



Potravinářské vědy

**Věnováno 40. výročí
fakulty potravinářské a biochemické
technologie VŠCHT v Praze**

**Dedicated to the 40th Anniversary
of the Faculty of Food
and Biochemical Technology, Prague**

3

**ČÍSLO 10
ROK 1992
ISSN 0232-0568**

**AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD ČSFR
ÚSTAV VĚDEKOTECHNICKÝCH
INFORMACÍ**

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 Kovář, 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 - CONTENT

P o k o r n ý J.: 40th Anniversary of the Faculty of Food and Biochemical Technology in Prague, Czechoslovakia - 40. výročí fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze	161
K a d l e c P.: Potravinářský a biochemický výzkum na fakultě potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze - Food and biochemical research at the Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague	163
B u b n í k Z., K a d l e c P.: Effect of dextran and invert sugar on sucrose crystal shape - Vliv dextranu a invertního cukru na tvar krystalu sacharosu	167
M e l z o c h K., R y c h t e r a M., H á b o v á V.: Properties and behaviour of immobilized yeast cells employed for ethanol fermentation - Vlastnosti a chování imobilizovaných kvasničných buněk používaných pro ethalonovou fermentaci	179
V o l d ř i c h M., D o b i á š J., S l a v í č k o v á A., C a u d r o v á J.: Determination of molecular weight of pectin preparations - Stanovení molekulové hmotnosti pektinových preparátů	239
Č u r d a D., D o b i á š J., Ž á k o v á P.: Texture of canned apricots - Textura sterilovaných meruněk	199
K o u ř i m s k á - K o n í ř o v á L., P o k o r n ý J., V e l í š e k J.: Effect of pre-frying on sensory characteristic of french fries - Vliv před smažení na vlastnosti smažených bramborových hranolků	209
F i l i p V., F o r m a n L., Š t e r n P., S v o b o d a Z.: Konzistenční vlastnosti modifikovaných másel - Properties of consistency of modified butters	215
V e l í š e k J., D a v í d e k T., P u d í l F., D a v í d e k J., L e d a h u d c o v á K., D o l e ž a l M.: Nové lipidy v potravinářských hydrolyzátech bílkovin - New lipids in food protein hydrolysates	225
M o r a v c o v á J., S t a n ě k J., M í l o v á B., J a r ý J.: Stanovení 4-methylimidazolu v kuléru - Determination of 4-Methylimidazole in Caramel Colours	233
S c h u l z o v á V., H a j š l o v á J., H o l a d o v á K., R o z t o č í l T.: Stanovení reziduí růstového regulátoru paclobutrazolu v rostlinném materiálu - The determination of residues of growth regulator paclobutrazol in plant material	239

AKTUALITY - TOPICAL

H a j š l o v á J.: Aktuální pohledy na některé rizikové faktory výživy - Topical views on some risk factors of nutrition	251
---	-----

INFORMACE - INFORMATION

K á š J.: Collaboration with the City College of the City University of New York (CCNY) - Spolupráce s City Univerzitou (City College) v New Yorku	255
--	-----

40th ANNIVERSARY
of the FACULTY of FOOD and BIOCHEMICAL TECHNOLOGY
in PRAGUE, CZECHOSLOVAKIA

The education of food technologists and food scientists did not begin 40 years ago. Two hundred years ago, the first study programme in technical chemistry in the world began in the Royal Czech Technical School in Prague. The second teacher in chemistry, Professor Steinmann included in the programme courses on plant and animal substances yet in 1817, and practical courses comprised agricultural chemistry, fermentation chemistry and technologies of beer, vinegar and spirit production. Another professor, K. N. Balling was a prominent scientist both in sugar and fermentation chemistry. In this time, the school was named the Polytechnical Institute of the Czech Kingdom. In 1855, Balling founded the Agricultural Chemical Station as a part of the School.

In the second half of the last century, several important food scientists gave lectures on food technology - Prof. Staněk on sugar technology. Prof. Bělohoubek on brewing technology (he founded a special school for brewers), and Prof. Preis and Prof. Andrlík on sugar technology.

After the First World War, the Czech Polytechnics has been established, and the School of Chemical Engineering (essentially, chemical technology and analytical chemistry) became a part of the polytechnics, where programmes of fermentation chemistry and technology, sugar technology, and food quality assessment were founded for the education of food technologists. Prof. Hanuš (food analysis) and Prof. Votoček (sugar chemistry) were scientists of international importance. Food science was included in the programme of the polytechnics in Brno, where Prof. Veselý launched a programme of fats and oils science. Programmes for the education of food technologists were started on Agricultural Colleges as well, e. g. on dairy chemistry (Prof. Laxa).

After the Second World War, a great need for graduated food scientists stimulated the foundation of an independent Faculty of Food Technology. The Faculty became a part of the new School of Chemical Technology which was

separated from the Czech Polytechnics. The first name of the faculty was Faculty of Food Technology, with a strong chemical and physical backgrounds.

In 1952, 40 years ago, Prof. J. Dyr, specialized in fermentation technologies, was appointed as the first Dean of the Faculty. Other professors previously being active in Prague, taught at the new Faculty, i. e. Prof. Š a n d e r a in the Department of Sugar Chemistry and Technology, Prof. J a n í č e k in Food Chemistry, and Prof. H a m p l in Microbiology. Prof. S l a v í č e k, a sugar chemist (later giving lectures in physics and computer science) came from the Moravian Polytechnics in Brno. Several professors came from School of Agriculture, Prof. P r o k š (dairy technology), Prof. K y z l i n g (preservation technology) came from Brno, and Prof. Z e l e n k a (starch technology) from Nitra. Dr. L á t gave lectures on meat technology, and Prof. L o m on the economics of food industry. Many new young assistant professors joined the Faculty, and the number of students has since then steadily increased.

The growing importance of biotechnology resulted in the introduction of several new courses on biotechnology, some of them on non-food applications, and therefore, the name of the Faculty was changed to the Faculty of Food and Biochemical Technology (in 1969). In 1965 the Faculty moved to another building located within the Czech Technical University Campus.

Now the Faculty offers the following education programmes:

- 1. Food Chemistry and Analysis*
- 2. Chemistry of Natural Substances*
- 3. Enzymic Engineering*
- 4. Biomedical Engineering*
- 5. Fermentation Chemistry and Bioengineering*
- 6. Carbohydrate Chemistry and Technology*
- 7. Milk and Fat Technology*
- 8. Meat and Preservation Technology.*

The number of students is nearly 1,000, and the interest is now growing. We hope that the 40th anniversary of the Faculty would be the stimulus for further development

*Prof. Dr. Jan P o k o r n ý,
Dean of the Faculty*

FOOD and BIOCHEMICAL RESEARCH

**at the FACULTY of FOOD and BIOCHEMICAL TECHNOLOGY,
INSTITUTE of CHEMICAL TECHNOLOGY, PRAGUE**

There is a general trend of food science in the nearest future to look for the projects and their solutions in the nutrition policies bringing radical improvement in the health of world population. The same trend is pronounced in our country as well. Under the present transformation of the central planned economy into the market oriented economy, rapid privatization of the food industry, and the introduction of foreign capital, intentions of the food research may be defined as follow:

- *to increase the hygienic value and the safety of food products,*
- *to decrease production costs and the input of energy,*
- *to increase utilization of the production equipment, especially the machinery,*
- *minimize the contamination from agriculture and food processing in order to improve the ecologic situation.*

Requirements to produce foodstuffs of high quality and of relatively low price cannot be fulfilled without close cooperation between agricultural production, processing industry, and distribution, i. e. the food chain from the field to the consumer.

Projects of food and biochemical research at various Departments of the Faculty can be divided into five areas as follows:

- *food raw materials and wastes,*
- *optimization of processing technologies,*
- *quality of food products,*
- *application of biotechnology in food industry and ecology,*
- *chemistry of natural substances.*

They are reviewed in more detail in the following text.

1. Food Raw Materials and Wastes

- rationalization of the utilization of raw materials and wastes in the brewing industry aimed at improving the product quality and the ecology of beer production,

- enzymic activities during the pre-harvest period, and post-harvest changes of plant raw materials,

- evaluation of the technological quality of sugar beet,

- isolation of substances from products and wastes of the sugar industry,

- standardization of flour characteristics from the viewpoint of the biologically active component contents,

- degradation of steroid glycoalkaloids in food raw materials and products,

- macromolecular components of fruits and vegetables with respect to their optimal applications,

- natural food additives,

- lactic fermentation in the processing of fruits and vegetables.

2. Optimization of Processing Technologies

- optimization of discontinuous fermentation processes,

- modelling of the sucrose crystallization,

- optimization of technological processes in the production of fats and oils,

- changes of triacylglycerols in the process of hydrogenation,

- effect of the temperature and time of heating on selected quality characteristics of canned products,

- theory of heat transport and kinetics of thermoinactivation processes during sterilization of packed food products,

- thermostability of packaging for the microwave heating, and safety aspects of food packaging.

3. Quality of Food Products

- chemical changes in food materials during the processing and storage, and their effect on the nutritional and sensory quality, and on the safety, with

particular emphasis on the processes of autoxidation and enzymic oxidation, non-enzymic browning, hydrolytical reactions, and degradation of natural toxic substances,

- effect of environmental contamination on the hygienic and toxicological quality of food,

- effect of technologic and organoleptic properties of animal food products during the storage,

- application of capillary isotachophoresis in the analytical control of starch production,

- maturation of some selected types of cheeses,

- nutritional and technologic properties of milk fat, effect of feed on the composition of lipid fraction of milk.

4 . Application of Biotechnology in Food Industry and Ecology

- production and utilization of ethanol,

- interaction of cellular population with toxic substrates,

- behaviour of microbial cells under stress conditions,

- enzymes in food industry and ecology,

- development of microbial systems and plant cells,

- bioanalytical methods,

- selection of microbial strains capable of biodegradation of main organic contaminants, and the application in the protection of food chains,

*- genetic control of the thiamin excretion in *S. cerevisiae* mutants,*

- enzymic hydrolysis of starch,

- pure microbial cultures for the food industry,

- application of biocatalysis in the organic synthesis.

5 . Chemistry of Natural Substances

- chemistry of sucrose,

- deoxypentoses,

- aminodeoxy- and azidodeoxy derivatives of hexoses and their chelating activities,

- *composition and properties of nystatin,*
- *synthesis of compounds inhibiting the formation of leukotrienes,*
- *partial acetylation of xylopyranosides,*
- *hydrophilization of monoacylglycerols, synthesis, characteristics, and applications as potential food emulsifiers.*

The common principle in all the above areas of research is the environmental concern, which is emphasized in the industrial application. In the research, graduate students (working for their Ph. D.) in their dissertations, and students working for their M. Sc. in their diploma works, co-operate with teams of teachers; undergraduate students are involved as well.

Great advantage of the Faculty of Food and Biochemical Technology consist in the fact that it is a complex university institute where the pedagogical activities are combined with scientific research, and that the activities in all areas of food science, biochemistry, microbiology and technology are in close co-operation with those of other faculties of the Institute of Chemical Technology (Faculty of Chemical Technology, Faculty of Chemical Engineering, and Faculty of Environmental Technology), with research institutes of the Academy of Sciences (especially, Institute of Theory of Chemical Technique, Institute of Microbiology, and Institute of Organic Chemistry and Biochemistry), with applied Food Research Institute (Institute of Food Research, institutes of various branches of the food industry), with control laboratories, and with food industry production plants.

Results of the basic research on the Faculty enable for the Faculty members to take active part in the applied research, and numerous practical projects for various food organizations, manufacturing companies, factories, control laboratories, and other institutions of food industry.

In the last two years, international relations of the Faculty have grown in their intensity, especially their participation in various programmes of the European Community. This development has favourable effect on the knowledge, experience, and personal contacts of students and faculty members, and thus on their subsequent activities in the industry, analytical laboratories, and research both in Czechoslovakia and in the common European market.

Prof. Pavel Kadlec, Ph.D., D.Sc.

EFFECT OF DEXTRAN AND INVERT SUGAR ON SUCROSE CRYSTAL SHAPE

Zdeněk BUBNÍK, Pavel KADLEC

*Institute of Chemical Technology - Department of Carbohydrate Chemistry
and Technology, Technická 5, CS-166 28 Praha 6, Czechoslovakia*

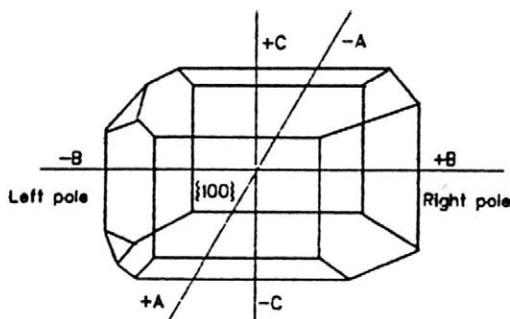
From previous experiments (Mantovani et al., 1991; Bubník et al., 1991) although it is known that oligosaccharides are involved in sucrose crystal elongation along the c-axis in cane sugar processing, we have related such elongation in A, B and C magmas, to the presence of dextran, glucose and fructose. In order to make the observed effects independent of the presence of other impurities in the growth syrup, we have carried out a series of laboratory experiments on artificially-prepared sucrose solutions where crystals were grown in the presence of different percentages of the three above-mentioned impurities. Observations under the microscope allowed us to confirm findings with industrial syrups and to experimentally verify the interference occurring among the three impurities. The elongation along the c-axis and the morphology modifications depended upon the relative percentages of these. The different results obtained which depend upon the differing amounts of the impurities involved and consequently on their variable interactions with each other, explain the disparity of often quite contrasting experimental data which can be found in the literature, in particular as far as the dextrans are concerned.

sucrose crystal; sucrose crystal shape; crystal elongation; crystal morphology and modifications; crystal forms and faces; dextran; invert sugar

Sucrose crystals are monoclinic and polar crystals occurring in a wide variety of shapes due to different combinations of forms (pair of like faces). The typical sucrose crystal is depicted in the Fig. 1. The occurrence and size development of the particular forms depend on conditions during nucleation and growth of the crystals, especially on the presence of various impurities in mother syrup.

The elongation along the c-axis of sucrose crystals originating from sugar cane processing has always been a significant problem and has attracted the attention of many authors (Symthe, 1971; Mantovani et al., 1991; Bubník et al., 1991). Such elongation has been found to occur not only in sugar cane factories but also in cane sugar refineries. This elongation obviously must be ascribed to the presence of particular impurities which, by modifying the growth rate ratios of the different crystal faces, can cause these remarkable

1. Typical sucrose crystal



morphological modifications. However, contrary to what has been found with beet sugar crystal elongation, which is universally attributed to the presence of raffinose, the conclusions drawn by various authors with regard to cane sugars show only partial agreement or even differing results.

Oligosaccharides and dextrans are the impurities which have been the most studied but it is possible to find controversial literature data on their effects, especially with investigations carried out on factory syrups. A careful study of the morphology of crystals present in a cane sugar factory's A, B and C magmas (Vaccari et al., 1990) allowed to point out, not only an elongation along c-axis, but also an unusual morphology which was mainly related to C magmas, i. e. disappearance of the small faces on the left pole and the appearance of the less common faces on the right pole promoted the growth of crystals showing a peculiar D shape.

The cause of such a phenomenon was ascribed to the presence of glucose and fructose by Vaccari et al. (1991), because the former promotes the disappearance of the small faces on the left pole whilst the latter causes the appearance of the small faces on the right pole.

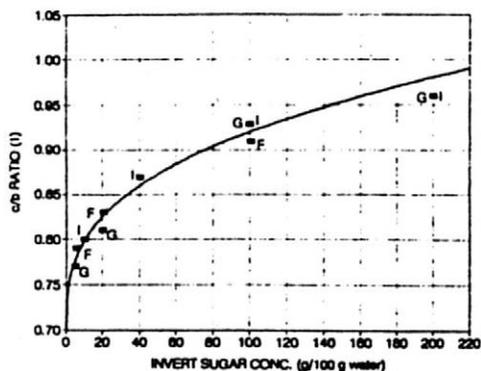
Bearing in mind that these two sugars, together with dextrans, make up the main impurities present in cane sugar factory magmas, Mantovani et al. (1991) have taken into consideration the possibility of correlation between their presence and the elongation of sucrose crystals along the c-axis. The results they have obtained (Mantovani et al., 1991) show a negative correlation, in particular for glucose and fructose, thus they have assumed a negative synergistic influence on the reciprocal effect of the three impurities. In other words, each impurity tends to hinder the effect of the other two. Of course, such a hypothesis required confirmation under laboratory conditions, bearing in mind that other impurities present in the magmas can themselves exert remarkable influences.

MATERIAL and METHODS

Crystallization experiments were carried out in pure sucrose solutions and in the presence of glucose, fructose and dextran either separately or as binary and ternary systems. Concentration levels were within the ranges found for industrial magmas. In particular, glucose and fructose concentrations reached 200 g per 100 g of water where as a maximum of 50 g per 100 g of water was used for dextran, which had an average molecular weight around 87,000 g/mol.

The crystallization tests were performed by the cooling crystallization technique. A fixed amount of seed was added to the various sucrose solutions, both pure and in the presence of the named impurities and having supersaturation of about 1.05 at 80 °C. Then, the temperature was progressively decreased at a rate of about 3 °C per hour for pure solutions or those containing low levels of the impurities, and at a rate of 0.5 °C per hour for the most impure systems. Samples of the artificial magmas, which were stirred to avoid settling out, were taken when the temperature fell to between 60 °C and 40 °C, and examined microscopically after dispersion in a saturated sucrose solution at room temperature in order to determine the c/b ratios of the crystals. Between 60 and 120 crystals were so measured for each crystallization test.

Calculations of the approximate supersaturation in the presence of the various impurities were made using the literature sucrose solubility data for glucose and fructose (H o n i g , 1963) and assuming that the effect of dextran was comparable to that exerted by invert sugar. Because the adopted literature data covered only a limited solubility range, we also employed the experimental data obtained by B u b n í k and K a d l e c (1988) for impure sucrose solutions. Of course, these solubility data, bearing in mind what has been stated above, were only approximate, although they were sufficiently precise for our purposes of avoiding either marked nucleation phenomena on the one hand or seed dissolution on the other.



2. Variation of sucrose crystal c/b ratios as function of glucose, fructose and invert sugar concentrations (g per 100 g water) in artificial magmas

Coefficients of variation of measurements made on anyone crystal crop varied from 5.7 % to 13.4 %. The lowest values were obtained with pure solutions and the highest came from solutions containing the highest concentrations of dextran. Fig. 2 shows the c/b ratio data of crystals obtained from sucrose solutions containing increasing amounts of glucose, fructose and invert sugar (equal amounts of glucose and fructose).

