red coloration of wine during maturing and ageing. Ind. aliment. agric., 102, 1985, s. 19—25.
- CECCHI, L. — RESMINI, P.: Radiochemical determination of available lysine. Rivista Soc. Ital. Sci. Aliment., 6, 1977, s. 257—260.

- COHEN, Y.: Use and limits of radiotracers in the study of drugs and xenobiotics metabolism. *Ann. Pharm. Fr.*, 38, 1980, s. 279–294.
- DOLININ, V. A. — SAKHAROV, E. V.: Use of radioisotope instruments in the bakery. *Khlebopekarn. i Konditer. Prom.*, 9, 1976, s. 30–32.
- DONER, L. W. — CHIA, D. — WHITE, J. W. Jr.: Mass spectrometric $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ determinations to distinguish honey and C_3 plant sirups from C_4 plant sirups (sugar cane and corn) in candied pineapple and papaya. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 62, 1979, s. 928–930.
- DRAUSCHKE, W. — STEINBEISS, C.-D. — HOHNSTADTER, I.: Studies on the use of nonyl alcohol as a temporary sprout-inhibiting agent in plant potatoes. *Nahrung*, 25, 1981, s. 35–38.
- DREVON, G. — MARECHAL, J. — MARIEN, G. — PACHIANDI, C.: Differentiation of some aroma components using radioactive carbon. *Ann. Falsific. Expert. Chim.*, 73, 1980, s. 607–609.
- FIGGE, K.: Radioanalytical studies on factors influencing migration of components out of packaging materials into foods. *Verpackungs-Rundschau (Heusenstamm)*, 34, 1983, s. 27–38.
- GARCIA, W. J. — HODGSON, R. H. — BLESSIN, C. W. — INGLETT, G. E.: Preparation of corn products endogenously labeled with ^{65}Zn for use in bioavailability studies. *J. agric. Food Chem.*, 25, 1977, s. 1290–1295.
- GOTO, T. — HSIEH, D. P.: Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered ^{14}C -aflatoxin B₁. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 68, 1985, s. 456–458.
- HADJIDEMETRIOU, D. G.: Residues of ^{14}C -pirimiphos-methyl in stored potatoes. In: *Radiotracer studies of pesticide residues in stored products. Meet. Isotope Tracer-Aided Stud. Pesticide Residues in Stored Products*. London, Ontario, Canada, 5–9 May 1986.
- HIRSCHMÜLLER, H.: Application of radioisotopes in sugar technological practice and research. In: *Proc. South Afr. Sugar Technol. Assoc.*, 46, 1972, s. 21–26.
- HOFFMAN, P. G. — SALB, M. C.: Radiocarbon method for authenticating natural cinnamic aldehyde. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 63, 1980, s. 1181–1183.
- JANIČEK, G. — HALAČKA, K.: *Základy výživy*. Praha, SNTL 1985.
- JANIČEK, G. — SANDERA, K. — HAMPL, B.: *Rukověť potravinářské analytiky*. Praha, SNTL 1962.
- JOHNSON, C. D. — BERRY, M. F. — WEAVER, C. M.: Soybean hulls as an iron source for bread enrichment. *J. Food Sci.*, 50, 1985, s. 1275–1277.
- JOHNSON, C. D. — WEAVER, C. M.: Chromium in kale, wheat, and eggs: Intrinsic labeling and bioavailability to rats. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 1986, s. 436–440.
- JONES, B. — NILSSON, T. — SORQVIST, S.: Contamination of pig carcasses with scalding water. *Fleischwirtschaft*, 64, 1984, s. 1226–1228.
- KÁŠ, J. — RAUCH, P.: Labeled proteins. *Top. Curr. Chem.*, 112, 1983, s. 163–212.
- KHAN, S. U. — KACEW, S. — DUPONT, S. — STRATTON, G. D. Jr. — WHEELER, W. B.: Bioavailability in rats of bound residues from radishes treatment with either radiolabeled dieldrin or carbofuran. *J. agric. Food Chem.*, 35, 1987, s. 89–93.
- KINZELL, J. H. — MCKENZIE, R. M. — OLSON, B. A. — KIRSCH, D. G. — SHULL, L. R.: Metabolic fate of ^{14}C -pentachlorophenol in a lactating dairy cow. *J. agric. Food Chem.*, 33, 1985, s. 827–833.
- KOBASHI, A. — TOMINAGA, T.: ^{228}Ra - ^{228}Th dating of the plant samples. *Int. J. appl. Radiat. Isot.*, 36, 1985, s. 547–553.
- KRUEGER, D. A. — KRUEGER, H. W.: Isotopic composition of carbon in vinegar. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 68, 1985, s. 449–452.
- LYNCH, M. J. — MOSHER, F. R. — BURNETT, D. M. — NEWBY, T. J.: Residues of tritium-labeled Morantel in lactating dairy cattle. *J. agric. Food Chem.*, 35, 1987, s. 351–354.
- MARTIN, G. E. — KRUEGER, H. W. — BURGGRAFF, J. M.: Radiocarbon ^{14}C differentiation of sparkling and carbonated wines. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 68, 1985a, s. 440–443.
- MARTIN, G. J. — BENBERNOU, M. — LANTIER, F.: Application of site-specific natural isotope fractionation of hydrogen to the characterization of European beers. *J. Inst. Brew.*, 91, 1985b, s. 242–249.
- MCGUINNESS, J. D. — EASTMOND, R. — LAWS, D. R. J. — GARDNER, R. J.: The use of ^{14}C -labeled polyphenols to study haze formation in beer. *J. Inst. Brew.*, 81, 1975, s. 287–292.
- MIRCHI, R. — KMÍNKOVÁ, M. — KOCOUREK, V.: Distribuce olova v mléce. *Potravinářské vědy*, 7, 1989, č. 1, s. 53–58.