It can be seen that glucose and fructose and consequently invert sugar show comparable effects on the elongation of crystals, the c/b ratio of which, in the presence of the highest concentration of these impurities, increases by about 40 % in comparison with the c/b ratio of crystals from pure solution.

The curve in Fig. 2 is based on the equation:

$$R_i = R_s + 0.44 \cdot c_i^{0.350} \quad [1]$$

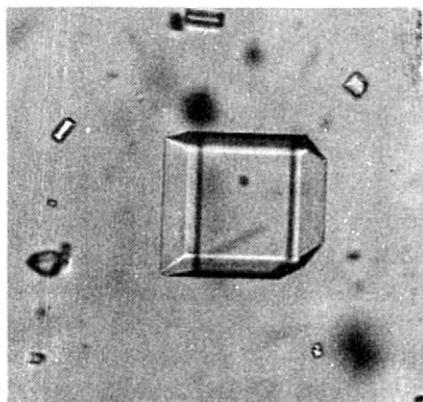
where: R_i - c/b ratio in the presence of glucose, fructose and invert sugar

R_s - c/b ratio for pure sucrose solution ($R_s = 0.70$)

c_i - glucose, fructose or invert sugar concentration

The differences between experimental data and data calculated from equation [1] ranged between -0.03 to +0.01 which corresponded to percentage differences in the increase of the experimental and calculated c/b ratios of between -4.0 and +2 %. Such differences are obviously smaller than coefficients of variation of measurements made on the same crop. Fig. 3 shows a sucrose crystal grown in the presence of invert sugar.

The variation of the c/b ratio as a function of increasing concentrations of dextran is shown in Fig. 4. It can be seen here that the effect of dextran on crystal elongation



3. Sucrose crystal grown in the presence of invert sugar (100 g invert per 100 g water; i. e. 50 g glucose per 100 g water and 50 g fructose per 100 g water)

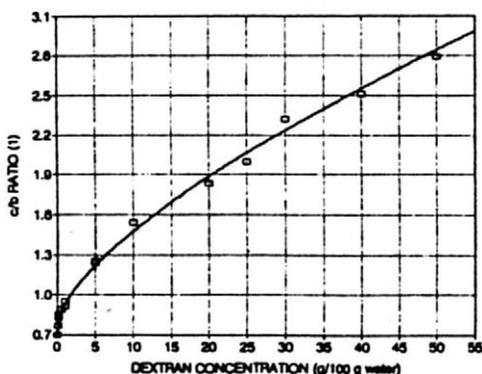
is much more striking when compared with that obtained with invert sugar and 300 % higher than for pure solution, at the highest impurity concentration.

The curve in Fig. 4 is based on the equation:

$$R_d = R_s + 0.101 \cdot c_d^{0.1} + 0.129 \cdot c_d^{0.7} \quad [2]$$

where: R_d - c/b ratio in the presence of dextran
 c_d - dextran concentration

The differences between experimental data calculated from equation [2] ranged from -0.06 to +0.09 which corresponded to percentage differences in the increase of the experimental and calculated c/b ratios of between -9 and +13 %. Again, in this case the differences are less than the coefficients of variation of measurements carried out on the same crop. Figs. 5 and 6 show sucrose crystals grown in the presence of dextran, thus demonstrating the striking differences in dextran and invert sugar effects on c/b ratios (Fig. 3).



4. Variation of sucrose crystal c/b ratios as function of dextran concentrations (g per 100 g water) in artificial magmas

For the ternary system, glucose, fructose and dextran it was possible to calculate a two-parameter function which would permit calculation of the c/b ratio as the function of both invert sugar and dextran concentrations:

$$R = R_i + K_1 \cdot c_i^{0.1} + K_2 \cdot c_d^{0.7} \quad [3]$$

where: R - c/b ratio in the presence of impurities

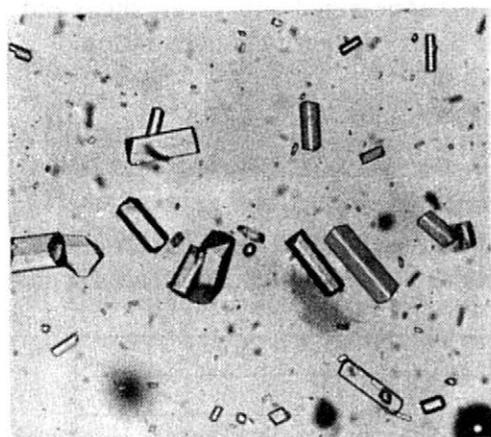
R_i - c/b ratio in the presence of invert sugar according to equation [1]

K_1, K_2 - coefficients dependent on the invert sugar concentration c_i :

$$K_1 = 0.101 + 0.108 \cdot c_i^{0.1} - 0.00165 \cdot c_i^{0.7} \quad [4]$$

$$K_2 = 0.129 - 0.0144 \cdot c_i^{0.277} \quad [5]$$

Obviously, if the dextran concentration is zero, equation [3] becomes equation [1], and if the invert sugar concentration is zero, equation [3] becomes equation [2]. The differences between experimental data and data calculated from equation [3] ranged from -0.11 to +0.14 which corresponded to percentage



5. Sucrose crystals grown in the presence of dextran (30 g dextran per 100 g water)



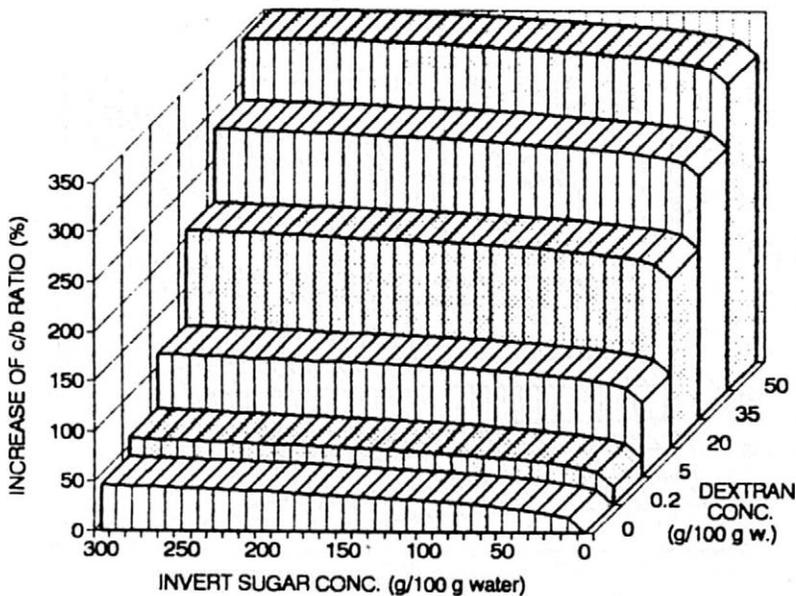
6. One of the crystal shown in Fig. 5

differences in the increase of the experimental and calculated c/b ratios varying between -8.2 % and +6.4 %. Once more the differences are lower than the coefficients of variation of the measurements carried out on the same crop.

DISCUSSION

Fig. 2 clearly emphasizes that the increase of the c/b ratio with glucose, fructose and invert increases being equal, is more noticeable at low concentration of these impurities. This fact could be explained as an inhibition exerted by the impurity on itself when its concentration reaches sufficiently high values. A possible explanation of this phenomenon, which needs suitable confirmation, could be based on association, and subsequent auto-inhibition, phenomena among the monosaccharides molecules when their concentration becomes particularly high.

In Fig. 4 shows that the increase of c/b ratio caused by the presence of dextran is more evident than that caused in the presence of the monosaccharides. Even in this case, although it is less clear than in the presence of the monosaccharides, the increase of c/b is more evident at low impurity concentration with equal increases of dextran concentration. The association phenomena mentioned above could also be taken into account for dextran. Considering the combined effect of dextran and invert sugar, we have plotted in Fig. 7 the theoretical trend which could occur if the impurity effects were purely additive, as can be

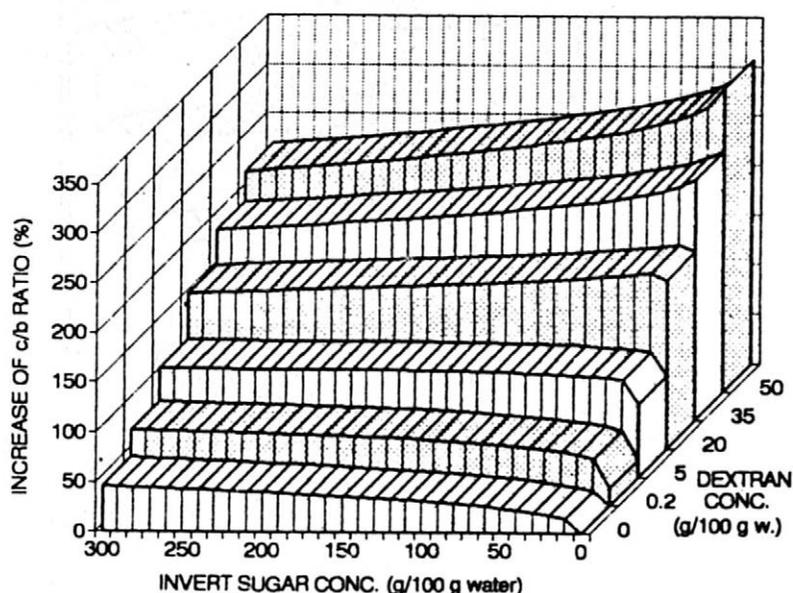


7. Theoretical variation of c/b ratios, corresponding to different concentrations of dextran and invert sugar, obtained assuming a purely additive effect on the elongations separately promoted by dextran and by invert sugar

calculated by summing the effects shown in Figs. 2 and 4. Fig. 8, which gives the experimental data, clearly demonstrates that, as the impurity concentrations increase, the additive effect moves away from the theoretical values.

In particular we can observe that, at sufficiently high dextran concentrations, an invert sugar concentration increase promotes a progressive decrease of the c/b value compared with the solution containing only dextran. At low dextran concentrations, a progressive increase of the invert sugar concentration at first causes an increase of the c/b value above the theoretical value but this is progressively nullified.

These points are clearly emphasized in Table I which shows the percentage differences between experimental and theoretical c/b values; a broken line divides all the data into two parts. To the left of the broken line, corresponding to relatively low values of dextran and/or invert concentrations, the observed



8. Experimental variation of c/b ratios, corresponding to different concentrations of dextran and invert sugar

crystal elongation along the c -axis is higher than the theoretical value, whereas to the right of the broken line the elongation is less with percentage differences becoming greater as the dextran or invert sugar contents increase. At the lowest dextran and invert concentrations (inside the broken polygon) are found the crystal elongations.

Taking into account that the amount of water present in such systems is very low in comparison with the amount of solute and impurities, we cannot exclude that, as mentioned above, when the concentrations of these impurities exceed certain values, there are reciprocal inhibition effects which might be related to eventual association effects. Obviously, although complex, the system considered is relatively simple in comparison with industrial magmas where the number and variety of impurities is very much higher. Of course, in a more

complex system, the ideal boundary line shown in Table I could be moved to the right or left or rotate around some point thus introducing complications.

I. Percentage differences between experimental and theoretical values of c/b ratios corresponding to different dextran and invert sugar concentrations

INVERT concentration (g/100 g)	Percentage difference between experimental and theoretical values of c/b ratios for DEXTRAN concentration (g/100 g water)									
	0.0	0.1	0.2	0.6	1	5	10	20	30	50
0.1	9	9	10	11	11	11	10	8	5	1
0.2	10	10	11	11	12	11	10	7	4	-1
0.5	10	11	12	12	13	12	9	5	2	-5
1.0	11	12	12	13	13	11	9	4	-1	-9
2.0	12	12	13	14	14	11	8	2	-4	-15
5.0	12	13	14	14	14	11	6	-3	-10	-24
10.0	13	14	14	15	14	9	3	-7	-16	-33
20.0	13	14	15	15	14	8	0	-13	-24	-45
40.0	14	14	14	14	13	5	-4	-21	-35	-60
70.0	13	14	14	13	12	2	-10	-29	-45	-75
100.0	13	13	13	12	11	-1	-14	-35	-54	-87
150.0	12	12	12	11	9	-5	-19	-43	-64	-101
200.0	11	11	11	10	8	-8	-24	-50	-73	-111
250.0	10	10	10	8	6	-11	-28	-56	-81	-124
300.0	10	10	9	7	5	-14	-32	-62	-88	-133

This hypothesis could explain why a number of authors have reported contrast results regarding sucrose crystal elongation and its dependence upon the possible presence of particular impurities. Moreover, all the data confirm what M a n t o v a n i et al. (1991) have observed by examining magmas coming from a South African sugar factory during a whole campaign. In fact, by using a multivariate analysis calculation they pointed out that, by increasing the concentration of the three impurities considered separately, a decrease of the c/b ratio value could be observed.

CONCLUSION

The complexity of the composition of the sugar cane processing magmas makes particularly difficult the evaluation of the effect of impurities when these

are present at the same time and at variable concentrations. These is particularly true in the present at the same time and at variable concentrations. These is particularly true in the presence of even relatively high concentrations of mono-, oligo- and poly-saccharides any of which can separately more or less influence the crystal elongation of sucrose. Positive synergistic effects can be replaced by negative influences when concentration ratios of the various impurities vary. This fact allows us to examined magmas of different origin and composition. In fact we can deduce that in such complex it is quite impossible to evaluate the effect of a single impurity without taking into account the presence of a number of others.

List of symbols

A,B,C	crystallographic axes
b	crystal dimension in direction of axis B
c	crystal dimension in direction of axis C
c_d	dextran concentration (g per 100 g water)
c_i	glucose, fructose or invert sugar concentration (g per 100 g water)
K_1, K_2	coefficients dependent on the invert sugar concentration c_i according equation [4] and [5]
R	c/b ratio in the presence of impurities (1)
R_d	c/b ratio in the presence of dextran (1)
R_i	c/b ratio in the presence of glucose, fructose or invert sugar (1)
R_s	c/b ratio for pure solution (1)

References

- BUBNÍK, Z. - KADLEC, P.: Crystallization rate of sucrose. *Listy cukrov.*, 104, 1988 : 201-210.
- BUBNÍK, Z. - VACCARI, G. - MANTOVANI, G. - SGUALDINO, G. - KADLEC, P.: Effect of dextran, glucose and fructose on sucrose crystal elongation and morphology. 19th General Assembly C.I.T.S., Cambridge 1991.
- HONIG, P.: Principles of sugar technology. Vol.2, Amsterdam, London, New York, Elsevier 1963.
- MANTOVANI, G. - VACCARI, G. - MARIGNETTI, N. - MOREL DU BOIL, P. G.: Relationship between crystal elongation and the presence of some impurities in cane sugar processing. Proc. S.I.T. Meeting, New York 1991.
- SMYTHE, B. M.: Sucrose crystal growth. *Sugar Technol. Rev.*, 1, 1971 : 191.
- VACCARI, G. - MANTOVANI, G. - MOREL DU BOIL, P. G. - LIONNET, G. R. E.: Color inclusions and habit-modification in cane sugar crystals. *Zuckerind.*, 115, 1990 : 1040-1044.
- VACCARI, G. - MANTOVANI, G. - SGUALDINO, G. - ZEFIRO, L.: Effect of glucose and fructose on cane sugar crystal morphology. *Zuckerind.*, 116, 1991.

Received for publication March 30, 1992

Z. Bubník, P. Kadlec (Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav chemie a technologie sacharidů, Praha)

Vliv dextransu a invertního cukru na tvar krystalu sacharosy

Tvar krystalů sacharosy, vyrůstajících v průmyslových krystalizátorech v přítomnosti různých druhů rozpuštěných nečistot, má významný vliv na průběh následných technologických operací - např. odstředování a sušení krystalického produktu. K nejdůležitějším nečistotám (necukrům) ovlivňujícím tvar krystalů patří v řepném cukrovarnictví rafinosa a ve třtinovém dextransu a invertní cukr (tj. směs glukosy a fruktosy v poměru 1:1).

Předložená práce se zabývá studiem vlivu dextransu, glukosy, fruktosy a invertního cukru na prodloužení a změnu tvaru krystalů sacharosy s cílem kvantifikovat tyto efekty a dále přispět k objasnění některých jevů, jež popisují ve svých pracích M a n t o v a n i et al. (1991), V a c c a r i et al. (1990, 1991) a B u b n í k et al. (1991). Jedná se zejména o vzájemné pozitivní a negativní působení mezi dextransem a invertním cukrem při krystalizaci sacharosy ve třtinovém cukrovarnictví.

Pokusy byly prováděny pomocí chladicí krystalizace za podmínek modelujících krystalizační proces v průmyslových aparátech. Počáteční nukleace byla realizována přidávkou suspenze mikrokystalů. U krystalů odebíraných v průběhu pokusu byly mikroskopicky měřeny jejich rozměry b , c ve směru krystalografických os B a C a jako charakteristická veličina byla vypočtena průměrná hodnota poměru c/b . Současně byly při pokusech sledovány změny ve vývinu jednotlivých krystalových ploch.

Měření probíhala v rozmezí koncentrací dextransu 0 až 50 g na 100 g vody, glukosy a fruktosy 0 až 200 g na 100 g vody a invertního cukru 0 až 300 g na 100 g vody. Závislost poměru c/b na koncentraci nečistot byla vyjádřena funkčními vztahy: pro invertní cukr, glukosu a fruktosu rovnicí [1], pro dextransu rovnicí [2] a pro směs dextransu a invertního cukru dvoupřímou rovnicí [3], jejíž koeficienty jsou popsány rovnicemi [4] a [5].

Graficky jsou průběhy uvedených funkcí zobrazeny na obr. 2 a 4. Z obr. 2 vyplývá, že vliv glukosy, fruktosy a jejich ekvimolární směsi (tj. invertního cukru) na prodloužení krystalu sacharosy ve směru osy C je v rámci chyb měření shodný. Dále bylo potvrzeno, že glukosa působí negativně na růst krystalů v oblasti levého pólu krystalu, zatímco fruktosa naopak blokuje plochy na pravém pólu krystalu. Společným působením pak vzniká charakteristický tvar krystalu uvedený na obr. 3.

Dextransu intenzivně blokuje růst krystalů ve směru osy B , čímž se vytvářejí typické sloupcovité krystaly (obr. 5 a 6). Působení dextransu na prodloužení krystalů je mnohem výraznější než u invertního cukru. Společným působením dextransu a invertního cukru pak vznikají charakteristické krystaly ve tvaru písmene D .

Vzájemné působení sledovaných nečistot při krystalizaci sacharosy je velmi názorně zobrazeno na obr. 7 a 8 a v tab. I. Na obr. 7 je znázorněn teoreticky předpokládaný průběh poměru c/b ve formě prostého součtu procentuálních přírůstků vyvolaných samotným působením dextransu a samotným působením invertního cukru. Na obr. 8 jsou uvedeny skutečné experimentálně zjištěné hodnoty, jež vykazují proti obr. 7 kladné i záporné odchylky.

Numerické hodnoty těchto odchylek jsou shrnuty v tab. I, kde můžeme nalézt dvě skupiny údajů: kladné hodnoty v levé oblasti relativně nízkých koncentrací reprezentují

pozitivní vzájemný efekt nečistot a mají maximum v oblasti nízkých koncentrací dextransu 0,2 až 0,6 g 100 g vody a invertního cukru 20 až 40 g na 100 g vody, zatímco záporné hodnoty odchylek v pravé části dokumentují vzájemný negativní efekt, jenž se zvětšuje se stoupající koncentrací nečistot. Obě oblasti hodnot v tab. I je možné oddělit lomenou časou, jejíž poloha pro různé průmyslové roztoky bude závislá na přítomnosti a obsahu dalších nečistot.

Zjištěná existence pozitivních a negativních vzájemných efektů mezi působením jednotlivých nečistot přítomných v technických cukerných roztocích vysvětluje příčiny rozdílů v měřeních tvaru cukerných krystalů různých autorů (viz odkazy, jež uvádí Vaccari, 1990, 1991).

krystal sacharosu; tvar a morfologie krystalu sacharosu; prodloužení krystalu; plochy a modifikace krystalu sacharosu; dextran; invert

PROPERTIES AND BEHAVIOUR OF IMMOBILIZED YEAST CELLS EMPLOYED FOR ETHANOL FERMENTATION

Karel MELZOCH, Mojmír RYCHTERA, Věra HÁBOVÁ

Institute of Chemical Technology - Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Technická 5, CS-166 28 Praha 6, Czechoslovakia

Saccharomyces cerevisiae cells immobilized in the alginate gel by the entrapment method retained high fermentation activity in a packed bed reactor even during long-term continuous process (1100 h fermentation). All fermentations have been characterized by the steady-state ethanol concentration in the range from 65 to 80 g/l and by the ethanol productivities up to 30 g/l.h. For the whole experimental time the calcium alginate beads proved to be stable. It was further confirmed that beads may be stored for a long time before application or between fermentations, even for more than one year, without losing fermentation activity and viability. The metabolic activity was found out in cells immobilized in calcium alginate beads even after five years of storage in 4 °C tap water as nongrowing and starveling immobilized culture.

ethanol; fermentation; immobilization; *Saccharomyces cerevisiae*; morphology and physiology; cell viability

The effect of yeast concentration on ethanol production has been well known for many years. Immobilized cell systems due to high concentration of active biomass in a fermentor allow to increase significantly the ethanol productivity and to improve the economy of the whole fermentation process in this way. For ethanol production the application of immobilized cells has been described in many reports and books (Chibata, Wingard, 1983; Phillips, Poon, 1988; Moo-Young, 1988; Mandenius et al., 1987).

The actual procedure of cell immobilization can markedly modify their metabolism and growth. The immobilized yeast cells are exposed to quite different conditions compared with those for free suspended cultures. The difference in behaviour between immobilized and free cells is often put in connection with several factors such as nutrient limitation, microenvironment of cells and physical contact of cells with surrounding material. The first two factors mentioned are widely used by many authors for explanation of physiological and morphological changes of cells after immobilization (Hahn-Hägerdal, 1990; Lee et al., 1983). The third factor

(phenomenon) closely connected with cytoplasmic membrane changes which result from matrix-cell and cell-cell contacts is relatively new item (Galazzo, Bailey, 1990; Jirků, 1991). The fundamental hypothesis to be proved is whether cellular functions and metabolism are affected directly and to what extent by the fact that a microbial cell is in direct contact with a solid surface, gel matrix or other cells. Suggestions such as permeability changes and nutrient availability are common and factors such as surface tension, osmotic pressure and water activity may have consequences, with respect to cell function, similar to the „skin effect“ (Hammer, 1990).

In this work we would like to focus our attention on a less known behaviour of yeast cells immobilized in a gel matrix under extreme conditions. Cell morphology and physiology are changed as a result of immobilization. Immobilized cells can acquire such properties which significantly extend their application possibilities in comparison with free suspended cultures.

MATERIALS and METHODS

Organism - All fermentations were carried out with the production strain *Saccharomyces cerevisiae* SL 100 from the yeast culture collection of the Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague.

Medium - The complete medium (CM) for batch and continuous fermentations contained (per liter): 150 - 200 g sucrose, 3 g dry yeast extract (Imuna, Šarišské Michalany, ČSFR), 2 g peptone (Imuna), 0.5 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.025 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The pH value was adjusted to 4.5 before sterilization carried out for 20 min at 120 °C. Other chemicals were chemically pure products of Lachema (Brno, ČSFR).

Immobilization procedure - The culture having been grown at 30 °C on CM for 24 hours was harvested from the second step of aerobic batch cultivation by centrifugation and washed with physiological solution. 5 g wet biomass was suspended in a solution of 100 ml 2% sodium alginate (Protanal LF 10/60; Protan A/S, Dramen, Norway). The homogeneous suspension was dropped into a solution of CaCl_2 (20 g/l) by means of a hypodermic needle. These droplets formed in CaCl_2 solution spherical beads of average diameter of 2 mm and those were then stored at 4 °C in a fresh CaCl_2 solution for at least 12 h with the aim of a complete gelation.

Bioreactor and continuous fermentations - All fermentations were carried out under anaerobic conditions at 30 °C in a packed bed reactor. The beads were packed into a glass column with sintered glass plate placed in a bottom part and

with nylon sieve fixed on the top of the reactor to keep immobilized cells inside. The total working volume of the bioreactor was in the range of 50-200 ml. The column could be filled with biocatalyst (beads) to about 50 % of total working volume to eliminate gas (CO₂) which would be accumulated in the bead layer. Medium was fed into the bottom part of column with a variable-flow peristaltic pump and fermented broth with carbon dioxide left the reactor on the top.

Analytical methods - Ethanol, sucrose and glycerol were determined by HPLC (O n d r o u š e k , B a s a ř o v á , 1986).

The free cell concentration was measured as dry weight. Yeast viable counts were made by cultivation method on malt agar plates in Petri dishes and/or by cell microscopic counting after vital methylene blue staining. The entrapped cells in beads were counted after dissolving calcium alginate particles in 1% KH₂PO₄ solution.

The immobilized or free yeast cells were fixed by 1% glutaraldehyde in cacodylic buffer and then dehydrated and prepared for observation in a scanning electron microscope by a standard procedure (N e e r v e n et al., 1990).

RESULTS and DISCUSSION

In our experiments during continuous fermentations on complete media with the substrate feed concentrations of 150 - 200 g/l at dilution rate from 0.2 - 0.5 per hour the steady-state ethanol concentrations ranged from 65 to 80 g/l and ethanol productivity reached maximum values of at about 30 g/l.h (related to the bead volume in a reactor).

The growth of cells immobilized in an entrapment system

Living cells immobilized in an entrapment system if they were in a favourable environmental form already during short period and due to nutrient limitation of the dense „active“ layer near the particle surface. In this case cells totally occupy all „free“ spaces in a gel matrix. Furthermore after a short time of fermentation the ability of entrapped cell to bud is nearly suppressed. The cell loading after activation and start-up periods of fermentation increased up to very high cell density (order of 10¹⁰ cells per ml of gel) and subsequently remained almost constant, as shown in Table I. It is possible to assume that the cell growth within a calcium alginate matrix nearly stopped (G ó d i a et al., 1985).

Irregular cell growth inside of the particles led to forming nonuniform architecture of the whole gel bead (N a g a s h i m a et al., 1983) and likewise of the pellet outer „active“ layer. Although this cell growth in a particle was

indirectly confirmed by results of element X-ray microanalysis from which the distribution maps of calcium and phosphorus atoms on the cut of calcium alginate bead were received. In beads after the process of hardening both atoms were homogeneously distributed in the gel matrix. During a long run operation calcium atoms were slowly being leached out from pellets and those once remained formed a structure looking like a net which marked out places having lower Ca-atom concentration in a gel. On the other hand, this observation was in good agreement with the distribution of P-atoms. Only the cells were the source of this distribution in a bead. Phosphorus location exactly corresponded to areas with low Ca-atom concentration in a gel as it was mentioned above. We can assume that in the gel structure there were certain caverns totally filled with cells which were surrounded by calcium alginate grating. Thus the long-term physical contact of cells with a support material and mutually with one another caused considerable changes of cell morphology and physiology of cells retaining in a gel matrix (Chen et al., 1990; Melzoch, 1988). This is probably due to the endeavour of yeast cells to employ „free“ areas in a pellet.

I. The concentration and the viability of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in calcium alginate beads of different age

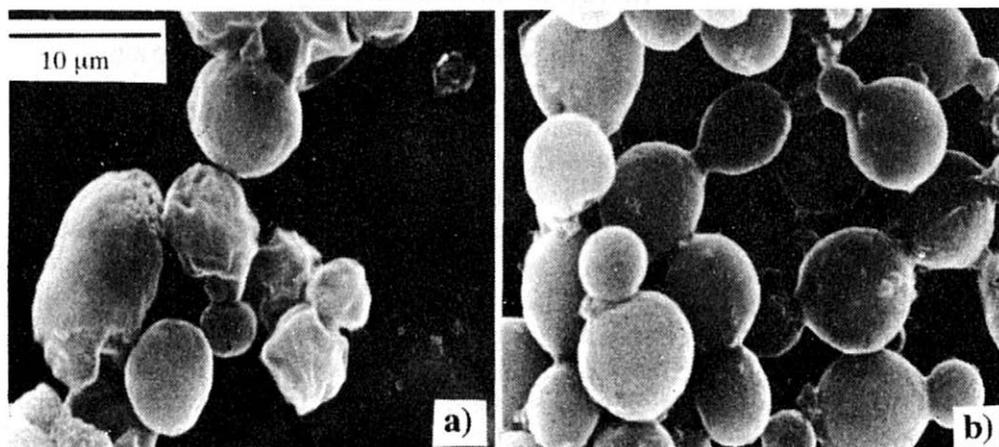
„Age“ of beads	Concentration of cells [number in ml _{gel}]	*Variability of cells [%]
Hardened beads	$1.4 \cdot 10^9$	98
Activated beads	$5.0 \cdot 10^9$	99
522 h fermentation	$4.1 \cdot 10^{10}$	87
1122 h fermentation	$2.7 \cdot 10^{10}$	93

determined by cultivation method as colony count

Nevertheless under these conditions the fermentation activity of nongrowing yeast cells was preserved which was already confirmed for immobilized culture in an entrapment system (Melzoch, 1988), for nongrowing free suspended cultures in fermentation system with total cell recycle in a membrane bioreactor, (Melzoch et al., 1990) etc. To some extent this fact demonstrates that ethanol formation is not strictly linked with cell growth. As it can be seen from scanning electron micrographs the whole bead surface was, nevertheless, very quickly colonized and covered by compact yeast cell layer from which only little cell leakage occurred during fermentation (Ivanova et al., 1991).

Morphology of immobilized yeast culture

For morphology studies of immobilized cells in a gel matrix the beads were thoroughly washed to remove cells from the surface. The cells were then fixed directly in gel pellets with glutaraldehyde to preserve their original shape and arrangement in which they had once existed in calcium alginate matrix. Afterwards previously fixed cells were released from gel particle. The irregular shape and size diversity of yeast cells document that entrapped cells can grow within pellet depending on space and steric possibilities in the matrix, and can form close structured aggregates. The morphology differences between immobilized and free suspended yeast cultures are demonstrated on scanning electron micrographs (Figs. 1a and 1b). Finally, the bead size did not suffer any significant change during activation and fermentation in contrast to Lee et al. (1984) and practically remained stable for the whole fermentation time (Pospíchalová et al., 1989).



1. Scanning electron micrographs showing *Saccharomyces cerevisiae* cells: a) entrapped inside of a calcium alginate bead (at 530 h fermentation), b) growing as a free cell culture

Viability of immobilized cells

During long-term fermentation in a packed bed reactor on a complete medium the *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in calcium alginate beads, kept their fermentation activity and viability. Under „normal“ conditions when the immobilized cell growth was very slow it was notable that the cell viability in the course of long-term fermentation did not fall below 80 % of total number of immobilized cells in a calcium alginate bead. However, there was a difference

between a count of viable cells determined by direct microscopic enumeration after methylene blue staining and a value of colony count found out by a cultivation test on malt agar plates. The former number gave much lower values namely with increasing fermentation time. The cell viability was between 40 and 60 %. The higher value of sensitivity of entrapped yeast cells to methylene blue gave evidence that permeability of cell cytoplasmic membrane increased. This is probably due to the impact of stress conditions evoked by a direct contact of a cell with surrounding cells and a supporting material. Using cultivation method for viability determination the most of blue stained cells demonstrated their „real“ capability to reproduce by forming colonies on malt agar plates in two days. It means that more than 80% of cells immobilized in calcium alginate maintained their metabolic activity and viability during long-term fermentation as reported in Table I.

Storage of immobilized cells

When using viable immobilized cells for fermentation we had to answer a few important questions concerning long-term stability of biocatalyst. It includes a possibility of multiple application of immobilized cells especially after longer production intervals (season work), problem of immobilized yeast cells storage for longer time (several months) when maintaining their activity.

In our experiments the hardened calcium alginate beads with immobilized yeast cells were stored in two ways: in tap water at 4 °C or in 60% sucrose solution at room temperature (20 - 25 °C) which the stored entrapped cells were not able to ferment. The beads of the age up to 13 months were filled into column reactor and processed continuously in a complete medium. The different pellet „age“ affected fermentation process, namely in the start-up period. The fastest enhancement of fermentation activity to „standard“ level was achieved in case when the fresh prepared biocatalyst (0 month) was used. Later the differences among properties of biocatalyst disappeared and after 150 h the effect of bead „age“ did not seem to be too significant for fermentation activities as shown in Fig. 2. In addition, after a period of cell adaption and regeneration the beads stored in a high concentrated sucrose solutions (60% w/v) produced even higher ethanol amount in comparison with the others. We can assume that in this case immobilized yeast cells might be adapted to higher osmotic pressure by a long-term storage in concentrated sugar solution.

In later experiments with immobilized yeast culture in gel beads we tried to get an answer to a cardinal question „how long could a metabolic activity and viability of cells immobilized by entrapment methods be conserved and how.

could it be influenced by a foregoing history of immobilized cells“ namely if entrapped cells of a different origin were stocked for a long-time under totally nongrowing conditions. These experiments were carried out with a collection of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells which were gradually prepared within more than five years and have a different history. It means that they were used in various fermentations and afterwards have been stored in water at 4 °C. In many cases the older beads retained particles, cell debris which had lost their cell morphology and in which it was difficult to identify yeast cell origin by microscopic observation. It was a surprise to see that these immobilized „cells“ were able to grow and produce ethanol in batch anaerobic fermentation (Table II).

II. The effect of immobilized bead storage period and bead „history“ on a viability, morphology and fermentation activity of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells

No.	Beads				Immobilized cells		
	Total age [months]	„History“		Strength	Morphology	Viability	Ferment. activity
		Age ¹⁾ [months]	Ferment. time ²⁾ [h]				
1	0	-	none	+++	+	+++	+++
2	7	-	none	+++	+	+	+
3	39	0	1122	+++	+	+++	+
		32	450				
4	39	0	1122	+++	-	+	+
5	40	0	600	+++	-	+	+
		15	453				
6	40	0	600	+++	-	+	+
7	63	0	402	+++	-	+	+

Abbreviations and symbols:

¹⁾ Age of beads at the time when a new fermentation started (in months)

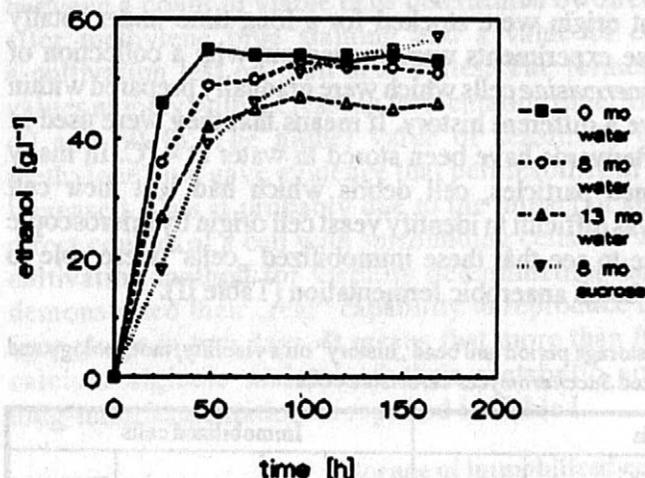
²⁾ Run time of continuous fermentation (in hours)

Strength, Viability and Fermentation activity: (+++ high, ++ middle, + low)

Morphology: (+ cell morphology maintained, - cell morphology lost)

Explanation to No.3: New prepared beads (0 months) were processed continuously for 1,122 h in fermentation, then they were stored at 4 °C in tap water and in the 32nd month of bead age they were used again in continuous fermentation lasting 450 h and afterwards they were stored again. The results mentioned in four last columns were obtained from 39 months old beads

Five years old calcium alginate beads have kept their rigidity and other mechanical properties. Owing to immobilization the calcium alginate entrapped cells were capable to survive under unfavourable conditions as nongrowing and



2. Effect of bead storage on fermentation activity of immobilized yeast cells in calciumalginate beads:

newly prepared beads stored in water at 4 °C
 8 months old beads stored in water at 4 °C
 13 months old beads stored in water at 4 °C
 8 months old beads stored in sucrose solution at 20 °C in a continuous performance at dilution rate of 0.2 per h on complete medium with 150 g/l sucrose

long-term starveling cultures. The fact that after such a long period the entrapped cells were in viable state confirmed that process of immobilization significantly increases and supports stableness of living yeast cells.

Acknowledgements

We thank Miss S. Laurentová and Mr. O. Moravec for technical support in the scanning electron microscopy and X-ray microanalysis.