- OLDAM, K. G.: Radiotracer techniques for enzyme assays and enzymic assays. *Radiotracer Tech. Appl.*, 2, 1977, s. 823—844.
- OMAYE, S. T. — CHOW, F. I. — BETSCHART, A. A.: *In vitro* interactions between dietary fiber and 14C-vitamin D or 14C-vitamin E. *J. Food Sci.*, 48, 1983, s. 260—261.
- PARKER, P. L.: The chemical basis of the use of 13C/12C ratios to detect the addition of sweeteners to fruit juice concentrates. *Flüssiges Obst*, 49, 1982, s. 692—694.
- PRELUSKY, D. E. — TRENHOLM, H. L. — HAMILTON, R. M. G. — MILLER, J. D.: Transmission of 14C-deoxynivalenol to eggs following oral administration to laying hens. *J. agric. Food Chem.*, 35, 1987, s. 182—186.
- RAUCH, P. — BOHAČENKO, I.: Study of the penetration of 35S-allylisothiocyanate into potato tuber. *Sbor. VŠCHT E*, 52, 1981, s. 179—191.
- RAUCH, P. — FUKAL, L. — KAŠ, J.: Determination of subresidual proteolytic activities in foods. In: *Proc. 1st Europ. Conf. Food Chem.* Vienna, 17.—20. 2. 1981, s. 240—246.
- RAUCH, P. — FUKAL, L. — KAŠ, J.: Značené sloučeniny v analýze poživatin. *Potravinářské Vědy*, 9, 1991, č. 2 (v tisku).
- RAUCH, P. — KAŠ, J.: Metabolic fate of ammonium salts of synthetic phosphatidic acids after application *per os*. *Ann. Nutr. Metab.*, 28, 1984, s. 130—136.
- RAUCH, P. — KAŠ, J. — RANNÝ, M.: Iron bioavailability from its complex with sucrose. *Food Chem.*, 36, 1990, s. 129—134.
- ROWLEY, B. O. — RICHARDSON, T.: Protein-lipid interactions in concentrated infant formula. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985, s. 3180—3188.
- SAITO, S. — KOJIMA, K. — MORI, B.: Epsilon-fructoselysine in urine of rats fed 14C-lysine-labeled casein browned by amino-carbonyl reaction. *Agric. biol. Chem.* 44, 1980, s. 1327—1331.
- SCHMID, E. R. — GRUNDMANN, H. — FOGY, I.: Determination of isotope ratios and their application in food analysis. *Ernährung*, 5, 1981, s. 459—462.
- SJOEDIN, P. B. — NYMAN, M. E. — NILSSON, L. — ASP, N. L. — JAEGERSTAD, M.: Binding of 14C-labeled food mutagens by dietary fiber *in vitro*. *J. Food Sci.*, 50, 1985, s. 1680—1684.
- STENESH, J.: *Dictionary of biochemistry*. New York, J. Wiley 1975, s. 88.
- STRATTON, G. D. Jr. — WHEELER, W. B.: Characterization of bound residues in plants. Quantitation. In: *Nature and bioavailability of bound 14C-pesticide residues in soil, plants and food*. Gainesville, Florida, 25—29. 3. 1985, s. 71—81.
- SUNDHEIM, G. — BENGTSSON-OLIVECRONA, G.: Iodine-125-labeled lipoprotein lipase as a tool to detect and study spontaneous lipolysis in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 69, 1986, s. 1776—1783.
- WIGGIN, E. — GLADSTONE, E.: *Industrial utilization of radioisotopes*. New York, Atomic Ind. Forum 1956, s. 1—108.

Adresa autora:

Ing. Pavel Rauch, DrSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

XXI. SYMPOZIUM O NOVÝCH SMĚRECH VÝROBY A HODNOCENÍ POTRAVIN

Ve dnech 28.—30. 5. 1990 se v Podolánkách konalo XXI. Sympozium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, které tradičně organizuje Odborná skupina pro potravinářskou a agrikulturní chemii Čs. společnosti chemické při ČSAV spolu s dalšími organizacemi.

Program sympozia byl zaměřen na problematiku jak hlavních složek potravin, tak i minoritních látek včetně aditiv a kontaminantů. Přednesené referáty a postery se zabývaly novými analytickými metodami a jejich aplikacemi, ale i změnami, které nastávají v průběhu zpracování a skladování potravin. Celkem bylo předneseno 30 ústních sdělení a prezentováno 24 posterů. Sympozia se zúčastnilo 108 odborníků z oblasti potravinářské a zemědělské vědy, výroby i zdravotnictví.

Již tradičně byla součástí odborného programu diskuse o senzorickém hodnocení potravin včetně praktického hodnocení dvou druhů nově vyvíjených mléčných dresinů, dále dvou druhů salámů a čtyř různých vzorků jaderovin. Výsledky senzorického hodnocení ještě během sympozia zpracovali a zhodnotili Barviř a Rusz.

Skupina sedmi referátů prvního dne sympozia se týkala problematiky lipidů. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC má kromě jiných oblastí své uplatnění i v analytice lipidů. Pánek, Pokorný a Davídek ji užili k separaci triacylglycerolů a jejich degradačních produktů pro určení typu oleje a stanovení stupně žluklosti. Stanovením transizomerů mastných kyselin ve ztužených olejích metodou HPLC se zabýval referát autorů Filip, Bechyňová a Beitlerová. Rovněž nutričně významné lipofilní faktory — vitamín A, karoteny a tokoferoly lze touto metodou spolehlivě stanovit. Její aplikaci uvedli ve své práci Křišťan, Holasová, Pařízková a Blatná. Změny složení rybího tuku během zpracování ryb byly předmětem sdělení autorů Voldřich a Kalač. Zatímco celkový obsah tuků se během uzení a sterilace neměnil, činily ztráty nenasycených mastných kyselin 20 až 50 % původního obsahu. Referát kolektivu Mashehdani, Pokorný, Pánek a Davídek pojednával o kvalitě makových semen v průběhu skladování. Při kombajnové sklizni dochází k poškození semen, uvolnění přítomné lipoxygenasy, která se pak výrazně podílí na katalýze oxidace mastných kyselin. Stabilita oleje vůči oxidaci je kromě jiného též ovlivněna přítomností chlorofylových pigmentů. Jednoduchou spektrofotometrickou metodou pro stanovení těchto látek v rostlinných olejích vypracovali Holasová, Pařízková, Pokorný a Blatná. Při stanovení jodového čísla tuků a olejů se používá toxický tetrachlormethan. Při mezinárodních mezilaboratorních zkouškách zjistili Káňová, Pokorný a Davídek, že je možná náhrada cyklohexanem, aniž by došlo k ovlivnění výsledků.