References

CHEN, C. - DALE, M. C. - OKOS M. R.: Minimal nutritional requirements for immobilized yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1990 : 993-1001.
 CHIBATA, I. - WINGARD, L. B. (Eds): *Immobilized microbial cells. Vol.4.* London and New York, Academic Press 1983.
 GALAZZO, J. L. - BAILEY, J. E.: Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 1990 : 417-426.
 GÒDIA, F. - CASAS, C. - SOLÀ, C.: Alcoholic fermentation by immobilised yeast cells. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 35B, 1985 : 139-144.
 HAHN-HÄGERDAL, B.: Physiological aspects of immobilized cells: a general overview. In: BONT, J. A. M. de - VISSER, J. - MATTIASSON, B. - TRAMPER, J. (Eds.): *Physiology of immobilized cells. Proc. int. Symp., Wageningen, December 10-13, 1989 Amsterdam, Elsevier 1990* : 481-486.
 HAMER, G.: Immobilized microbes: interfaces, gradients and physiology. In: BONT, J. A. M. de - VISSER, J. - MATTIASSON, B. - TRAMPER, J. (Eds.): *Physiology of immobilized cells. Proc. int. Symp., Wageningen, December 10-13, 1989 Amsterdam, Elsevier 1990* : 15-24.

- IVANOVA, V. - RYCHTERA, M. - BASAŘOVÁ, G.: Application of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells for continuous ethanol production: Comparison of several variants of continuous methods (in Czech). *Kvasný Prům*, 37, 1991 : 100-104.
- JIRKŮ, V.: The effect of covalent immobilization on ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biotechnol.*, 11, 1991 : 77-80.
- LEE, T. H. - AHN, J. C. - RYU, D. D. Y.: Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 1983 : 41-45.
- MANDENIUS, C. F. - MATTIASSON, B. - AXELSSON, J. P. - HAGANDER, P.: Control of an ethanol fermentation carried out with alginate entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1987 : 941-949.
- MELZUCH, K.: Application of immobilized biological systems in alcohol production (in Czech). [PhD Thesis.] Prague, Institute of Chemical Technology, 1988.
- MELZUCH, K. - RYCHTERA, M. - MARKVICHOV, N. S. - POSPÍCHALOVÁ, V. - BASAŘOVÁ, G. - MANAKOV, M. N.: Application of a membrane recycle bioreactor for continuous ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 1990, : 469-472.
- MOO-YOUNG, M. (Ed.): Bioreactor immobilized enzymes and cells: fundamentals and applications. London and New York, Elsevier 1988.
- NAGASHIMA, M. - AZUMA, M. - NOGUCHI, S. - INUZUKA, K. - SAMEJIMA, H.: Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1984 : 992-997.
- NEERVEN, A. R. W. van - WIJFFELS, R. H. - ZEHNDER, A. J. B.: Scanning electron microscopy of immobilized bacteria in gel beads: a comparative study of fixation methods. *J. Microbiol. Methods*, 11, 1990 : 57-168.
- ONDROUŠEK, S. - BASAŘOVÁ, G.: Využití vysoko účinné kapalinové chromatografie na iontoměničích při stanovení alkoholu ve fermentačních médiích. *Potrav. Vědy*, 4, 1986 : 91-97.
- PHILLIPS, C. R. - POON, Y. C.: Immobilization of cells. Berlin - Heidelberg, Springer-Verlag 1988.
- POSPÍCHALOVÁ, V. - MELZUCH, K. - RYCHTERA, M. - BASAŘOVÁ, G.: Morphology and behaviour of yeast cells immobilized by entrapment method. *Proc. 18th Czechoslovak Microbiol. Soc. Congr. Plzeň*, July 11-13, 1989 : A-31.

Received for publication June 24, 1992

*K. Melzoch, M. Rychtera, V. Hábová (Vysoká škola chemicko-technologická
- Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Praha, Czechoslovakia)*

Vlastností a chování imobilizovaných kvasničných buněk používaných pro ethanolovou fermentaci

Produkce ethanolu kvasnou cestou patří bezesporu k nejznámějším a dnes již „klasickým“ biotechnologickým výrobám. I v tomto tradičním fermentačním procesu se uplatňuje řada nových poznatků a moderních technologií, které vedou zejména ke zvýšení produktivity tvorby ethanolu, výtěžnosti procesu a zlepšení ekonomiky celé výroby. Ohromnou výhodou kvasného ethanolu je fakt, že výchozí suroviny používané pro jeho výrobu jsou v přírodě snadno obnovitelné zdroje, případně odpadní materiály,

u kterých nehrozí vyčerpání jejich zásob jako je tomu u fosilních zdrojů. Určitou nevýhodou však zůstává nízká produktivita tvorby ethanolu v konvenčních procesech, která se pochybuje kolem 2 až 5 g/l.h a je způsobena zejména inhibicí reakce produktem a nízkou koncentrací buněk v bioreaktoru. Proto se jednotlivé moderní fermentační systémy snaží tyto nedostatky různými způsoby eliminovat, a tak dosáhnout vysokých produktivit, nejméně až 100 g/l.h a více. Jednou z cest, které vedou k výraznému zefektivnění fermentačního procesu, je i využití systémů s imobilizovanými buňkami.

V práci byl sledován vliv imobilizace v systému entrapment na chování, metabolickou aktivitu a morfologii kvasinkových buněk *Saccharomyces cerevisiae* dlouhodobě zadržovaných v gelových peletách alginátu vápenatého. Imobilizované buňky jsou vystaveny zcela rozdílným podmínkám než volné kvasinky. Rozhodujícími faktory, které ovlivňují jejich morfologii (obr.1a a 1b) a fyziologický stav a které vedou k vytvoření „mikroprostředí“ kolem buňky v gelové síti, jsou určitá limitace přenosu hmoty (transport substrátu a produktu) v systému médium - gel - buňka a vliv vlastního procesu imobilizace na buňku. Při fermentaci dochází rychle k nárůstu imobilizované buněčné populace v gelové síti a díky limitaci živinami k vytvoření asymetrické struktury v peletě, tzv. aktivní vrstvy buněk při povrchu pelety. Koncentrace buněk v peletě alginátu vápenatého pak běžně dosahuje vysokých hodnot, řádově 10^{10} buněk na ml gelu (Tab.I).

Imobilizované buňky *Saccharomyces cerevisiae* použité v náplňovém kolonovém reaktoru si zachovávaly v průběhu dlouhodobých kontinuálních fermentací (1100 h) vysokou kvasnou aktivitu. Fermentace byly prováděny na kompletním médiu s koncentrací sacharosy 150 - 200 g/l a v ustálených stavech se koncentrace ethanolu pohybovala v rozmezí 65 až 80 g/l a produktivita tvorby ethanolu dosahovala až 30 g/l za hodinu. V průběhu všech fermentací alginátové pelety byly mechanicky stabilní a životaschopnost zadržovaných buněk neklesala pod 80 % (Tab. I).

Základní otázky, které byly dále studovány, se týkaly problematiky dlouhodobé stability biokatalyzátoru - možnosti opakovaného použití pelet v kontinuální fermentaci, způsobu jejich skladování a otázky po jak dlouhý časový interval jsou imobilizované buňky schopné si zachovat svoji životaschopnost a fermentační aktivitu. V kontinuálních fermentacích s peletami různého „původu“ (od nově připravených až po pelety skladované více jak jeden rok za nerůstových podmínek) bylo potvrzeno, že vytvrzené pelety mohou být před použitím nebo mezi jednotlivými fermentacemi dlouhodobě skladovány bez ztráty kvasné aktivity a životaschopnosti imobilizovaných buněk. To potvrzuje také skutečnost, že buňky se velmi rychle v příznivých podmínkách adaptovaly a počáteční rozdíly v kvasné aktivitě těchto pelet se vyrovnaly během dvou až tří dní fermentace (obr. 2). Rovněž překvapivé bylo zjištění, že metabolická aktivita byla zachována i u buněk zadržovaných v peletách alginátu vápenatého starších jak pět let, které byly skladovány ve vodě při teplotě 4 °C jako hladovějící a nerostoucí kultura (tab. II).

ethanol; fermentace; imobilizace; *Saccharomyces cerevisiae*; morfologie a fyziologie; životaschopnost buněk

DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF PECTIN PREPARATIONS

*Michal VOLDŘICH, Jaroslav DOBIÁŠ, Anna SLAVÍČKOVÁ,
Jitka CAUDROVÁ*

*Institute of Chemical Technology - Department of Food Preservation
and Meat Technology, Technická 5, CS - 166 28 Praha 6, Czechoslovakia*

Three different procedures for determination of molecular weight of pectin preparations - viscometry, osmometry and HPSEC were compared. Fifteen samples of pectin preparations from various producers were analyzed and relations between determined molecular weights and gelling power of pectin preparations were studied. A good correlation was found for the results of HPSEC procedure and viscometry. The chromatographic procedure seems to be the most valuable for evaluation of pectin quality.

pectin; molecular weight determination; viscometry; osmometry; HPSEC

The polysaccharide pectin is widely used as the gelling and thickening agent in food processing. For the technological use the pectin preparations are produced from apple pomace, citrus albedo and other sources. Depending on the plant source, method of extraction, chemical treatment after extraction, about 80 % of pectin preparation is composed of α -1,4-linked D-galacturonic acid units with varying degrees of the carboxyl groups methylated. The remaining part of pectin preparation is composed of the neutral sugars L-arabinose, D-galactose, and L-rhamnose. Small quantities of D-glucose, D-mannose and D-xylose could be contained as well. Besides that the pectin preparation can contain other impurities like starch and related substances (D o e s b u r g , 1965; F i s h m a n , 1984).

In addition to the composition, purity and degree of esterification the molecular weight and/or size of pectin molecule are the main factors affecting technological properties of pectin preparations. The molecular weight of pectin can be studied by boundary electrophoresis, ultracentrifugation, electron microscopy, end group analysis, viscometry, osmometry, light scattering, gel filtration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC) (F i s h m a n , 1984). Since the evaluation of the molecular weight is very important also for the control of technological process of pectin production and

quality evaluation of pectin preparations, the aim of presented paper was to compare viscometric, osmometric and HPSEC methods of the pectin molecular weight determination from the point of view of their use in pectin technology.

MATERIAL and METHODS

The analyzed samples were pectin preparations of various producers listed in Table I. The preliminary analyses of those were made after the usual procedures: the content of alcohol insoluble solids was determined by washing of pectin sample with acidified ethanol/water solution (60 % of ethanol, 1.8 % of HCl). The esterification degree of preparations was determined titrimetrically (D o e s b u r g , 1965). Gelling power of preparations was analyzed using the U.S. sag method modified by the I.F.T. Committee on pectin standardization (D o e s b u r g , 1965). The galacturonic acid content was determined colorimetrically after the reaction with 3-hydroxy-biphenyl (B l u m e n k r a n t z , A s b o e - H a n s e n , 1973).

I. List of the pectin preparations tested

Sample number	Preparation	Jellying power [°SAG]	Ethanol insoluble solids [%]	Esterification degree [%]
1.	GENU pectin D, slow set	142	73.3	54.4
2.	GENU pectin citrus, medium rapid set	195	68.1	61.9
3.	HP Bulmer 121, slow set	141	65.7	54.0
4.	HP Bulmer 161, slow set	184	95.7	56.7
5.	Grinsted Mexpectin, slow set 400	148	59.8	69.7
6.	Grinsted Mexpectin, slow set 200	142	67.5	57.9
7.	GENU pectin citrus, slow set	197	93.9	64.2
8.	Pektin Smiřice 1986	86	75.6	37.6
9.	Unknown pectin sample	119	81.5	52.5
10.		130	59.7	51.0
11.		148	86.3	55.2
12.	Pektin Smiřice	100	86.3	60.4
13.		116	85.0	58.9
14.		110	80.8	58.7
15.		138	84.5	66.7

Viscometric determination

Viscosity measurements of pectin solution were done using the Ubdelohde viscometer, which was calibrated with distilled water at 20 - 70 °C. The time of outflow of pectin solutions (τ) was corrected after the equation:

$$\tau^* = \tau - \frac{H}{\tau}$$

where: τ^* - corrected time of outflow
H - constant of viscometer

Using the corrected time (τ^*), the relative viscosity η_{rel} was found:

$$\eta_{rel} = \frac{\tau^*}{\tau^*_0}$$

where: τ^*_0 - time of outflow of distilled water at 20 °C

The limit viscosity number of pectin ($[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$) was found by

extrapolation of the function $\log \frac{\eta_{sp}}{c} = f(c)$ for $c = 0$, where $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$.

From the limit viscosity number the relative molecular weight of pectin was calculated using the Mark-Howink empirical equation with the constants after B e r t h et al. (1977):

$$[\eta] = 2.16 \cdot 10^{-2} \cdot \bar{M}_w^{0.79} \quad [\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}]$$

Osmometric determination

Stock pectin solution (0.5 % w/v) was purified using diafiltration tube (KALLE, Wiesbaden, i.d. 20 mm). Osmometric measurements were done with osmometr Knauer with semipermeable membrane Sartorius 115 539. The device was rinsed with „solvent“ (0.1M NaCl, 0.005N Na oxalate, 0.02 % NaN₃) and one of the chamber was filled with the pectin solution (stock solution diluted with „solvent“). Low molecular substances passing the membrane into the

chamber filled with pectin caused the pressure changes which were followed. For a very diluted solution the state function can be used:

$$\pi V = nRT$$

where: $n = \frac{CV}{N_{Am}} = \frac{CV}{M}$

and

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\pi}{C} = \frac{RT}{M} \quad [1]$$

where: π - osmotic pressure [Pa]
 C - concentration of pectin solution [g.l⁻¹]
 V - volume [l]
 M - relative molecular weight
 R - gas constant [J.mol⁻¹.K⁻¹]
 N - Avogadro constant [mol⁻¹]
 T - temperature [K]

Measuring the osmotic pressure of pectin solution of different concentration the function

$$\frac{\pi}{c} = f(c)$$

was drawn and from that the value for $c = 0$ ($\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\pi}{c}$) was found and using the equation [1] the molecular weight was calculated.

HPSEC determination

The pectin samples were washed with ethanol (by the same way as for the determination of ethanol insoluble solids), dried and dissolved in water at a concentration of 0.5 % (w/v). A 100 μ l portion was injected into a column and separated under following conditions: column - stainless steel 500 x 8 mm, filled with Sepharon HEMA 1000 Glc, 12 μ m, (Laboratorní přístroje, Praha, Czechoslovakia); mobile phase - 0.1M acetate buffer solution pH 4.0, the flow rate was 1.5 ml per min; the refractive index detection was used.

RESULTS and DISCUSSION

A pectin preparation is a mixture of pectin substances of different molecular weight, various structure and nonpectin components like starch and other sugar constituents. All these nonpectin substances as well as the qualities of pectin (such as distribution of molecular weight, esterification degree etc.) affect the molecular weight determination.

In the presented paper we compared three different methods for the evaluation of molecular weight of pectin preparations. Results are given in Table II.

II. Determined qualitative properties of analyzed pectin preparations

Sample number	A	B	C	D	E
1	188.4	64.2	235 000	52 600	5.7
2	286.4	67.6	344 000	28 000	5.6
3	215.0	69.2	303 000	75 200	6.7
4	192.0	71.4	197 000	75 200	5.7
5	247.6	69.1	425 000	119 500	
6	209.9	66.8	371 000	21 300	6.8
7	209.5	67.4	322 000	23 900	7.2
8	113.2	60.1	211 000	15 900	3.6
9	145.3	70.7	242 000	60 500	4.8
10	217.4	68.2	331 000	71 200	5.8
11	171.8	60.9	435 000		6.3
12	115.2	40.7	630 000		5.4
13	136.4	48.0	471 000		4.8
14	136.6	52.4	309 000		4.1
15	162.9	56.8	471 000		7.0

A = gelling power related to ethanol insoluble solids of pectin preparation [$^{\circ}$ SAG]

B = anhydrogalacturonic acid content of pectin preparation related to ethanol insoluble solids [%]

C = relative weight-average molecular weight \bar{M}_w determined viscometrically

D = relative number-average molecular weight \bar{M}_n determined osmotically

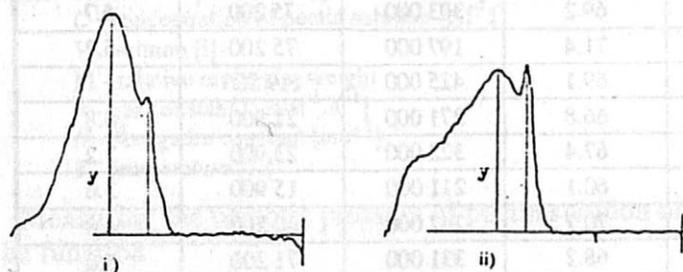
E = value J calculated from the parameters of HPSEC chromatogram

The reliability of results is significantly dependent on the composition of pectin preparation. Besides the nonpectin substances, the high molecular fraction of pectin which is usually branched, containing higher amount of reducing sugars, so-called microgel (A n g e r , B e r t h , 1985), affects the

measurement, e. g. the presence of the microgel causes the higher results, if viscometry is used. The other factors affecting the viscometry results are the constants used in the empirical Mark-Howink plot and/or the precision in repeating the preliminary sample treatment after the author of an original measurement. We used the constants and the procedure of Berth (Berth et al., 1977), who had calculated the constants after parallel viscometric and light scattering molecular weight determination.

The osmometric procedure based on the state equation gives the absolute values of the number-average molecular weight \bar{M}_N . Nevertheless the osmometric determination is also affected by several factors and especially the more complicated sample treatment - removing of ions and other low molecular substances from the sample is necessary.

The third used method was HPSEC of pectin preparations on Sepharon HEMA 1000 Glc (2-hydroxyethyl methakrylate - ethylen dimethakrylate copolymer with bonded glucose). Examples of chromatograms are given in Fig. 1.