Studiu stability syntetického sladidla Acesulfamu K se věnovali Suhaj a Kováč. Sledovali vliv teploty, koncentrace, iontové síly, pH a vybraných složek potravin. Při aplikaci sladidla v nealkoholických nápojích a při pečení do 200 °C byly ztráty zanedbatelné. O senzorickém hodnocení směsných náhradních sladidel referovali Syrový a Davidková. Ve směsích s aspartamem pozorovali zvýšení intenzity sladké chuti. Steviosid a jeho směsi se z hlediska senzorických vlastností zdají nevhodné. Senzorickým hodnocením chuti umami (chuť glutamátu hydrogensodného), pro kterou v Evropě nemáme zvláštní označení, se zabýval referát Pilkové a Pokorného.

Izolace askorbát oxidasy — enzymu užívaného ke stanovení vitamínu C — z kultur rostlinných explantátů byla předmětem sdělení kolektivu Králová, Macek, Molnárová, Vaněk a Demnerová. Dobré výtěžky byly nalezeny např. u tabáku, routy, melounu, ostropestřce a dalších. Problematikou vázaných forem riboflavinu a možností jejich štěpení pomocí močoviny se zabýval referát Skácelové a Pickové. Látkám s vitamínovou aktivitou — folátům — byl též věnován referát autorů Černá, Přistoupilová a Kodíček. Autoři zjistili, že šetrnou dehydratací vodných roztoků málo stabilních folátů nebo jejich solí vznikají za vhodných podmínek stabilní komplexy s původní vitamínovou aktivitou.

Při sledování reakcí neenzymového hnědnutí byly v modelových systémech identifikovány 1,3-disubstituované imidazoly, patřící mezi hlavní reakční produkty. O výsledcích práce referovali Davídek T., Velíšek a Davídek J.

Do oblasti analytiky biogenních aminů byly směřovány referáty dvou autorských kolektivů. Špinar, Kellner, Čulík a František vypracovali metodu HPLC s fluorimetrickou detekcí, Mňuková prezentovala metodu s užitím automatického analyzátoru aminokyselin.

Na význam znalostí světově platných norem pro potravinářské výrobky pro výrobce a distributory potravin poukázal referát Pařízkové a Blatné.

V bloku přednášek věnovaných problematice masa a masných výrobků se Pipek, Fořt a Šmíd zabývali údržností párkových konzerv z hlediska přítomnosti kyslíku, sterilizačního režimu a kontaktu masného výrobku s látkou. Hodnotili účinek aerobních sporulantů. Tomancová, Steinhauer, Matyáš a Sixl sledovali přežívání patogenní mikroflóry v tepelně neopracovaných masných výrobcích v závislosti na technologickém způsobu jejich opracování. Porovnávali klasicky vyráběné uzeniny (poličan, lovecký salám) s výrobky, u nichž byly aplikovány startovací kultury (Herkules). Mikrobiální růst korelovali s měřeními fyzikálně-chemických vlastností výrobků v průběhu jednotlivých technologických operací.

Rauch, Rychetský, Hochel a Voldřich se zabývali hodnocením kvality masných výrobků. Vypracovali imunochemický postup pro stanovení histaminu, jehož hladiny jsou v korelaci s kvalitou potravin. Analýza je vysoce citlivá a specifická, je také jednoduchá a byla aplikována při hodnocení 30 druhů masných výrobků, ryb, sýra, vína a piva. Reologické chování masa popsali Pipek a Sinevič, kteří hodnotili vliv některých ukazatelů [teplota, obsah tuku, přísady soli, vody, doba nasolení] na reologické chování hrubě desintegrovaného masa a zjistili zásadní význam volné vody na sledované ukazatele. Budig popsal některé operace, které se osvědčily při zpracování masa v tropických podmínkách. Jedná se o sušení v předsoledném nebo předvařeném stavu a o uzení. Autor zdůraznil některé výhody těchto technologicky nenáročných operací. Praktické využití některých druhotných surovin drůbežářského průmyslu popisují Uherová, Buchtová a Michálek, kteří stanovili hladiny významných nutričních faktorů [vitamin A, thiamin, riboflavin, esenciální a neesenciální mastné kyseliny] ve vaječných skořápkách, kuřecích běhácích a kuřecí slezině. Navrhují některá nová využití těchto surovin u nás. Duda, Velíšek a Davídek analyzovali kolagenní želatinu získanou od zahraničních firem z hlediska charakteru obsaženého změkčovadla. Zjistili převážný podíl glycerinu a malé množství diethylen glykolu. V salámu baleném ve střevu obsahujícím diethylen glykol byla sledována migrace této látky do výrobku.

Lipidy z pohledu veterinárního hygienika hodnotili Hejlová a Vávrová, které se zabývaly změnami lipidů v produktech zemědělské velkovýroby a doporučují, aby byla v budoucnu analýza pomocí chemických a fyzikálně-chemických ukazatelů nahrazena nebo doplněna stanovením hygienické a v optimálním případě i biologické jakosti. Dudášová, Chorváthová a Grančičová upozornily na přímý vztah mezi hladinou cholesterolu v plazmě a aterosklerosou. Doporučují konzumaci sójových bílkovin. Na základě pokusů s dietami obsahujícími sójové bílkoviny a kasein prokázaly hypocholesterolemický účinek odtučněné sójové mouky u zvířat.

Význam výskytu stopových prvků v potravinách byl hodnocen v řadě referátů, v kterých se autoři zabývali hlavně negativním dopadem těchto prvků na kvalitu a hygienickou jakost potravinářských výrobků a dále na metody analýzy hladin stopových prvků v potravinách. Šebesta, Pavelka, Nápravník a Drápal popisují výsledky šetření, při němž ve velkém souboru okolo 3000 vzorků hodnotili hladiny kadmia, olova, mědi a zinku ve vzorcích masa, drůbeže, lovné zvěře, sýra apod. Uvádějí procento nadlimitních hladin uvedených prvků, které dosahují 2,8; 8; 4,8 a 13,6 % pro olovo, kadmium, měď a zinek.

Jedlička a Ptáček na základě analýz krmiv i masa skotu v oblasti zasažené exhalacími (Most, Teplice) ukazují na kontaminaci rtuť, kadmium, měď a zinek; nenalezli však, s jedinou výjimkou, výrazně zvýšené hladiny těchto prvků v masu. O významu chřomu ve výživě referoval Rut, který porovnal údaje o negativním a pozitivním vlivu tohoto kovu uváděné v literatuře. Zdůraznil význam jeho výskytu v biologicky účinné formě, kdy může působit příznivě na regulaci koncentrace krevního cukru. Koplík a Němcová popisují analýzu železa, mědi a zinku v sójových bobech a jejich distribuci v bílkovinných frakcích a lipidovém podílu. Tichá a Křečková porovnávaly hladiny olova, kadmia, mědi a zinku v cukru z různých závodů v ČSFR produkovaných v roce 1978 a 1989. V roce 1989 byly nalezeny nižší koncentrace olova a mědi a prakticky stejná koncentrace zinku. Byly získány údaje

o distribuci těžkých kovů v cukrovce během její vegetace a sklizně. Mirchí popsal stanovení olova v džusech metodou AAS, při níž použil přípravu vzorku kyselým rozkladem a na suché cestě a našel dobrou shodu obou operací. Výrobu hygienicky nezásadné a nutričně plnohodnotné zeleniny popisuje Heyduk, který zdůraznil, že není nutné jednostranně odmítat minerální hnojení a chemickou ochranu rostlin, že je však nesmírně důležité jejich šetrné užívání. Předpokládá to pečlivé monitorování vstupu cizorodých látek do prostředí a využití všech vědeckých poznatků o příпустných hladinách vedoucích k migraci ještě přístupných množství do plodin. Opátová, Čurda a Dobiáš se zabývali technologií konzervace ovocných polotovarů a sledovali hladiny kyseliny mravenčí v zelenině za použití kapilární isotachoforézy. Krausová a Pražák popisují stanovení SO_2 metodou FIA s malachitovou zelení v kombinaci s destilační jednotkou Kjeltec 1002. Štěpánková se zabývala sortimentem koření a kořenících přípravků, které jsou k dispozici pro průmyslovou výrobu koření a jejich analytickým hodnocením. Popsala kvalitativní hlediska aplikace jednotlivých typů přípravků (přírodní koření, emulze výtažků koření, výtažky koření na sypkých nosičích).

Hostin, Palo a Barešová popisují charakter a skladbu enzymového přípravku, který izolovali z povrchového mazu syra Niva. Získaný přípravek urychloval zrání syra až o 31 %.

Bartko informoval o principech funkce a příkladech použití analyzátoru Infratec 1225 a 1255, pracujícím v blízké infračervené oblasti v rozsahu 800–1100 nm, při analýze potravin zahrnující stanovení vlhkosti, bílkovin, tuku, vlákniny, škrobu, sacharidů, některých vitamínů a řady dalších látek v nejrůznějších potravinářských výrobcích, krmivech a zemědělských produktech. O metodě umožňující určit složení směsi bílkovin na základě analýz aminokyselin, dále určit nečistoty a aditiva v bílkovinných vzorcích referoval Knessel. Metoda je založena na předpokladu, že bílkoviny jsou charakterizovány aminokyselinovým složením a je proto velmi citlivá na přesnost stanovení aminokyselin. Aplikaci metody lineárního programování prezentovali Kopřiva a Kondelík. V závodě na výrobu tekutých detergentů využili simplexové metody lineárního programování k nalezení optimální skladby výroby při dodržení mezi daných požadavky trhu tak, aby poskytnuté devizové prostředky pro nákup surovin byly použity k dosažení maximálního maloobchodního obrátu.

Další práce byly převážně z oblasti aditivních látek a kontaminantů. Ondroušek, Kult, Špaček a Říhová se zabývali ve svém sdělení stanovením aditivních látek v konzervářských výrobcích pomocí HPLC. Sledovali čtyři látky, a to kyselinu benzoovou, kyselinu sorbovou, kyselinu mravenčí a Diaspon (sacharin). O významu netěkavých nitrosaminů v současném pivovarnictví v souvislostech s dusičnany a o postupu při jejich stanovení referovali Kellner, Čulík, Špinar a Frantík. Ledahudcová, Velíšek a Davídek seznámili přítomné s reakcemi chlorhydrinů glycerolu v hydrolyzátech bílkovin a se stanovením reakčních produktů. V práci byly studovány reakce 3-chlor-1,2-propandiolu s amoniakem. Bylo zjištěno, že při reakci vzniká 3-amino-1,2-propandiol. Byla vypracována metoda pro stanovení této látky v hydrolyzátech bílkovin. Na problematiku analýzy reziduí selektivních herbicidů na bázi fenoxylanových kyselin MCPA, 2,4-D, mecoprop a další, používaných proti dvouděložným plevelům, upozornili Hajšlová, Kocourek a Tahtah. V práci se zabývali možnostmi izolace a stanovení jak volných, tak i vázaných forem reziduí těchto herbicidů. Pentachlor patří mezi závažné kontaminanty životního prostředí, který s ohledem na svoji biologickou aktivitu může negativně ovlivňovat i některé fermentační procesy. Proto se studiem metabolických procesů vybraných kvasinek v přítomnosti pentachlorofenolu PCP zabývali Tahtah, Hajšlová, Demnerová a Kosinková. Prokázali, že dochází k výrazné kumulaci PCP a jeho reziduí v kvasničných buňkách a že přítomnost PCP se dále projevuje snížením produkce biomasy, ale i změnami v zastoupení některých složek. Studium reziduí herbicidů používaných při pěstování léčivých rostlin se věnovali Schultzová, Kovačičová, Tekeř a Kučerová. Za použitých experimentálních podmínek prokázali, že hladiny reziduí v čase sběru byly značně ovlivněny lokalitou, termínem ošetření, klimatickými podmínkami při ošetření a po něm a velikostí dávky přípravků. O růstovém regulátoru ze skupiny triazolových sloučenin — paclobutrazolu a o možnostech jeho stanovení informovala Schultzová. S vlastnostmi perspektivních insekticidů na bázi benzyльмоčoviny, možnostmi jejich stanovení a stanovení jejich degradačních produktů seznámili přítomné Tomšej, Hajšlová a Pudil. Vávrová a Pavlíček sledovali rezidua PCB ve vodních nádržích ČR a v rybách v nich chovaných. Na základě jimi zjištěného poměru mezi obsahem reziduí PCB ve vodách a v rybách lze z výše hladiny reziduí ve vodě určit pravděpodobnou koncentraci