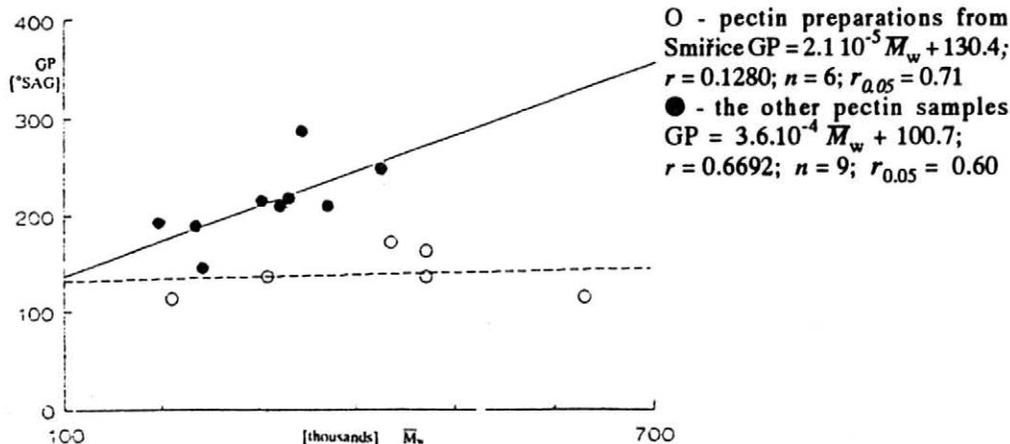
1. HPSEC chromatograms of pectin preparations samples
 i) HP Bulmer 161, slow set, sample N° 4
 ii) Pektin Smiřice, sample N° 13

To determine the molecular weight the HPSEC column is usually calibrated with characterized polysaccharides (blue dextrans etc.) and the dependence of partition coefficient k_{av} and \bar{M}_w is found (Mikeš et al., 1975). Since the mentioned calibration of column gives also in the case of heterogeneous pectin preparations relative values only, we used the following equation for the characterization of pectin samples:

$$J = \frac{y}{x - X_0}$$

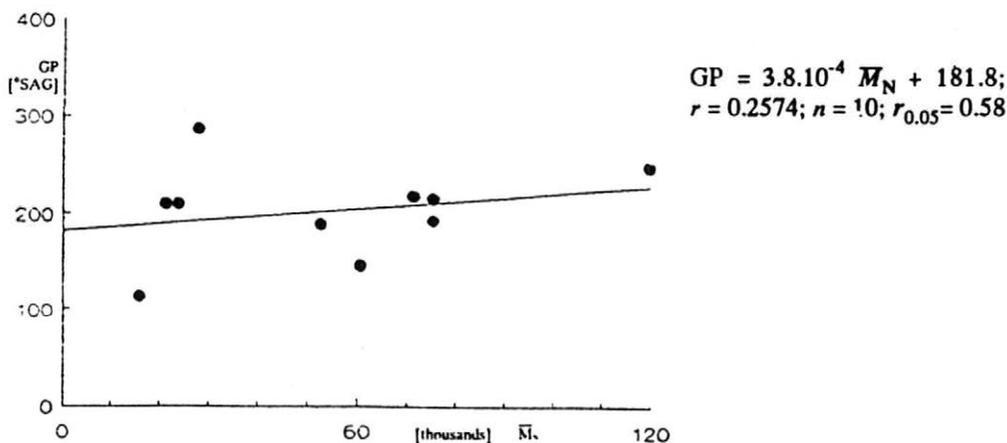
where: y - peak height at the pectin peak maximum
 x - elution volume of pectin peak maximum
 X_0 - elution volume of not retained macromolecular fraction

For the calculations the elution volumes were expressed as distances [mm] in the chromatograms obtained under the described conditions (Fig. 1).

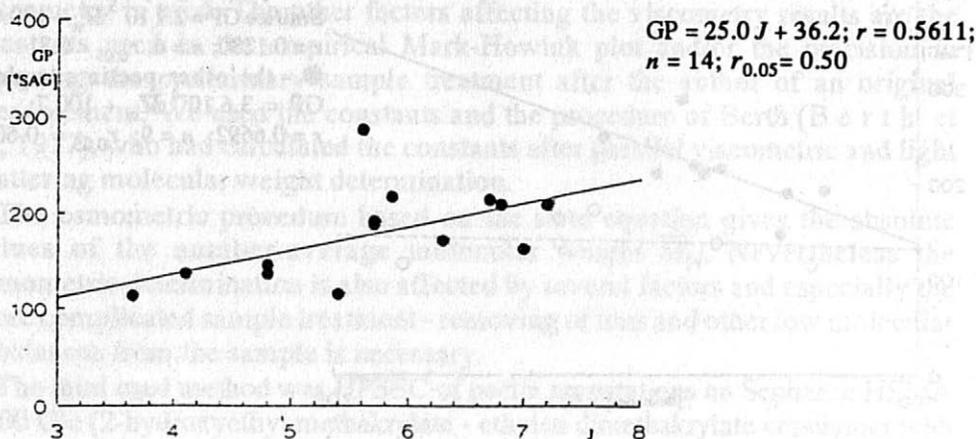


2. Relationship between gelling power of pectin preparations (GP) and relative weight-average molecular weight determined viscometrically

The most important property of the compared methods is their informative value and the utility to evaluate quality of pectin preparations. One of the decisive qualitative parameters of pectin preparation is the gelling power, therefore to compare the methods the dependence of gelling power on the determined molecular weight were calculated. Results are given in Figs. 2 - 4.

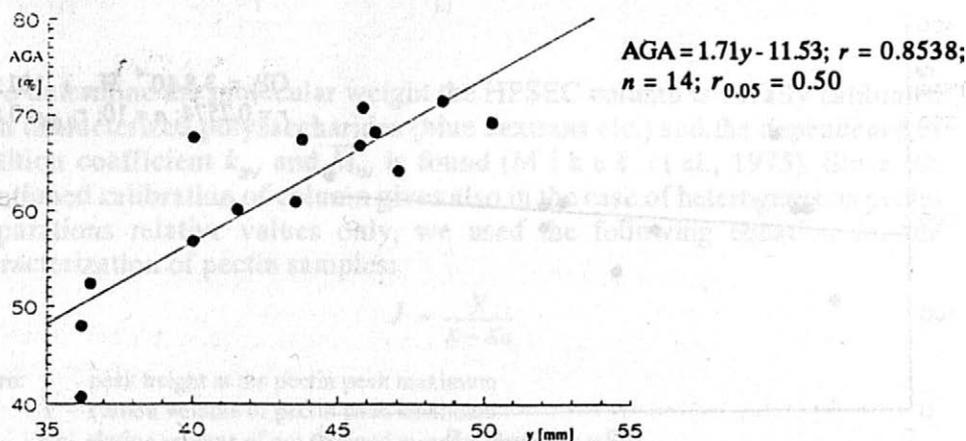


3. Relationship between gelling power of pectin preparations (GP) and relative number-average molecular weight determined osmotically



4. Relationship between gelling power (GP) and the value J calculated from the parameters of HPSEC chromatogram

A good correlation was found for the results determined by the HPSEC method and in the case of viscometry with the exception of samples produced at Smiřice. No correlation was found in the case of osmometric determination, probably due to an insufficient removing of low molecular impurities from the samples.



5. Relationship between the galacturonide content (AGA) of pectin preparation and the height of „pectin“ peak (y)

From the practical point of view the HPSEC method seems to be the best for the technological use - it is simple, comparing with viscometry and especially with osmometry. Almost no preliminary treatments of pectin samples are necessary. Another advantage of the chromatographic procedure is providing more information, the y value is positively correlated with the maximum concentration of the high-molecular constituents of the solution, the x value is in negative correlation with the molecular weight of the most abundant constituent. The proposed J value takes in both the „purity“ of pectin preparation - the content of anhydrogalacturonic acid (Fig. 5) and the molecular weight. The value J can be expected to correlate positively with the (gelling) quality of the pectin preparation (Fig. 4). Nevertheless, the possibility to evaluate the quality from the molecular weight distribution from the shape of chromatograms (Fig. 1) could be also useful in technological practice.

References

- ANGER, H. - BERTH, G.: Gel permeation chromatography of sunflower pectin. *Carbohydrate Polymers*, 5, 1985 : 241-250.
- BERTH, G. - ANGER, H. - LINOW, F.: Streulichtphotometrische und viscosimetrische Untersuchungen an Pektinen in wässrigen Lösungen für Molmassenbestimmung. *Nahrung*, 21, 1977 : 939-950.
- BLUMENKRANTZ, N. - ASBOE-HANSEN, G.: New method for quantitative determination of uronic acid. *Analyt. Chem.*, 54, 1973 : 484-489.
- DOESBURG, J. J.: Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables. Institute for Research on Storage and Processing of Horticultural Produce. Wageningen, The Netherlands, 1965.
- MIKEŠ, O. et al.: Laboratorní chromatografické metody. Praha, SNTL 1975.

Received for publication December 12, 1991

M. Voldřich, J. Dobiáš, A. Slavíčková, J. Caudrová (Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav konzervárenství a technologie masa, Praha)

Stanovení molekulové hmotnosti pektinových preparátů

Pektin je v široké míře používán v potravinářské technologii jako želírující a zahušťující aditivní látka. Pro technologické účely je získáván z různých zdrojů, zejména jablečných výlisků a albeda citrusového ovoce. Podle zdroje, způsobu extrakce a zpracování pektinový preparát obsahuje asi 80 % řetězců α -1,4 D-polygalakturonové kyseliny do různého stupně methylované. Zbytek je tvořen neutrálními cukry L-arabinosou, D-galaktosou, L-rhamnosou a v menších množstvích D-glukosou, D-manosou a D-xylo-

sou. Kromě uvedených složek může být pektinový preparát znečištěn také zbytky škrobu a příbuzných látek. Technologické vlastnosti pektinových preparátů jsou dány čistotou, stupněm esterifikace a zejména molekulovou hmotností pektinu. Stanovení molekulové hmotnosti je proto významné nejen pro posouzení pektinových preparátů, ale i pro kontrolu a řízení technologie výroby pektinu. Cílem předložené práce bylo porovnat tři metody stanovení molekulové hmotnosti pektinu - osmometrii, viskozimetrii a vysokoúčinnou gelovou chromatografii (HPSEC) z hlediska možností použití v technologii výroby a aplikace pektinových preparátů.

Patnáct různých pektinových preparátů bylo posuzováno třemi uvedenými metodami. Při viskozimetrickém stanovení molekulové hmotnosti byl používán Ubdelohdeho zřeďovací viskozimetr. V práci byl použit postup a konstanty Mark-Howinkova vztahu podle Berthové (B e t h , 1977). Osmometrické stanovení bylo prováděno na osmometru fy Knauer, po předchozím čištění roztoků pektinů od nízkomolekulárních látek diafiltrací. Třetí používanou metodou byla HPSEC na Sepharonu HEMA 1000 Glc, 12 μ m.

Při hodnocení získaných výsledků byla nalezena korelace mezi střední hmotností molekulovou hmotností \bar{M}_w stanovenou viskozimetricky a rosolotvornou mohutností pektinových preparátů. Žádná souvislost nebyla nalezena pro střední číselnou molekulovou hmotnost pektinu \bar{M}_n stanovenou osmometricky a rosolotvornou mohutnost preparátů. Pro charakterizaci pektinových preparátů na základě gelové chromatografie byla navržena hodnota J zahrnující výšku a retenční objem nejkonzentrovanejší složky preparátu, hodnota J se ukázala být měřítkem, jak čistoty pektinu (korelovala s obsahem kyseliny galakturonové v preparátu), tak molekulové hmotnosti, resp. rosolotvorné mohutnosti pektinového preparátu. Kromě toho chromatogram daného pektinu poskytuje informaci o celkové distribuci molekulové hmotnosti vzorku.

Z hlediska náročnosti na přípravu a úpravu vzorků a informační hodnoty výsledku předčí vysokoúčinná gelová chromatografie obě další srovnávané metody a je vhodná pro použití v technologii výroby pektinu i k technologickému hodnocení kvality pektinových preparátů, při kterém by mohla doplnit a v některých případech nahradit klasické pracné a časově náročné metody.

pektin; stanovení molekulové hmotnosti; viskozometrie; osmometrie; HPSEC

TEXTURE OF CANNED APRICOTS

Dušan ČURDA, Jaroslav DOBIÁŠ, Petra ŽÁKOVÁ

Institute of Chemical Technology - Department of Food Preservation and Meat Technology, Technická 5, CS-166 28 Praha 6, Czechoslovakia

The texture changes of apricots of the sort Velkopavlovická in two stages of technological ripeness sterilized by heating at 70, 80, 90 and 95 °C was followed using the reverse extrusion method and sensory evaluation. The difference between fruit of various ripeness decreased with increasing intensity of heating treatment. The best sensory evaluation was found for apricots heated at lower temperatures. The conditions for achieving the optimal texture are compared with possibilities of inactivation of microorganisms and enzymes, which are important for fruit processing.

apricot; ripeness; texture; sterilisation

Apricots are very suitable for the production of canned fruit. While for the direct consumption it is preferable to use the ripe fruits, in the production of canned fruit so called „canning ripeness“ is important. This state is generally described by means of subjective characteristics (B o u r n e , 1978).

During heating vegetal tissues undergo typical changes. We described them in connection with canning of apples (K y z l i n k et al., 1982). They comprise chemical (hydrolysis of glycosidic bounds, β -elimination), physico-chemical (swelling of macromolecular components) and mechanical processes (extension of gases and their escape through the tissue) which, besides other effects, also affect the tissue texture. The changes of texture can be influenced by some additives. Special attention has been paid to calcium salts which can enhance the firmness of fruit (K y z l i n k , 1988). On the other hand, the shortage of Ca^{2+} ions, i. e. in presence of sequestering agents (especially organic acid), can accelerate the tissue softening (M o h a m m a d z a d e h - K h a y a t , L u h , 1968).

The aim of presented work was to contribute to study of the changes of apricot texture during different sterilization treatments. The changes were characterised both by means of physical parameters and sensorically. The results were confronted with some kinetic parameters for sterilization of acid food.

MATERIAL and METHODS

The sort of apricots Velkopavlovická was used in canning ripeness. The fruits were divided into two groups. The riper portion was marked as „apricot I“ and had soluble solid content 13.2 % (w/w), acid content (as citric acid) 1.37 % and firmness (measured by the manual penetrometer developed in Research Institute of the Food Industry in Prague) 10.7 N. The rest, i. e. less ripe fruit, was marked as „apricot II“ and its analogical characteristics were 12.6 %, 1.49 % and 19.8 N, respectively.

The halved and destoned apricots (250 g) were filled into cans (diameter 99 mm; volume 454 ml), poured on with sugar brine (30 % sucrose solution) and subjected to heating in hot water bath. During that process samples at 20 time-temperature combinations were taken and tested (Table I). The temperatures in cans were taken in the least heated place (i. e. in fruit particles) with thermocouple. The F values for each treatment were calculated using $T_{ref} = 80$ °C and $z = 5$ °C which pertains *Paecilomyces varioti* thermal inactivation (K y z l i n k , 1988).

I. Time-temperature conditions of samples taken for texture tests

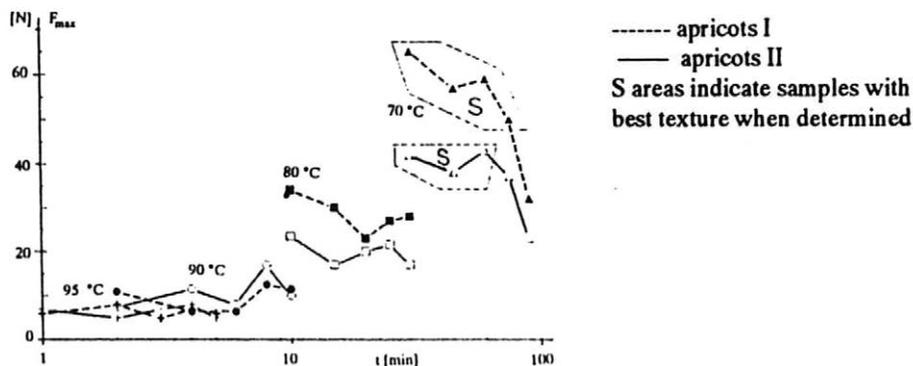
Temperature [°C]	Holding time [min]/Corresponding F value				
70	30/1.14	45/1.46	60/1.61	75/1.75	90/2.43
80	10/16.2	15/28.6	20/38.8	25/46.8	30/51.7
90	2/574	4/723	6/855	8/908	10/984
95	1/6340	2/7300	3/8500	4/9700	5/11110

The texture was determined by the reverse extrusion method using Instron 1152 apparatus. The extrusion vessel made of stainless steel (inner diameter 40 mm) was filled with four quarters of apricot (about 80 - 90 g). The fruit was then pressed by piston (diameter 32 mm) the speed of which was 125 mm/min. From the extrusion diagram, i. e. the stress-time curve, the maximum force F_{max} [N] and the work exerted during the whole extrusion process A [J] were determined (K y z l i n k et al., 1982).

For the sensory evaluation of heated apricots the graphic scale method was used in which five samples of processed fruit were presented to ten panelists. The texture of fruit was expressed as B value, i. e. distance from the beginning of the graphic scale (100 mm) when $B = 0$ mm corresponds to „very hard“, $B = 50$ mm to optimum and $B = 100$ mm to „very soft“ texture.

RESULTS and DISCUSSION

We found the F_{max} and A values 185 N and 3.9 J for the fresh apricots I, resp. 340 N and 5.8 J for the apricots II. Figs 1 and 2 show the results of the texture measurements after heating. Both F_{max} and A values have evidently the compa-



1. Changes of F_{max} [N] value during apricots heating at different temperatures sensorically

able ability to demonstrate the influence of heat treatment on apricots texture. The graphs are plotted in semilogarithmic scale in which many thermodegradable processes (e. g. inactivation of microbes, enzymes, destruction of some pigments etc.) show mostly a linear course, typical for the first order reactions. In this case the changes are more complex. Besides the main chemical reaction, i. e. hydrolysis of pectic substances, a lot of thermophysical processes take place. We have described the influence of gas in vegetal tissue on texture changes during the heating (Čurda et al., 1993). Under certain conditions the expanding gas can increase the firmness of tissue and cause unexpected texture changes (Figs. 1 and 2).

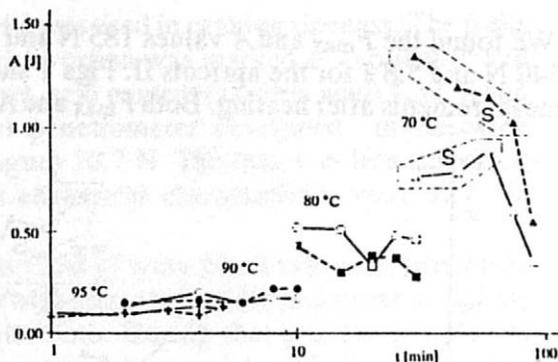
It is evident that texture differences between fruit heated at 90 °C and 95 °C were low even when comparing apricots of different ripeness. In this case the softening of tissue reached such an extend that the effect of other factors could not be observed as confirmed also by sensory tests

We found out the greatest texture differences between riper and less ripe apricot at the lowest tested temperature, i. e. 70 °C, after 30 minutes of heating when the F_{max} value for riper fruit was about one the third (36 %) lower then for less ripe ones. At 80 °C this difference diminished and at temperatures above 90 °C, as stated above, it was not significant. Considering that the difference for fresh apricots was nearly 50 % we can conclude that the higher intensity of heat treatment the lower texture difference for fruit of various ripeness.