či PCB v rybách. Holadová, Kocourek a Míšková studovali rezidua daminozidu (N,N-dimethylhydrazid kyseliny jantarové) v jablkách. Při skladování či zpracování kontaminovaného ovoce se může diaminozid rozkládat na karcinogenní N,N-dimethylhydrazin. Proto je reziduům daminozidu věnována zvýšená pozornost. Autoři v práci studovali využití plynové chromatografie pro stanovení daminozidu a kinetiku vzniku N,N-dimethylhydrazinu v modelových systémech. Na využití jednoduché rychlé metody — derivační spektrofotometrie v analytice některých složek potravin, zejména aditivních látek jako je sladidlo Acesulfam K, konzervační látka kyselina sorbová, přírodní látky kofein, thein a kyselina askorbová, upozornil Suha j. Hodnotil uvedenou metodu jako perspektivní při kvantifikaci potravinářských komponent. Aditivním látkám věnovala pozornost také Hamburg, která podala přehled přírodních barviv používaných v Estonsku.

Ing. Eva Davidková, CSc., ing. Marie Holasová, ing. Helena Pařízková

SEAFOOD: RESOURCE, NUTRITIONAL COMPOSITION, AND PRESERVATION

POTRAVINY MOŘSKÉHO PŮVODU: ZDROJE, SLOŽENÍ ŽIVIN A KONZERVACE

Z. E. Sikorski (Ed.)

Boca Raton, CRC Press 1990, s. VII + 248.

Potraviny získávané z moře se stávají stále více předmětem zájmu potravinářských odborníků, protože významně doplňují zdroje potravin pro rychle rostoucí obyvatelstvo naší planety. Navíc představují obohacení jídelníčku a patří k potravinovým materiálům s výhodným složením živin a s příznivým účinkem na inhibici chorob cévního oběhu. Do této skupiny potravinářských surovin patří nejen ryby, ale i paryby, mořští savci, měkkýši a koryši; potraviny rostlinného původu nejsou do knihy zahrnuty. Určitým problémem mořských živočichů je jejich specifická chuť a špatná skladovatelnost.

Technologie těchto produktů je složitá, protože je souborem aplikací biochemických, mikrobiologických, biologických, chemických a inženýrských poznatků směřujících k vysoké kvalitě a účinné konzervaci. Kvalita závisí ovšem také na surovině a způsobu lovu.

Nedostatek zdrojů mořských organismů si vynutil velké změny v jejich lovu, zpracování a využití a dokonce byl zaveden i chov mořských ryb a měkkýšů — tzv. akvakultura. V poslední době bylo zveřejněno mnoho nových poznatků, a proto je jejich souborné zpracování velmi důležité. Této práci se ujal přední světový odborník v chemii a technologii rybného průmyslu — prof. Sikorski z Vysoké školy technické v Gdaňsku, s řadou spolupracovníků z Polska a dalších pěti států. Předností knihy je, že zdůrazňuje právě moderní pojetí rybného průmyslu.

Úvod pochází od známého potravinářského vědce prof. D. J. Tilgnera. Kniha sestává z 13 krátkých kapitol. V první kapitole je podán přehled problematiky a velmi stručně i hlavní metody lovu. V další kapitole jsou popsány zdroje mořských živočichů a jejich dostupnost; zhodnocena je jejich využitelnost v potravinářství a význam ve výživě. Ve třetí kapitole se pojednává o složení a výživové hodnotě hlavních skupin mořských organismů používaných v potravinářském průmyslu a tato část je zvláště kvalitně sestavena. Důležitý je popis biochemických a mikrobiálních změn ulovených živočichů (4. kap.), kde se klade hlavní důraz na změny způsobené činností vlastních i mikrobiálních enzymů. Vzorně zpracovaná je pátá kapitola o přípravě úlovku pro konzum nebo pro další zpracování; jde hlavně o různé mechanické úpravy.

V dalších kapitolách, představujících zhruba polovinu rozsahu knihy, jsou popsány jednotlivé technologické procesy:

- a) chlazení (ledem i studenou vodou) a skladování chlazených výrobků;
- b) zmrazování a změny mrazírensky skladovaných výrobků;
- c) sušení s důrazem na kvalitu sušených výrobků a její změny během skladování;
- d) solení a nakládání (včetně výroby marinád);
- e) uzení, zahrnující i výrobu kouře a udicích přípravků;
- f) konzervace teplem, kde jsou podány i teoretické základy tepelné sterilace a dobře jsou popsány změny kvality způsobené záhřevem;
- g) technologie mletých rybích výrobků, kam patří i různé tradiční výrobky, např. japonské surimi.

Knihu uzavírá kapitola o sanitačních postupech v rybářském průmyslu, a to jak na lodích, tak i v závodech na pevnině.

Kniha je přehledně členěna, vědecky, ale přitom velmi jasně a srozumitelně psána, takže je přístupná i čtenářům, kteří se dosud touto problematikou nezabývali. I přes velkou stručnost textu nejsou žádné významné poznatky opomenuty. Zpracované údaje jsou opřeny o zkušenosti autorů i o obsáhlé literární citace a 545 uvedených odkazů představuje důležitý zdroj informací pro další studium. Kvalitně zpracovaný věcný rejstřík usnadňuje orientaci v knize.

Naše země sice nesousedí s mořem, ale přesto spotřeba mořských živočichů roste a další růst je žádoucí. K tomu přispěje i recenzovaná publikace, která bude užitečnou příručkou pro potravinářské chemiky, technology, rozvojové a výzkumné pracovníky, zaměstnance obchodu a kontroly i pro studenty.

Prof. Jan Pokorný, DrSc.

QUALITY ASSURANCE IN FOOD AND RELATED CONSUMER GOODS INDUSTRY

P. Molnár (Ed.)

ZABEZPEČOVÁNÍ KVALITY POTRAVIN A PŘÍBUZNÝCH SPOTŘEBITELSKÝCH VÝROBKŮ

Budapest, EOQ Food Section. 1990. 238 str.

Kniha je sborníkem referátů ze 4. semináře potravinářské sekce Evropské organizace pro kvalitu (European Organization for Quality), který se konal v Berlíně ve dnech 24.—27. 10. 1990. Semináře se zúčastnilo více než 100 odborníků ze 16 států (i mimo-evropských) a bylo na něm předneseno celkem 27 referátů (z toho 24 je ve sborníku uvedeno v plném znění).

Značnou část publikace tvoří obecné referáty o zjišťování a zabezpečování kvality potravinářských výrobků. Nejefektivnější metodou k dosažení dobré kvality je účinná prevence, která se neobejde bez rychlých a spolehlivých metod kontroly a statisticky vyhovujícího systému vzorkování, které bývá většinou větším zdrojem chyb než vlastní analýza. Neuspokojivé porozumění statistickým metodám je častou příčinou chybných závěrů (Barcos). Pro úspěšný marketing jsou důležitým faktorem stále rostoucí nároky na jakost, které se projevují chováním spotřebitelů při nákupu. Protože se spotřebitel setkává až s hotovým výrobkem, jeví se důležité formulovat nároky na zemědělské suroviny se zřetelem na jakost výrobku (Strecker). Zdravotní nezávadnost a výživová hodnota se zjišťují při expedici výrobku, ale je potřeba sledovat jejich změny až po prodej a konzum výrobku (Sturman). Při srovnání výrobků konvenčního a alternativního zemědělství je důležité cenové srovnání, které se uskutečňuje u vybraných potravin, ale celkové náklady se hodnotí srovnáním potravinových košů; při tomto srovnání vycházejí ceny u alternativních výrobků o 55 % vyšší (SRN) a při zahrnutí odlišných konzumních zvyklostí o 45 % vyšší (Karg a Steinel).

Celková kvalita výrobku se vypočte jako funkce jednotlivých jakostních ukazatelů s použitím příslušných koeficientů závažnosti (Geidel). Podle postupu nadace Warentest zahrnuje z celkového posudku 20 % dosažení legislativních požadavků, 15 % nezávadnost z hlediska chemické a 15 % z hlediska mikrobiální kontaminace, 20 % technologická jakost (chování při konečné úpravě ke konzumu) a 30 % senzorická jakost (Rehlenderová).

Kvalita potravin a léčiv záleží na jejich biologické hodnotě a její hodnocení má mnohé společné rysy, a to i z hlediska legislativního, ale u léčiv jsou přísnější požadavky na přesné dodržení výrobního postupu a vyžaduje se soubor přísnějších toxikologických zkoušek (Veress a Biacs). Suroviny pro potravinářský průmysl jsou přírodního původu s veškerými výhodami a nevýhodami; významné je hledisko surovinové čistoty a původnosti a stupeň kontaminace. Rozpor mezi variabilitou jakosti surovin a spotřebitelským požadavkem na konstantní jakost výrobku se musí řešit soustavnou kontrolou a přizpůsobením technologických podmínek a receptury v závislosti na výsledcích kontroly (Mick).

Obaly pro potravinářské výrobky se musejí řešit z hlediska ochrany před průnikem plynů, par a světla, dále z hlediska hygienické ochrany při transportu a skladování (Varsányi).

Moderní technologie umožňuje dosažení vyšší jakosti integrací systémů zabezpečení jakosti s výrobním procesem s použitím výpočetní techniky (Kochanová); vyžaduje to ovšem automatizovanou kontrolu jakosti a vypracování objektivního a racionálního řízení výroby z hlediska optimalizace jakosti.

Několik referátů se týkalo nutnosti přizpůsobit národní hlediska na jakost potravin požadavkům společného evropského trhu.

K nejvýznamnějším stránkám jakosti patří senzoriická jakost, pro jejíž hodnocení je významný pokrok v mezinárodní standardizaci metod hodnocení, školení hodnotitelů, odběru vzorků i v používání jednotné terminologie (Neumann). Pro hodnocení charakteru arómatu a chutě jsou důležité popisné metody, u nichž se pro sériovou analýzu zvláště osvědčila metoda zkrácených senzoriických profilů (Pokorný).

Značný podíl příspěvků je věnován vlivům chemického složení a mikroflóry na jakost různých druhů potravin, např. ovocných šťáv a jiných výrobků z ovoce a zeleniny, koření, sušeného mléka, těstovin a řady jiných výrobků.

Při nynějším přechodu naší potravinářské výroby do podmínek tržního hospodářství bude význam jakosti rychle stoupat a k jejímu dosažení může být uvedený sborník jistě našim potravinářským odborníkům účinnou pomocí.