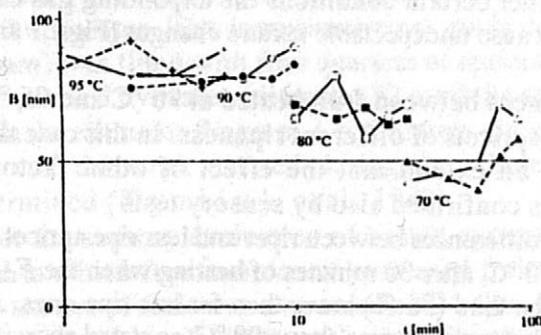
Comparing the texture of fresh apricots and fruit heated at 70 °C for 30 minutes the maximum force F_{max} and total work A for riper raw material decreased to 23 %, resp. 20 % of the original values. For apricots II these characteristics drop to 19 %, resp. 23 %. The relative changes of texture during heating are obvious from Figs 1 and 2. For example, F_{max} decreased after heating at 95 °C to about 7 N for apricots of both ripeness (3.8 %, resp. 2.1 % of original value of fresh fruit). The changes of A value were similar.

The sensory analyses of sterilized apricots indicated, that acceptable texture corresponded with F_{max} above 37 N and/or A above 0.8 J (values in fields marked with letter S in Figs. 1 and 2). More detailed results of sensory analyses are given in Fig. 3. It is evident that most of tested samples were evaluated as „soft“ or „very soft“, i. e. corresponding $B > 60$ mm. The optimum or slightly harder texture was found for samples heated at 70 °C for less than 60 min (apricots I), and 75 min (apricots II), respectively.

Like reverse extrusion measurements the sensory analyses indicated that apricots texture is affected mainly by the temperature of heating. The effect of

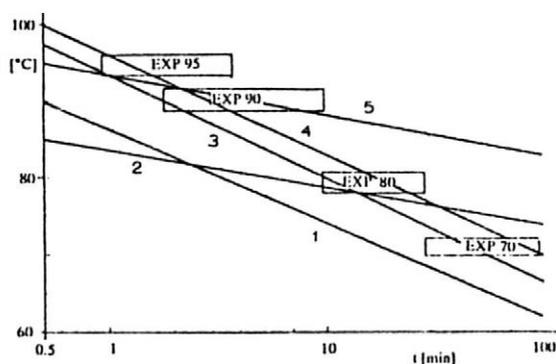


2. Changes of A [J] value during apricots heating at different temperatures



--- apricots I
— apricots II
 B [mm] - graphic scale expression of apricots texture (0 mm corresponds to „very hard“ fruit, 50 mm to optimum texture, 100 mm to „very soft“ fruit)

3. Sensory evaluation of heated apricots



- 1 - thermoinactivation line of microorganisms typical for sterilized fruit products
 2 - thermoinactivation line of *Paecilomyces varioti*
 3 - thermoinactivation line of fruit redoxases
 4 - thermoinactivation line of apricots β -glucosidase
 5 - thermoinactivation line of *Paecilomyces varioti* conidies
 EXP 70, EXP 80, EXP 90 and EXP 95 - area corresponding to conditions during heating at 70, 80, 90 and 95 °C

4. Thermoinactivation lines important for processing of fruit in comparison with the temperature-time characteristics of used heat treatments

heating time is less significant and differences between fruit of various ripeness are evident for apricots heated at lower temperatures.

In Fig. 4 are given the thermoinactivation lines important for sterilization of apricots in comparison with the temperature-time characteristics of used heat treatments. The frames marked EXP 70, EXP 80, EXP 90 and EXP 95 represent the time-temperature conditions during our experiments. It is obvious that treatments corresponding to acceptable texture (i. e. 30 - 75 min at 70 °C, resp. less than 10 min at 80 °C) are sufficient for inactivation of typical microorganisms of acid food and redoxases, but they can fail for inactivation of β -glucosidase, which can split amygdaline in apricot-seeds yielding glucose, benzaldehyde and hydrogen cyanide (K y z l i n k , 1988; V o l d ř i c h et al., 1990) . Such treatments are also insufficient for killing thermoresistent moulds like *Paecilomyces varioti* which must be removed and/or depressed by other way e. g. by more effective washing and/or through deaeration of cans).

References

- BOURNE, M. C.: Texture of fruit and vegetable. In: DEMAN, J.M. - VOISEY, P. W. - RASPER, J. F. - STANLEZ, D. W.: Rheology and texture in food quality. Westport, Connecticut, The AVI Publishing Company, Inc. 1978 : 275.
 ČURDA, D. - DOBIÁŠ, J. - KRČMOVÁ, V.: Effect of deaeration during heating on texture of vegetable tissue. 1993 (prepared for publication).
 KYZLINK, V.: Teoretické základy konzervace potravin. Praha, SNTL 1988 : 234.

KYZLINK, V. - ČURDA, D. - SLAVÍČKOVÁ, A. - PARMOVÁ, M.: Effect of temperature and time of heating on the consistence of apples. Sci. Papers Prague Inst. Chem. Technol., E53, 1982 : 215.

MOHAMMADZADEH-KHAYAT, A. A. - LUH, B. S.: Calcium and oxalate ions effect on the texture of canned apricots. J. Food Sci., 33, 1968 : 493.

VOLDŘICH, M. - KYZLINK, V. - HAVRÁNKOVÁ, H. - HRDLÍČKA, J.: Vliv sterilizačního režimu na obsah kyanovodíku v kompotech z peckového ovoce. Potrav. Vědy, 8, 1990 : 43-50.

Received for publication July 13, 1992

*D. Čurda, J. Dobiáš, P. Žáková (Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav konzervace potravin a technologie masa, Praha)*

Textura sterilovaných meruněk

Byla sledovány změny textury meruněk (odrůdy Velkopavlovická) ve dvou stupních technologické zralosti během sterilace při teplotách 70, 80, 90 a 95 °C a při pěti různých dobách sterilace za každé teploty. Textura byla sledována jednak pomocí reverzní extruze, jednak senzorycky. Rozdíl v textuře mezi plody o různé zralosti klesal se stoupající intenzitou tepelného ošetření. Senzoricky byly nejlépe hodnoceny meruňky zahříváné při nižších teplotách. Jak instrumentální, tak senzorycké hodnocení textury ukázalo, že významnější je spíše teplota než doba sterilizačního záhřevu. Porovnájí-li se instrumentálně zjištěné hodnoty textury syrových meruněk s hodnotami zjištěnými u sterilovaných a senzorycky příznivě hodnocených vzorků (30 min 70 °C), je možné konstatovat, že sledovaný fyzikální ukazatel (práce potřebná k protlačení určitého množství vzorku definovanou štěrbínou) je u sterilovaných meruněk asi pětinašobně nižší než u plodů syrových.

Hodnoty sterilizačních teplot a dob jejich působení, které odpovídaly senzorycky nejlépe hodnocené textuře meruněk (tj. 30 až 75 min při 70 °C nebo méně než 10 min při 80 °C) jsou dostatečné pro inaktivaci běžné mikroflóry kyselých potravin i redoxas, ale již nedostačují pro inaktivaci termorezistentních plísní ani pro inaktivaci β -glukosidasy. Inaktivace posledně zmíněného enzymu by mohla být významná při sterilaci meruněk s peckami, aby u nich nedocházelo k nežádoucímu štěpení amygdalinu za vzniku kyanovodíku vedle glukosy a benzaldehydu.

meruňky; zralost; textura; sterilizace

EFFECT OF PREFRYING ON SENSORY CHARACTERISTICS OF FRENCH FRIES

Lenka KOUŘIMSKÁ-KONÍŘOVÁ, Jan POKORNÝ, Jan VELÍŠEK

*Institute of Chemical Technology - Department of Food Chemistry and Analysis,
Technická 5, CS - 166 28 Praha 6, Czechoslovakia*

French fries were prefried in hydrogenated rapeseed oil, and after finish frying, they were compared with directly fried French fries. Differences in the sensory quality were only moderate in the average, nevertheless, in some cases they were statistically significant. There were linear relationships observed between the appearance and the colour, crispness, and the intensity of crisp sounds produced during the consumption. The appearance and the colour depended on the content of reducing sugars while the content of sucrose had no pronounced influence. The crispness of prefried French fries depended on the starch content after the finish frying. The lipid oxidation in prefried French fries had no significant effect on the intensity of rancid flavour after the finish frying. Results of direct frying give no reliable information on the sensory quality of prefried and finish fried products.

French fries; sensory profile; crispness; texture; reducing sugars; oxidation of frying oil

On the industrial scale, French fries are usually prefried in rather saturated hydrogenated oil, afterwards, they are frozen stored, and immediately before the consumption, they are finish fried in a partially hydrogenated or non-hydrogenated oil. For the prefrying, relatively stable hydrogenated oils are referred, e. g. French fries prefried in hydrogenated soybean oil, and stored at -10 °C were stable for the whole year under frozen storage without any substantial impairment of the sensory quality (Keijbets et al., 1983). For the finish frying, non-hydrogenated vegetable oils may be used in addition to partially hydrogenated oils, such as sunflowerseed or soybean oil (Keijbets et al., 1984).

Hydrogenated oils have, as it is well known, substantially better stability against autoxidation than non-hydrogenated oils, therefore, it is not necessary to replace the hydrogenated frying oil so often during the prefrying as non-hydrogenated oils (Gemert; Hoekman, 1986). Hydrogenated rapeseed oil, which is not otherwise the optimum frying medium, was found suitable for frying of French fries for frozen storage (Bacso et al., 1983)

as under frozen conditions the rancidification is sufficiently inhibited. In addition to hydrogenated oils where linoleic acid has been totally removed by hydrogenation, partially hydrogenated (still liquid) oils were found suitable where linoleic acid partially remained in oil after hydrogenation (Keijbets et al., 1985). The advantage of prefrying is that French fries are partially dehydrated in course of prefrying, and the sorption of oil during finish frying is restricted (Gamble, Rice, 1987; Lambert et al., 1990).

Even for the finish frying of prefried French fries, hydrogenated vegetable oils can be used, for instance, hydrogenated soybean oil was found twice more stable than non-hydrogenated oil (Keijbets et al., 1986). During the finish frying, hydrogenated oil present in prefried French fries is partially replaced by the frying oil present in the pan for the finish frying.

In this paper, we compared the sensory quality of French fries directly fried with prefried French fries, finish fried immediately before the consumption. Rapeseed oil hydrogenated to different degree was used in either case.

MATERIAL and METHODS

Material - Prefried French fries were manufactured by industrial frying (Mrazírny Ltd., Mochov, Czechoslovakia) in hydrogenated cooking fat Iva (Setuza Ltd., Ústí nad Labem, Czechoslovakia) which met the requirements of the respective quality standard (ČSN, 1985). Hydrogenated oil Oliol (Palma Ltd., Bratislava, Czechoslovakia) was produced by partial hydrogenation of rapeseed oil, and by removal of solid portion with use of fractionation, the final composition of fatty acids: 1.5 - 3.0 % trienoic, 19.0 - 21.0 % dienoic and 57.5 - 61.0 % monoenoic fatty acids. Potato varieties used for direct frying and prefrying-finish frying were the same (supplied by Mrazírny Ltd., Mochov). Potatoes contained 13.0 - 18.0 % starch, 0.02 - 0.21 % reducing sugars before the inversion, and 0.14 - 0.80 % after the inversion.

Procedure - Potato slices were cut into pieces 40 - 50 mm x 10 mm x 10 mm, and fried in the frier Philips (Nova, Model 2802.00, Belgium), filled in the beginning with 2.5 kg oil. After heating up to 170 °C (within 7 min) three to four portions were gradually fried. The weight of individual batches was about 200 g. In the beginning of frying, the temperature decreased to 130 °C but it increased to 170 °C again during 5 min frying. After dripping off, the samples were served for the sensory evaluation. Frying oil was stored, and the following day used for another experiment. The total number of use was 11 fryings.

Oil was used from prefried French fries by extractions from the homogenized material with the mixture of methanol and chloroform (3 : 1 v/v) after Folch

et al. (1957). The solvent was removed in a rotating evaporator at a temperature of the water bath not exceeding 50 °C.

Analytical Methods - The acid value, content of total polar groups were determined using the IUPAC standard procedure (I U P A C , 1987), and content of total oxidation products was determined by reverse phase HPLC on silicic acid C18 column (P á n e k et al., 1989). The degree of degradation of frying fat was determined using colour test-tube tests (VERI-FRY produced by Libra, Piscataway, NJ, USA - B l u m e n t h a l , 1990). The content of reducing sugars was determined after Luff and Schoorl, and the starch content after Ewers (D a v í d e k et al., 1977).

The sensory analysis was carried out in a standard laboratory (I S O , 1985a) using the procedure recommended by the international standard (I S O , 1985). The samples were evaluated by a group of trained assessors (I S O , 1989) who passed a 60 h course), and had a practical training of at least further six months.

Before the sensory analysis, the capability of assessors was examined, and before the practical sensory analysis, the assessors were instructed by a test of procedure and control of the checking of a test (I S O , 1985). Before the sensory session the ability and competence of the assessors was checked, and the assessors were instructed on the purpose of the test and on the procedure, and on the way of completing the form.

I. Orientation of graphical scales of the sensory profile of French fries

Characteristic of the sensory quality	Verbal description of the scale	
	left end (0 %)	right end (100 %)
Acceptability of appearance	excellent	very bad
Acceptability of colour	excellent	bad
Intensity of crunchiness	very crunchy	completely plastic
Intensity of crunching sounds	inaudible	very strong
Acceptability of overall flavour	excellent	very bad
Intensity of fried flavour	very strong	not very perceptible
Intensity of rancid flavour	not perceptible	overwhelming
Intensity of overall off-flavour	not perceptible	very strong

Samples of potato strips 20 g each were presented while still hot on white porcelaine dishes provided with a four-digit code number. Between three of four samples were served at a session in randomized blocks. Vodka was served as a flavour neutralizing agent between the samples.

French fries were evaluated with use of sensory profiling (I S O , 1985) with eight descriptors, and using non-structured graphical scales.

The orientation of the graphical scales was achieved using verbal descriptions of the meaning of the two end points (Table I).

RESULTS and DISCUSSION

The set examined consisted of 42 samples of French fries prefried on the industrial scale in frying fat Iva, frozen and stored for several days, and then finish fried in the partially hydrogenated and fractionated oil Oliol. The other set of samples consisted of equally 42 samples of fresh cut potato, directly French fried in the hydrogenated rapeseed oil Iva. In both cases, the same seven varieties of potatoes were used, each used six times. The time of frying was relatively short so that the content of oxidation and hydrolysis products was far below (Table II) the recommended limit (e. g. P o u m e y r o l , 1986). The results obtained with test-tube tests VERI-FRY checking the content of free fatty acids and alkali soaps, were in agreement with chemical methods. The total frying time did not exceed the time recommended (G e m e r t , H o e k m a n , 1986) for hydrogenated vegetable oils. The stability is enhanced by natural antioxidants as well (Kilgore, Bailey, 1970).

II. Degradation degree of oils used for frying

Characteristic investigated	Range of values in p.c.	
	directly fried	prefried and finish fried
Free acids (as oleic)	0.06 - 0.44	0.08 - 0.20
Oxidation products (HPLC)	0.78 - 2.18	1.19 - 2.17
Polar compounds (IUPAC)	1.35 - 4.54	1.98 - 6.33

Average results of the sensory assessment of French fries (Table III) were very close in case of both directly fried and prefried/finish fried samples. The pair test showed, nevertheless, some statistically significant ($P = 95\%$) differences in some cases (Table IV). Prefried samples had worse colour scores after finish frying than directly fried samples, but on the contrary, they were slightly more crispy. The higher crispness may be explained by lower water content in the surface layers of prefried French fries. There was moderate difference observed in the crispy sounds but it did not reach the limit of the statistical significance at $P = 95\%$. The directly fried samples had less intensive fried flavour than prefried/finish fried samples, which was probably caused by

higher content of polyenoic fatty acids in frying medium Oliol compared with the frying fat Iva (P o k o r n ý , 1989).

III. Comparison of sensory profiles of directly fried and prefried-finish fried French fries ($N = 42$)

Characteristic of sensory quality	Average values in p.c. of scale	
	directly fried	prefried and finish-fried
Acceptability of appearance	36.8	38.0
Acceptability of colour	33.6	37.8
Intensity of crunchiness	59.0	50.8
Intensity of crunching sounds	34.1	40.5
Acceptability of overall flavour	41.7	41.6
Intensity of fried flavour	49.4	42.7
Intensity of rancid flavour	22.2	26.6
Intensity of overall off-flavour	26.2	26.5

IV. Relations between the absolute values of some attributes of sensory quality

Sensory characteristic	Higher value found in the given number of cases	
	directly fried French fries	prefried and finish fried French fries
Colour acceptability	15	27
Intensity of crunchiness	30	12
Intensity of fried flavour	35	7
Intensity of rancid flavour	14	28

The critical value ($P = 95\%$) is 28 responses

In the two sets of samples examined we have found considerable variability among the values of most descriptors in the individual samples. Therefore, it was felt important to determine relations between individual descriptors of the sensory profile. We compared each two similar characteristics, in prefried French fries on one hand, and directly fried samples on the other hand (Table V). We have observed close relations between the acceptability of appearance and the acceptability of colour, especially in directly fried samples. As expected, close relations were detected between crispness and the intensity of crisp sounds. On the contrary, no significant correlation was found between the flavour acceptability and the intensity of the fried flavour note. The relation between the intensity of rancid flavour and total off-flavours was significant, but only 36 - 45 % of the total variability of the intensity of off-flavours (R^2) may be explained by the effect of the rancid flavour. This phenomenon is probably caused by low degree of oxidation of frying oil.

V. Relations between the results of evaluations of individual related descriptors in the sensory profile (regression: $Y = aX + b$, $N = 42$)

Kind of French fries	Variables		Constants		Correlation coefficient r
	Y	X	a	b	
M	A	B	0.957	4.60	0.9077 p
N	A	B	0.580	16.05	0.7519 p
M	D	C	-0.915	88.06	-0.9377 p
N	D	C	-0.982	90.33	-0.9559 p
M	E	F	-0.219	52.48	-0.2565
N	E	F	0.114	36.78	0.1247
M	H	G	0.650	11.74	0.6014 p
N	H	G	0.794	5.38	0.6679 p

French fries: M = directly fried; N = prefried and finish fried; Sensory attributes: A = acceptability of appearance, B = acceptability of colour, C = crunchiness, D = intensity of crunching sounds, E = overall flavour acceptability, F = intensity of fried flavour, G = intensity of rancid off-flavour, H = intensity of overall off-flavours,

The values are expressed in p. c. of the graphical scale; p = statistically significant (the probability level $P = 95\%$)

The colour is an important property of French fries. Traditionally, it should be very light yellow but non-enzymic browning reactions take place between reducing sugars and amino acids which impart brown colour to the product, if the content of reducing sugars in raw material is high. The content of glucose is closely correlated with the colour of French fries (Neale, Louwes, 1989; Leszkowiat et al., 1989). The colour of fried product is improved by washing of the intermediary product before the frying (Misra, Chand, 1988). It is sufficient to decrease the glucose concentration in surface layers of the fries, as they are heated to the temperature of oil during frying, and the browning reactions proceed in pronounced degree (Califano, Calvelo, 1988). The critical value is 0.02 % glucose in the raw material (Wisdom, Hilton, 1974). The enzymic removal of glucose improves the colour of fried product as well (Jiang, Oraikul, 1989). The Table VI shows that both the acceptability of appearance and colour depended on the concentration of reducing sugars, even when the correlation coefficients were not so high as those reported in the literature (Murata, Ishihara, 1987). The colour was in no correlation with the sucrose content, which is in agreement with the observation by Chase (1987), and means that sucrose is not significantly cleaved into reducing sugars during the frying.

VI. Relations between the appearance and the colour of French fries and the content of reducing sugars (regression: $Y = a.X + b$, $N = 42$)

Attribute investigated	Frying procedure	Constants		Correlation coefficient r
		a	b	
Acceptability of appearance	M	88.32	26.69	0.6471
	N	66.51	30.31	0.7282
Acceptability of colour	M	66.67	26.02	0.5149
	N	81.20	28.55	0.6858

M = directly fried; N = prefried and finish fried

In case of prefried French fries, the crispness improved with the increasing starch content:

Crispness = $128.18 - 4.8 \times \text{starch}$ ($r = -0.5160$), the lower value corresponding to better crispness. This relation is due to the content of total dry matter (Neale, Louwes, 1989). No such a relationship was observed in case of directly fried raw French fries.

VII. Relations between the results of sensory evaluation of directly fried and prefried-finish fried French fries (regression: $Y = a.X + b$, $N = 42$)

Attribute of sensory quality investigated	Constants		Correlation coefficient r
	a	b	
Acceptability of appearance	0.373	24.28	0.5569
Acceptability of colour	0.319	27.08	0.3493
Intensity of fried flavour	0.337	26.04	0.3741

X = directly fried French fries; Y = prefried and then finish-fried French fries; N = number of pairs of samples; relations significant on the probability level of $P = 95\%$

No relationship was observed between the oxidation degree in the lipid fraction of prefried French fries and the intensity of rancid flavour after finish frying. It is in agreement with other authors (Kirkpatrick et al., 1956). The probable explanation is low residual fat from prefried French fries remaining in finish fried products (Bacso et al., 1973).

We tried to determine in which degree the orientation test with directly fried French fries (from raw material) can affect the sensory value of prefried fries after frozen storage and finish frying. It was found, however, that other frying conditions have such an influence and increase the variability so that statistically significant relations were found only in case of the appearance acceptability,

colour acceptability and intensity of fried flavour (Table VII). Even in these cases, correlation coefficients were rather low because many other factors are, obviously, intervening.

References

- BACSO, M. - PERÉDI, J. - TOLNER, M. K.: Quality of fats used in french fries manufacture. *Olaj, Szappan, Kozmet.*, 22, 1973 : 42-47.
- BLUMENTHAL, M. M.: Validation data on LIBRA VERI-FRY test kits. Piscataway, LIBRA, 1990.
- CALIFANO, A. N. - CALVELO, A.: Adjustment of surface concentration of reducing sugars before frying of potato strips. *J. Food Proc. Preserv.*, 12, 1988 : 1-9.
- CHASE, R. W.: Chipping potato quality: How it can be improved. *Chipper/Snacker*, 8, 1987 : 45-46.
- DAVÍDEK, J. - HRDLÍČKA, J. - KARVÁNEK, M. - POKORNÝ, J. - SEIFERT, J. - VELÍŠEK, J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha, SNTL 1977.
- FOLCH, J. - LESS, M. - SLOANE STANLEY, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 1957 : 497-509.
- GAMBLE, M. H. - RICE, P.: Effect of pre-fry drying on oil uptake and distribution in potato crisp manufacture. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22, 1987 : 535-548.
- GEMERT, L. J. van - HOEKMAN, H.: Effects of type and duration of use of frying fat on the sensory quality of croquettes and french fried potatoes. *Voedingsmiddelentechnol.*, 19, 1986 : 28-33.
- JIANG, Z. - OORAIKUL, B.: Reduction of nonenzymatic browning in potato chips and french fries with glucose oxidase. *J. Food Proc. Preserv.*, 13, 1989 : 175-186.
- KEIJBETS, M. J. H. - EBBENHORST-SELLER, G. - RUISCH, J.: Stability of hydrogenated soybean fat at pre-frying and storage of deep-frozen french fries. *Inst. Bewar. Verwerk. Landbouwprod., Wageningen, Rapp.*, 452, 1983 : 1-31.
- KEIJBETS, M. J. H. - EBBENHORST-SELLER, G. - RUISCH, J.: Deep fat finish-frying of french fries in unhydrogenated soybean oil. *Inst. Bewar. Verwerk. Landbouwprod., Wageningen, Publ.*, 360, 1984 : 1-14.
- KEIJBETS, M. J. H. - EBBENHORST-SELLER, G. - RUISCH, J.: Suitability of hydrogenated soybean oils for pre-frying of deep frozen french fries. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 62, 1985 : 720-724.
- KEIJBETS, M. J. H. - EBBENHORST-SELLER, G. - RUISCH, J.: Deep fat finish frying of french fries in unhydrogenated refined soybean oil. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 88, 1986 : 48-52.
- KILGORE, L. - BAILEY, M.: Degradation of linoleic acid during potato frying. *J. Amer. Diet. Assoc.*, 56, 1970 : 130-132.
- KIRKPATRICK, M. E. - HEINZE, P. H. - CRAFT, C. C. - MOUNTJOY, B. M. - FALATKO, C. E.: French-frying quality of potatoes as influenced by cooking methods, storage conditions and specific gravity of tubers. *USDA tech. Bull.*, 1142, 1956 : 1-46.
- LAMBERG, I. - HALLSTROM, B. - OLSSON, H.: Fat uptake in potato drying/frying process. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 23, 1990 : 295-300.
- LESZKOWIAT, M. J. - YADA, R. Y. - COFFIN, R. H. - STANLEY, D. W. - McKEOWN, A. W.: Chip colour, sugar content and yield of summer potatoes during growth in Southern Ontario. *Can. J. Pl. Sci.*, 69, 1989 : 341-346.
- MISRA, J. B. - CHAND, P.: Improvement of chip colour by removal of colourants from potato tuber slices by water washing. *J. Food Sci. Technol., India*, 25, 1988 : 99-100.

- MURATA, T. - ISHIARA, R.: Relationship between sugar content of potato tubers and chip colour. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 34, 1987 : 443-447.
- NEALE, A. E. F. - LOUWERS, K. M.: Early selection for chip quality and dry matter content in potato seedlings populations in greenhouse or screenhouse. *Potato Res.*, 32, 1989 : 293-300.
- PÁNEK, J. - POKORNÝ, J. - DAVÍDEK, J.: Stanovení oxidovaného podílu jedlých rostlinných olejů kapalinovou chromatografií s vysokou účinností. *Potrav. Vědy*, 4, 1989 : 253-261.
- POKORNÝ, J.: Flavor chemistry of deep fat frying in oil. In: MIN, D. B. - SMOUSE, T. H. (Eds): *Flavor chemistry of lipid foods*. Champaign, IL, American Oil Chemists Soc. 1989 : 113-155.
- POUMEYROL, G.: Study of alternation of frying oils used in catering by determination of the polar compounds. *Rev. fr. Corps gras*, 33, 1986 : 263-268.
- WISDOM, L. W. - HILTON, B. W.: *Potato chips*. U. S. pat., 3,835,222 (1974).
- ČSN 58 0230: *Ztužený pokrmový tuk*. Praha 1985.
- ISO 4121: *Grading of food products by methods using scale categories*. Geneve, International Organization for Standardization, 1978.
- ISO 6658: *Sensory analysis - Methodology - General guidance*. Geneve, International Organization for Standardization, 1985a.
- ISO 6564: *Sensory analysis - Flavour profile*. Geneve, International Organization for Standardization, 1985.
- ISO 8586: *Sensory analysis - General guidance for the selection, training and monitoring of assessors - trained assessors*. Geneve, International Organization for Standardization, 1989.
- ISO 8589: *Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms*. Geneve, International Organization for Standardization, 1988.
- IUPAC: *Commission on fats, oils and derivatives: Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. [PAQUOT, C. - HAUTFENNE, A. (Eds.)], 7th ed. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne, Blackwell Sci. Publ. 1987.

Received for publication April 4, 1991

*L. Kouřimská, J. Pokorný, J. Velíšek (Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav chemie a analýzy potravin, Praha)*

Vliv předsmážení na vlastnosti smažených bramborových hranolků

Dva soubory vzorků bramborových hranolků sestávající z 42 vzorků v sedmi skupinách různých odrůd brambor byly připraveny tímto způsobem: A - vzorky byly předsmáženy za provozních podmínek ve ztuženém řepkovém oleji, pak byly zmrazeny, skladovány po kratší dobu a dosmaženy v částečně ztuženém řepkovém oleji, B - vzorky byly připraveny přímým smažením syrových bramborových hranolků ve ztuženém řepkovém oleji. Přímé smažení i dosmažení proběhlo v domácí fritéze o obsahu 2,5 kg oleje při teplotě 170 °C. Chemické ukazatele a obsah celkových oxidačních produktů (stanovený HPLC) ukázaly, že se olej rozložil jen v malé míře (tab. II). Sensorický profil byl stanoven skupinou školených a zkušených hodnotitelů s použitím nestrukturované grafické stupnice s osmi deskriptory (tab. I).

Průměrné bodové ohodnocení sensorickou analýzou bylo velmi podobné pro oba zkoumané soubory (tab. III), ale před smažené hranolky měly poněkud méně přijatelnou barvu a byly trochu křupavější po dosmažení než syrové vzorky přímo usmažené, ale rozdíly v intenzitě křupavých zvuků byly velmi malé, tedy nevýznamné. Přímě smažené vzorky měly trochu slabší smaženou chuť (tab. IV), což může být způsobeno tím, že olej pro dosmažování měl poněkud vyšší obsah polyenových mastných kyselin, které jsou prekursori smažené chuti.

Obě sady vzorků vykazovaly velkou proměnlivost jak v chemických, tak i senzorických ukazatelích. Velmi těsné byly vztahy mezi příjemností vzhledu a barvy, a mezi křupavostí a intenzitou křupavých zvuků při konzumu (tab. V). Naproti tomu jsme nezjistili žádný vztah mezi příjemností chuti a intenzitou smažené chuti. Korelační koeficient mezi intenzitou žluklé pachuti a celkových pachutí byl dosti nízký, i když byl ještě statisticky průkazný ($P = 95 \%$).

smažené bramborové hranolky; sensorický profil; křupavost; redukcující cukry; oxidace smažicího tuku

KONZISTENČNÍ VLASTNOSTI MODIFIKOVANÝCH MÁSEL

Vladimír FILIP, Ladislav FORMAN, Petr ŠTERN, Zdeněk SVOBODA

Vysoká škola chemicko-technologická - Ústav technologie mléka a tuku,
 Technická 5, 166 28 Praha 6; Ústav pro hydrodynamiku ČSAV, Podbabská 13,
 166 12 Praha 6; Setuza a.s., Žukovova 100, 400 29 Ústí n/L

Konzistence másla chápaná obvykle jako roztíratelnost v širokém teplotním rozmezí 5 až 20 °C se výrazným způsobem uplatňuje při jeho použití. Zlepšení konzistence oproti původnímu máslu představují modifikovaná másla rostlinnými tuky. Je hodnoceno máslo a směsné tuky obsahující 10, 20, 30 a 40 % hm. rostlinného tuku. Konzistence sledovaných tuků byla hodnocena metodou rotační reometrie a penetrometrie, emulze jsou charakterizovány obsahem vody, tuková složka jodovým číslem a obsahem pevných podílů (solid fat index). Byla zjištěna závislost mezi obsahem tuhých podílů a statickou mezí toku (x), resp. zdánlivou viskozitou (η), resp. mezí toku podle Haightona (x) ve tvaru $SFI = a_0 \cdot x^{a_1}$ s korelačním koeficientem větším jak 0,9. Doba skladování jeden až tři týdny při 5 až 7 °C nemá na parametry rovnice významný vliv. Byla potvrzena analogická závislost mezi mezí toku podle Haightona (C) a statickou mezí toku (τ) ve tvaru: $C = a_0 \cdot \tau^{a_1}$ hodnota parametru a_1 je nižší než pro margariny a oba parametry se mění v průběhu skladování jednoho až tří týdnů.

konzistence; máslo; mez toku podle Haightona; obsah tuhých podílů; penetrometrie; rotační reometrie; směsné tuky; statická mez toku; zdánlivá viskozita

Másla modifikovaná rostlinnými tuky a oleji patří do skupiny tzv. směsných tukových pomazánek (F r e d e, 1990). Podle navrženého standardu Mezinárodní mlékařské federace (I D F, 1991), mají směsné tukové pomazánky obsahovat ve své tukové složce více než 10 % a méně než 100 % mléčného tuku. Od roku 1968, kdy byl na trh zaveden první úspěšný výrobek této skupiny, byly v Evropě vyvinuty a na trhu komercializovány desítky dalších. Zmíněné směsné tuky se vyrábí jednak jako plnotučné s obsahem tuku 81 až 83 % (full fat), se sníženým obsahem tuku na 60 až 75 % (reduced fat), nízkým obsahem tuku 35 až 41 % (low fat) a velmi nízkým obsahem tuku 25-27 % (very low fat).

Úspěšnost zmíněných směsných tuků lze spatřovat v tom, že:

- jsou díky zvýšené nenasycenosti tuku a případně nižšímu energetickému obsahu považovány za tzv. zdravé potraviny;
- díky nižším materiálovým nákladům jsou v porovnání s máslem levnější;

c. vlivem vyšší nenасыcenosti tuku jsou v porovnání s máslem lépe roztíratelné i lépe zpracovatelné do těsta.

Na základě provedených průzkumů se ukazuje, že konzument hodnotí u těchto výrobků především chuť, která se jen malou měrou odlišuje od chuti tradičního másla. Na druhém místě hodnotí zlepšenou roztíratelnost ve srovnání s obtížně roztíratelným máslem.

Protože konzistence patří k nejdůležitějším vlastnostem směsných tuků, byla jí věnována předkládaná studie. Práce byla zaměřena na hodnocení vlivu jakosti přísady rostlinného tuku a na hodnocení vlivu technologie na konzistenci modifikovaného másla. Z toho důvodu byly vybrány výrobky čtyř čs. výrobců s různým množstvím a složením rostlinného tuku. Jejich konzistence byla hodnocena v průběhu doby skladování překračující záruční dobu výrobků. Cílem práce bylo zjistit funkční závislosti mezi vybranými texturními parametry a složením triacylglycerolů směsných emulgovaných tuků.

MATERIÁL a METODY

Pro studii byly vybrány komerční výrobky směsných tuků od čtyř výrobců České republiky: AB máslo ze závodů Jindřichův Hradec a Příšovice, obsahující 20 % tukové násady na bázi rostlinného tuku, Zlatá Haná ze závodu v Olomouci, obsahující 30 % tukové násady, modifikované AB máslo ze závodu Příšovice, obsahující 40 % tukové násady a CD máslo ze závodu Č. Lípa, obsahující 10 % rostlinného oleje (údaje vztaženy na 100 % tuku) a dále čerstvé máslo od stejných výrobců, a tedy i se stejným složením mléčného tuku, jednalo se o tzv. zimní máslo. Základní složení a obsah pevných podílů jsou uvedeny tab. I. Vzorky byly skladovány v originálních obalech (Al-fólie) při teplotě asi 5 °C a proměřovány při teplotách 10, 15, 20 a 25 °C s přesností 0,02 °C u rotační reometrie a 0,5 °C u penetrometrie vždy jeden, dva a tři týdny po jejich výrobě. K naplnění rotačního viskozimetru bylo použito nože a vzorek odpočíval 20 min před započítáním měření, u penetrace byly vzorek i penetrometr temperovány na požadovanou hodnotu.

Reologické vlastnosti sledovaných vzorků byly stanoveny pomocí rotačního viskozimetru Rotovisco RV 20 (Haake Mess-Technik, Karlsruhe, BRD) v uspořádání kužel-deska o průměru 30 mm a doplňkovém úhlu 2°. Tokové křivky byly stanoveny v rozsahu smykových rychlostí 0 - 500 s⁻¹. Kužel dosáhl maximální frekvence otáček z klidu při jejich plynulém zvyšování za 60 s a za stejnou dobu se vrátil do klidu. Z tokových křivek byly vyhodnoceny tyto základní reologické parametry: zdánlivá viskozita η_z při maximální aplikované smykové rychlosti $g = 500 \text{ s}^{-1}$ a statická mez toku τ_s , což je maximální hodnota smykového napětí, kterou je nutné překonat, aby u látky došlo v důsledku

mechanického namáhání k viskóznímu toku (obr.1). Penetrace sledovaných vzorků byla měřena na kuželovém penetrometru OFD (VEB Feinmess Dresden, DDR) v 0,1 mm při době penetrace 5 s. Výsledky byly vyjádřeny jako mez toku podle Haightona (H a i g h t o n , 1959):

$$C = k \cdot W \cdot p^{-1,6} \quad [\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}]$$

kde: p - penetrace (0,1 mm)
 W - hmotnost kužele - 102 g s úhlem 20°
 k - konstanta kužele ($k = 19\,000$)

I. Charakteristika emulze a tuku - Characteristic of emulsion and fat

Vzorek ¹	K1 ² [%]	K2 ³ [%0]	JČ ⁴	SFI (%) při teplotě ⁵ [°C]			
				10	20	30	35
1	0	18,4	29,4	48,6	18,1	4,2	0
2	20	18,6	44,9	42,7	15,0	3,7	0
3	0	17,7	29,7	53,2	22,4	5,4	0
4	10	23,1	41,4	46,3	18,5	4,8	0
5	0	17,8	27,1	51,1	21,2	6,3	0
6	30	20,0	58,2	43,9	16,6	3,5	0
7	20	16,6	48,0	44,2	16,5	3,9	0
8	40	16,1	59,5	43,0	16,3	3,7	0

¹sample; ²koncentrace rostlinného tuku vztaženo na tuk - concentration of vegetable fat in fat;
³koncentrace vody v emulzi - concentration of water in emulsion; ⁴iodine number; ⁵solid fat index by temperatures

Obsah pevných podílů v závislosti na teplotě byl určen metodou pulzní NMR (F r e d e , 1990) u izolovaného bezvodého tuku. Korelace mezi uvažovanými veličinami uvažovaná jako $y = a_0 \cdot x^{a_1}$ byla zjišťována metodou nejmenších čtverců v linearizovaném tvaru po log/log transformaci. Vypočtená hodnota korelačního koeficientu r je pak mírou přiléhavosti zvoleného vztahu.