Prof. Jan Pokorný, DrSc.

OBHÁJENÉ KANDIDÁTSKÉ DISERTACE

MELZUCH KAREL: *Využití imobilizovaných biologických systémů v lihovarství.* [Kandidátská disertace.] Praha 1989 — VŠCHT, katedra kvasné chemie a bioinženýrství. (Obhajoba 21. 6. 1989.)

Kandidátská disertační práce navazuje na výsledky obsáhlého výzkumu různých pracovišť zabývajících se intenzifikací lihového kvašení pomocí imobilizace kvasinkových buněk. Kandidát se zaměřil na dvě různé techniky: na metodu „entrapment“ do gelu alginátu vápenatého nebo carrageenanu a na zonální imobilizaci v bioreaktoru s externím membránovým modulem. Obě metody se vyznačují výhodou dosažení vysoké koncentrace kvasinkových buněk, což se při zachování jejich aktivity projeví vysokou produktivitou tvorby ethanolu.

Cílem práce bylo rozšířit stávající znalosti o chování imobilizovaných systémů na oblast aplikace v lihovarském průmyslu.

Všechny experimenty byly prováděny v laboratorním měřítku. Jsou charakterizovány základními bioinženýrskými parametry. Buňky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* imobilizované metodou „entrapment“ v gelové peletě alginátu vápenatého, příp. carrageenanu se ve stacionárních podmínkách kontinuální kultivace vyznačují stabilním chováním i po 400 hodinách fermentace. Jejich aktivita po skladování při teplotě 4°C ve vodě se příliš nemění ani po jednom roce. Je-li použito melasové médium, je nutné provádět jeho předúpravu, např. čiřením. Přitom lze dlouhodobě dosahovat vysoké produktivity tvorby ethanolu (10 až 30 g/h na 1 litr objemu fermentoru). Metodou rastrovací elektronové mikroskopie byly sledovány povrchové a lomové struktury pelet a morfologie buněk.

Druhá metoda spočívala na využití membránového bioreaktoru skládajícího se z kontinuálního reaktoru spojeného s tubulárním mikrofiltračním modulem, který pracoval s úplným recyklem buněk. Koncentrace biomasy ve fermentoru dosahovala hodnoty od 10 do 60 g/l v závislosti na fermentačních podmínkách. Byly stanoveny optimální parametry pro provoz reaktoru. Teoretické studium bylo zaměřeno na oblast vlivu koncentrace biomasy na „maintenance“ požadavky buněk. I přes to, že pro buňky je systém uzavřený, dochází ke stacionárnímu stavu populace.

Oba použité systémy jsou v závěru porovnány a jsou diskutovány jejich klady a záporny se zaměřením na aplikaci ve větším měřítku.

VANČURA ALEŠ: *Biogeneze a studium faktorů produkce biologicky aktivních látek.* [Kandidátská disertace.] Praha 1989. — VŠCHT, katedra kvasné chemie a bioinženýrství. (Obhajoba 22. 6. 1989.)

Regulace syntézy primárního metabolitu, jako prekurzoru sekundárního metabolismu může velmi efektivním způsobem ovlivnit nadprodukcí sekundárního metabolismu. Disertační práce se zabývá vztahem mezi primárním a sekundárním metabolismem u *Streptomyces fradiae*, producenta makrolidového antibiotika tylosinu. Stavební podjednotky tylosinu vznikajícího v drahách primárního metabolismu jsou odvozeny z molekul acetátu, propionátu a butyrátu. Cílem disertační práce bylo studium regulace syntézy a problematika dosažení nadprodukcí tylosinu. Vzhledem k význačné regulační roli valindehydrogenasy, jež byla u *Streptomyces fradiae* detekována, byla část práce věnována rovněž purifikaci a podrobné charakterizaci tohoto enzymu a dalších dvou NAD(P)⁺-dependentních dehydrogenas L-aminokyselin. Inhibice syntézy tylosinu a větvených mastných kyselin amonnými ionty byla studována v souvislosti s mechanismem jejich utilizace, tj. regulací exprese glutaminsyntetasy, glutamát syntasy, alanindehydrogenasy, glutamátdehydrogenasy a valindehydrogenasy. U 16 kmenů *S. fradiae* produkujících tylosin byla zjištěna významná souvislost mezi intracelulární hladinou valindehydrogenasy a produkcí tylosinu. Byla vypracována purifikační metoda pro valin-, alanin- a glutamátdehydrogenasu. Syntéza tylosinu a větvených

máстных kyselin je u *Streptomyces fradiae* reprimována zvýšenou koncentrací amoných iontů v médiu.

Za prioritní lze označit výsledky popisující regulaci valin-isoleucinové biosyntetické dráhy u vysokoprodukčních mutantů *Streptomyces fradiae*. Syntéza valinu a isoleucinu je u těchto kmenů řízena na úrovni syntézy threonindehydratasy a syntasy acetoxykyselin, což nebylo doposud u jiného mikroorganismu popsáno.

Práce dokumentuje úzký vztah mezi primárním metabolismem a produkcí tylosinu a ukazuje, že cílenými zásahy do primárního metabolismu lze získat kmeny výhodnější pro průmyslovou výrobu sekundárních metabolitů.

DOBRÁNSKÝ TOMÁŠ: *Produkce peroxidasy kulturami rostlinných buněk*. [Kandidátská disertace.] Praha 1989. — VŠCHT, FPBT. [Obhajoba 16. 1. 1990.]

Cílem kandidátské disertační práce bylo vypracovat postup izolace a purifikace peroxidasy jak z nativní křenové kultury, tak i z explantátů; určit spektrum isoenzymů v obou purifikovaných preparátech a jejich podíl na celkové peroxidasové aktivitě; prověřit možnosti produkce a podmínky kultivace u dalších explantátových kultur.

Izolační postup křenové peroxidasy (z nativní i explantátové kultury) se skládal z pěti kroků (dialýzy, autofokusace, refokusace, gelové chromatografie a izoelektrické fokusace). Tímto způsobem byl enzym z explantátové kultury přečištěn 15krát a získaný purifikovaný preparát vykazoval celkovou a specifickou aktivitu 167,6 μ kat, resp. 11,2 μ kat na mg bílkovin s výtěžností 80 %. Elektroforeticky bylo identifikováno pět isoenzymů a izoelektrickou fokusací byly určeny jejich izoelektrické body a procentuální zastoupení v hodnotě celkové aktivity. Optimální pH směsi všech isoenzymů bylo 6,2 a optimální teplota 22 °C.

Z nativní kultury křene byl získán 14krát přečištěný enzymový preparát s celkovou a specifickou aktivitou 796 μ kat, resp. 7,3 μ kat na mg bílkovin. Elektroforeticky bylo identifikováno izoelektrickou fokusací sedm isoenzymů. U všech získaných isoenzymů byl určen jejich izoelektrický bod a procentuální zastoupení v hodnotě celkové aktivity. Optimální pH směsi bylo 5,8 a optimální teplota 28 °C.

Dosažené výsledky ukazují na možnost využití peroxidasy z explantátových kultur místo z nativního křenu, s výhodou možnosti kontinuální přípravy. Při kultivaci křenového explantátu na tuhém a tekutém médiu stejného složení byly výtěžky enzymu téměř identické. Produkce peroxidasy byla kromě křenu testována ještě na šesti dalších rostlinných explantátech.

**Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7, 120 56 Praha 6**

Výpočetní středisko ÚVTIZ, které je vybaveno počítačem 3,5 generace, operačním systémem VM, OS databázovými systémy DIALOG-2 (STAIRS), SUBDON (ADABAS) a komunikačním softwarem, nabízí tyto služby:

PŘÍSTUP DO DOKUMENTOGRAFICKÝCH BÁZÍ DAT

- AGRIS — mezinárodní informační systém pro zemědělskou vědu a techniku (angličtina, retrospektiva od roku 1984)
- AGROINDEX — národní informační zemědělský systém (čeština, retrospektiva 10 let)

Obě báze dat jsou vystavovány v dialogovém režimu jak z lokálních, tak i vzdálených terminálů kompatibilních s řadami IBM mikropočítačů a osobních počítačů řady IBM XT/AT.

**PRONÁJEM STROJOVÉHO ČASU POČÍTAČE S VYUŽITÍM HARDWAROVÝCH
I SOFTWAREVÝCH PROSTŘEDKŮ VÝPOČETNÍHO STŘEDISKA**

**TVORBA A VYSTAVOVÁNÍ DATOVÝCH BÁZÍ S LIBOVOLNÝM ZAMĚŘENÍM
PODLE ZADÁNÍ**

TISK ČESKÝCH TEXTŮ NA RYCHLOTISKÁRNĚ BASF

Bližší informace na tel. 25 21 08

CONTENTS

Fukal L.: A combination of rapid solid-phase extraction and immunomethod used for assays of very low concentrations of aflatoxin M ₁ in milk	7
Rauch P., Rychetský P., Hochel I., Voldřich M., Bílek R., Guesdon J.-L.: Enzyme immuno assay of histamine in edibles	16
Brát J., Hauer E., Marr R., Hartl J.: The use of reactive extraction for gaining lactic acid out of fermentation culture medium	21
Vrbová E., Marek M., Kleidus B.: Enzyme electrodes for L-lactate determination	32
Pípek P., Sinevič V.: Changes of rheological properties of meat in dependence on comminution degree and external conditions	43
Loučka M., Vinklárková M.: Optimization of the processes of continuous sterilization and pasteurization	53
Ostrý V., Ruprich J., Knesel L., Polster M.: Verification of toxigenicity of the <i>Penicillium camemberti</i> strains: determination of cyclopiazonic acid	63

INHALT

Fukal L.: Die Kombination rascher Extraktion auf fester Phase und Immunomethode bei der Festlegung der sehr niedrigen Konzentration von Aflatoxin M ₁ in der Milch	7
Rauch P., Rychetský P., Hochel I., Voldřich M., Bílek R., Guesdon J.-L.: Enzymimmunoanalyse des Histamins in Nahrungsmitteln	16
Brát J., Hauer E., Marr R., Hartl J.: Ausnutzung der reaktiven Extraktion bei der Milchsäuregewinnung aus dem Fermentationsbouillon	22
Vrbová E., Marek M., Kleidus B.: Enzymelektrode für die Bestimmung von L-Laktat	32
Pípek P., Sinevič V.: Veränderungen des rheologischen Verhalten des Fleisches in Abhängigkeit von dem Desintegrationsgrad und von den Aussenbedingungen	44
Loučka M., Vinklárková M.: Optimierung des Prozesses der kontinuierlichen Sterilisation und Pasteurisation	53
Ostrý V., Ruprich J., Knesel L., Polster M.: Testen der Toxinogenität von den Stämmen <i>Penicillium camemberti</i> : die Bestimmung der Cyclopiazonsäure	63

Rukopisy odevzdány k tisku 9. 11. 1990 — Podepsáno k tisku 7. 2. 1991
Vědecký časopis POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY • Vydává Československá akademie země-
dělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází ve 4 číslech
ročně • Redaktorka RNDr. Marcela Braunová • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7,
telefon 25 10 98 • Vytiskly OSTRAVSKÉ TISKÁRNY, s. p., provoz 21, Ostrava 1, Noví-
nářská 7 • © Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1991

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace
PNS, pošta, doručovatel a PNS — ÚED Praha, závod 01 — AOT, Kovpakova 26, 160 00
Praha 6; PNS — ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 656 07 Brno; PNS — ÚED Pra-
ha, závod 03, Gottwaldova tř. 206, 709 90 Ostrava 9. Objednávky do zahraničí vyřizuje
PNS — ústřední expedice a dovoz tisku Praha, závod 01, administrace vývozu tisku,
Kovpakova 26, 160 00 Praha 6