VÝSLEDKY a DISKUSE

Hodnocené směsné tuky a máslo představují z reologického hlediska viskoplastické tixotropní látky. Ukazuje se, že z metod popisujících texturu emulgovaných tuků, se jako nejvhodnější, protože ji popisuje nejkomplexněji, jeví rotační reometrie v uspořádání deska-kužel (Š t e r n , Č m o l í k , 1976). Tato metoda byla s úspěchem použita i pro hodnocení konzistence másla (F o r m a n et al., 1989, 1991). Na rozdíl od penetrometrie, kterou se zjišťuje „tuhost, tvrdost, plasticita“ za statických podmínek (H a i g h t o n , 1959) - tzn. klidovou strukturu, umožňuje rotační reometrie rovněž obdobnou charakte-

rizaci vyjádřenou jako statická mez toku, ale dále umožňuje popis přechodu emulze s vykrystalovanými krystaly triacylglycerolů z tixotropního stavu do stavu chování emulze jako newtonské kapaliny, což lze charakterizovat hodnotami jako dynamická mez toku nebo zdánlivá viskozita. Jestliže se má hodnotit roztíratelnost těchto emulzí, pak právě metoda rotační reometrie v popsaném uspořádání ji velice dobře charakterizuje.

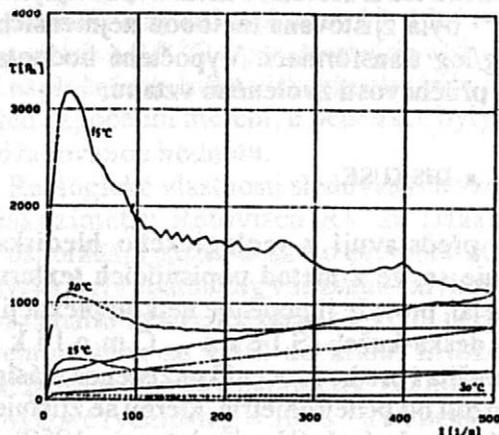
II. Korelace mezi obsahem pevných podílů (SFI) a statickou mezí toku (τ_s) - $SFI = a_0 \cdot \tau_s^{a_1}$ -
Correlation between solid fat index and static yield value

Soubor vzorků ¹	Doba skladování [týdny] ²	a_0	a_1	Korelační koeficient ³ r
1-6	1	0,43	0,493	0,988
1-8	1	0,54	0,471	0,957
1-6	2	0,39	0,496	0,988
1-8	2	0,49	0,476	0,965
1-6	3	0,38	0,494	0,988
1-8	3	0,49	0,472	0,965

Holds for Tables II to V:

¹set of samples; ²storage time; ³correlation coefficient

Složení tuku charakterizované jodovým číslem a obsahem pevných podílů (tab. I) je u čerstvého másla typické pro „zimní máslo“, nicméně i když jeho složení je u tří vzorků podobné ($J\check{C} = 27 - 29$), profil SFI v závislosti na teplotě není identický, největší odchylky jsou zřejmé při 10 °C, tzn., že zastoupení jednotlivých triacylglycerolů se u jednotlivých vzorků odlišuje (Fredrickson, 1990). Přítomnost rostlinného tuku jednak zvyšuje nenasycenost a současně



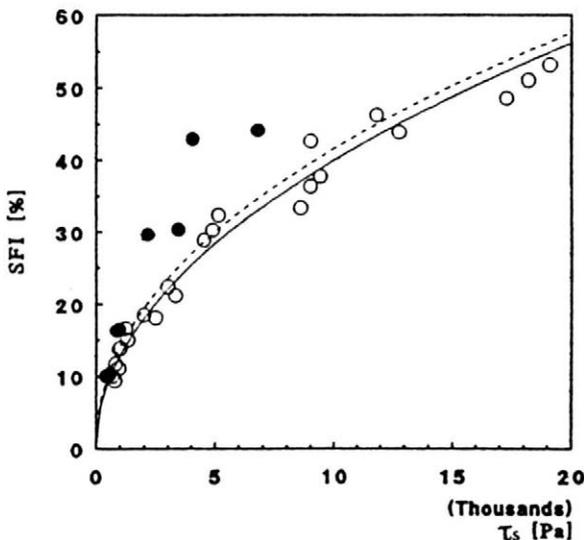
1. Závislost smykového napětí na smykové rychlosti pro máslo při teplotách 15, 20, 25 a 30 °C - Shear stress - versus - speed stress relationship for butter by temperatures 15, 20, 25 and 30 °C

snižuje obsah pevných podílů v závislosti na teplotě, zásadním způsobem zejména při teplotách 10-15 °C.

III. Korelace mezi obsahem pevných podílů (SFI) a zdánlivou viskozitou (η_z) - $SFI = a_0 \cdot \eta_z^{a_1}$ -
Correlation between solid fat content and apparent viscosity

Soubor vzorků ¹	Doba skladování [týdny] ²	a_0	a_1	Korelační koeficient ³ r
1-6	1	12,32	0,534	0,922
1-8	1	13,16	0,530	0,907
1-6	2	11,85	0,534	0,926
1-8	2	12,56	0,532	0,913
1-6	3	11,66	0,522	0,924
1-8	3	12,19	0,528	0,915

Vztah mezi chemickým složením triacylglycerolů a jejich fyzikálními vlastnostmi je předmětem rozsáhlého studia, v posledním období je snaha nalézat korelaci mezi hodnotami chemického složení a veličinami popisující fyzikální vlastnosti. Vztah mezi reologickými parametry a SFI byl zkoumán pro emulgované tuky (Č m o l í k , Š t e r n , 1983), bylo však konstatováno, že závislost je komplikována složením tuku podle jeho původu a zpracování. Pro



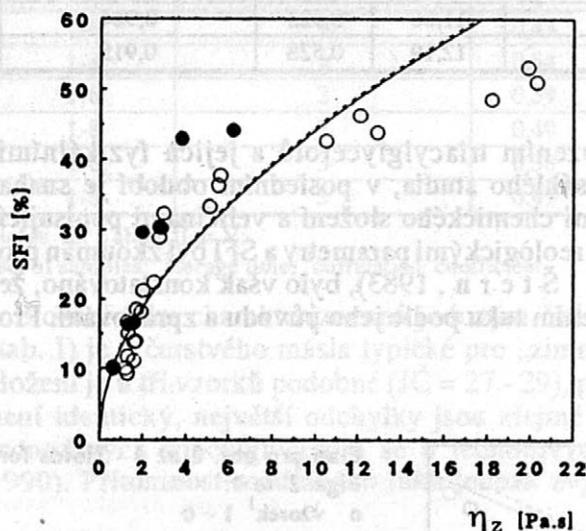
Platí pro obr. 2 až 4 - Holds for Figs. 2 to 4:

- o vzorek¹ 1 - 6
- vzorek 7 - 8
- vzorek 1 - 6
- vzorek 1 - 8

¹sample

2. Závislost obsahu pevných podílů na statické mezi toku; doba skladování jeden týden - Solid fat index - versus - static yield value relationship; storage time of one week

margariny byl nalezen těsný vztah mezi mezí toku podle Haightona a statickou mezí toku ve tvaru $C = \tau_s^{0,9}$, s korelačním koeficientem vyšším než 0,9 (Š t e r n , Č m o l í k , 1981, 1982). U popisovaných emulgovaných tuků - modifikovaných máseł byl zjištěn obdobný obecný mocninový vztah (obr. 5, tab. V), mocninový exponent a_1 je však nižší a hodnota parametru a_0 je větší než 1. Korelační koeficient 0,93-0,96 potvrzuje těsnost předpokládaného vztahu. V závislosti na době skladování se snižuje hodnota parametru a_1 a zvyšuje se parametr a_0 , ale těsnost vztahu zůstává zachována, neprojevuje se rozdíl mezi souborem vzorků 1 až 6 a 1 až 8.



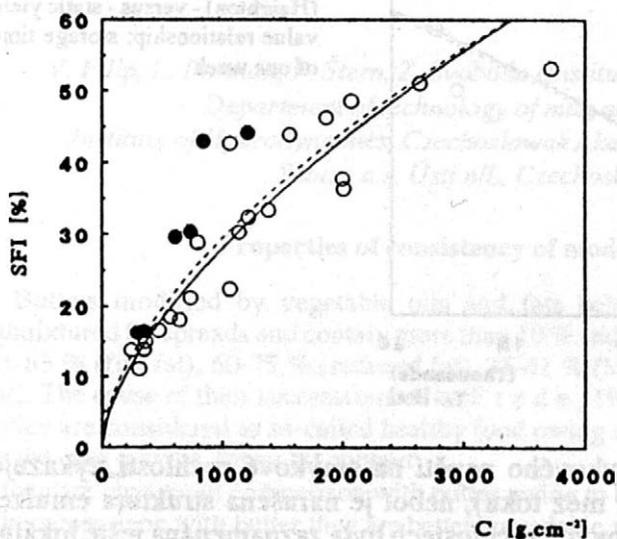
3. Závislost obsahu pevných podílů na zdánlivé viskozitě; doba skladování jeden týden - Solid fat index - versus - apparent viscosity relationship; storage time of one week

Hlavní pozornost byla zaměřena na korelaci mezi reologickými parametry a obsahem pevných podílů - bylo zjištěno, že mezi obsahem pevných podílů a mezi statickou mezí toku (τ_s), zdánlivou viskozitou (η_z) a mezí toku (τ_s) podle Haightona (C) existuje těsný vztah v obecném mocninovém tvaru (obr. 2 až 4, tab. II až IV). Nejlepší přiléhavost byla zjištěna mezi SFI a statickou mezí toku. Ukazuje se, že u souboru vzorků 1 až 6 je dosaženo korelačního koeficientu blízkého jedné, u souboru vzorků 1 až 8 se těsnost vztahu zhoršuje. Z toho vyplývá, že charakter emulzí u vzorků 7 a 8 se zřejmě liší od ostatních vzorků, neboť chemické složení triacylglycerolů všech vzorků je poměrně blízké. Určitým vysvětlením může být rozdíl ve velikosti částic vody u vzorků 7 a 8 (F o r m a n , 1992 - ústání sdělení), což má za následek snížení mezifázového povrchu a tudíž snížení statické meze toku a zdánlivé viskozity.

IV. Korelace mezi obsahem pevných podílů (SFI) a mezi toku podle Haightona (C) - $SFI = a_0 \cdot C^{a_1}$ - Correlation between solid fat content and yield value (Haighton)

Soubor vzorků ¹	Doba skladování [týdny] ²	a_0	a_1	Korelační koeficient ³ r
1-6	1	0,38	0,622	0,939
1-8	1	0,52	0,589	0,907
1-6	2	0,36	0,639	0,948
1-8	2	0,35	0,646	0,937
1-6	3	0,48	0,646	0,937
1-8	3	0,42	0,623	0,937

V průběhu doby skladování dochází k postupné další krystalizaci triacylglycerolů, což se projevuje změnou reologických charakteristik (vzrůst statické meze toku), ale na popisovaný vztah mezi SFI a statickou mezí toku nemá doba skladování vliv. Analogicky lze popsat a vysvětlit vztah mezi obsahem pevných podílů a zdánlivou viskozitou (obr. 3, tab. III) a mezi obsahem pevných podílů a mezi toku podle Haightona (obr. 4, tab. IV). Hodnota korelačního koeficientu je v tomto případě nižší, ale stále větší než 0,9. I v těchto případech je sledovaná závislost nezávislá na době skladování.

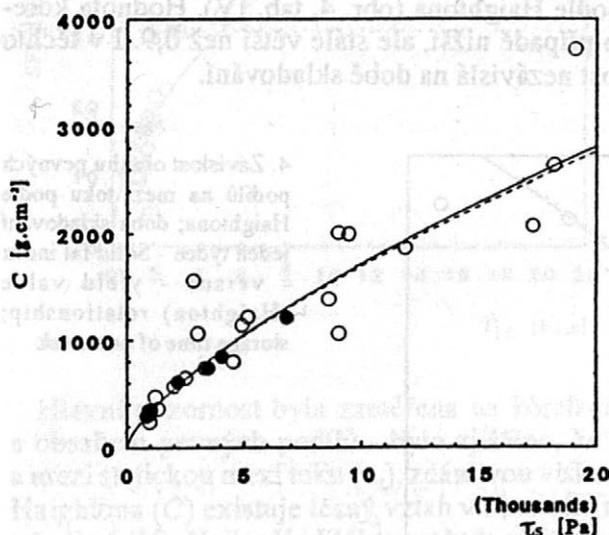


4. Závislost obsahu pevných podílů na mezi toku podle Haightona; doba skladování jeden týden - Solid fat index - versus - yield value (Haighton) relationship; storage time of one week

V. Korelace mezi mezí toku podle Haightona (C) a statickou mezí toku (τ_s) - $C = a_0 \cdot \tau_s^{a_1}$ -
Correlation between yield value (Haighton) (C) and static yield value (τ_s)

Soubor vzorků ¹	Doba skladování [týdny] ²	a_0	a_1	Korelační koeficient ³ r
1-6	1	2,44	0,712	0,962
1-8	1	2,57	0,705	0,968
1-6	2	2,45	0,690	0,965
1-8	2	3,32	0,659	0,954
1-6	3	6,29	0,576	0,940
1-8	3	9,70	0,534	0,933 ^x

Souvislost mezi reologickými charakteristikami a obsahem pevných podílů při různých teplotách je zřejmá z obr.1, neboť se vzrůstající teplotou se plocha hysterezní smyčky zmenšuje. Při teplotě 30 °C, při níž obsah pevných podílů je 3,7 %, se i plocha hysterezní smyčky blíží nule, rovněž tak i statická mez toku.



5. Závislost mezi mezí toku podle Haightona a statickou mezí toku; doba skladování jeden týden - Yield value (Haighton) - versus - static yield value relationship; storage time of one week

Při teplotě 15 °C křivka smykového napětí na smykové rychlosti vykazuje absolutní maximum (statická mez toku), neboť je narušena struktura emulze, a současně i při vyšších smykových rychlostech byla zaznamenána ještě lokální maxima, která pravděpodobně odpovídají destrukci sítě krystalů triacylglycerolů. Zajímavým zjištěním rovněž je, že přidavek rostlinného tuku neovlivňuje charakter tokových křivek.

Literatura

- ČMOLÍK, J. - ŠTERN, P.: Vztah mezi obsahem tuhých podílů v tukové násadě a reologickými vlastnostmi margarínů. In: Sbor. XXII. Sem. technol. a anal. tuků. Břísko 1983, s. 63-65.
- FORMAN, L. - ŠTERN, P. - MATOUŠKOVÁ, E.: Rotational rheometry used for butter consistency evaluation. *Milchwissenschaft*, 44, 1989, s. 761-764.
- FORMAN, L. - MATOUŠKOVÁ, E. - ŠTERN, P.: Studie konzistence másla. *Prům. Potr.*, 42, 1991, s. 305-308.
- FREDE, E.: Industrial process for milk fat spreads. Proc. XXIII. int. Dairy Congr., Montreal 1990, s. 1797-1808.
- FREDE, E.: Der Festfettanteil - ein Klassifizierungsmaßstab für die physikalische Qualität von Milkfett. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 42, 1990, s. 197-218.
- HAIGHTON, A. J.: The measurement of the hardness of margarin and fats with Cone penetrometers. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 36, 1959, s. 345-348.
- ŠTERN, P. - ČMOLÍK, J.: Study of rheological properties of margarine. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53, 1976, s. 644-647.
- ŠTERN, P. - ČMOLÍK, J.: Využití reologie při výrobě emulgovaných pokrmových tuků. *Prům. Potr.*, 32, 1981, s. 300-302.
- ŠTERN, P. - ČMOLÍK, J.: Porovnání reometrie a penetrometrie emulgovaných pokrmových tuků. In: Sbor. XXI. Sem. technol. a anal. tuků. Liblice 1982, s. 62-66.
- IDF Document D-Doc 211/1991

Došlo dne 8. 7. 1992

V. Filip, L. Forman, P. Štern, Z. Svoboda (Institute of Chemical Technology,
Department of technology of milk and fats, Praha;
Institute of Hydrodynamics, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha;
Setuza a.s. Ústí n/L, Czechoslovakia)

Properties of consistency of modified butters

Butters modified by vegetable oils and fats belong to a category of so-called admixed fat spreads and contain more than 10 % and less than 100 % milk fat; usually 81-83 % (full fat), 60-75 % (reduced fat), 35-41 % (low fat), resp. 25-27 % (very low fat). The cause of their successfulness is (F r e d e, 1990)

- they are considered as so-called healthy food owing to increased fat unsaturation and, as the case may be, lower fat content
- they are cheaper in comparison with butter owing to lower production costs
- in comparison with butter they are better spreadable and can be more easily processed into dough because of higher unsaturation of fat.

From the point of view of texture the admixture of vegetable fat represents its improvement in comparison with original butter. It is usually esteemed for its so-called spreadability besides sensuous and nutrient factors. Consistence of these fats is usually watched at the temperature range of 10-25 °C which are temperatures close to the melting

point. Butters in questions contained 10, 20, 30 and 40 % of vegetable fat, emulsion is characterized by water concentration in fat phase, iodine number and solid fat index. The consistence of emulsified fats was evaluated with rotational rheometry method (Štern, Čmolík, 1976) with the definition of static yield value, apparent viscosity and penetration with the definition of flow yield value (Haighton, 1959). It was found out close dependence between solid fat index (SFI), static yield value (x), resp. apparent viscosity (x), resp. yield value according to Haighton (x) in standard power form: $SFI = a_0 \cdot x^{a_1}$ with values of correlation coefficients greater than 0.9. The storage time of emulsified fats from 1-3 weeks at 5-7 °C has not a marked influence on the parameters a_0 and a_1 . An analogic dependence was confirmed between yield value according to Haighton and static yield value, value of the parameter a_1 is lower than for margarines (Štern, Čmolík, 1981). Both the parameters a_0 and a_1 are depending on the storage time of emulsified fat 1 to 3 weeks. The coherence between rheological parameters and solid fat index (SFI) can be seen from the flow curve (Table I). The stretch of this curve comes close to zero with the increasing temperature. The curve shows absolute maximum at the temperature of 15 °C (which is static yield value - at that time the emulsions structure is affected). At higher speeds local maxima were marked, corresponding to the destruction of the triglyceride crystal net. It is notable that admixture of vegetable fat does not affect the character of flow curves.

consistency; butter; yield value (Haighton); solid fat index; penetrometry; rotational rheometry; spreads; static yield value; apparent viscosity

NOVÉ LIPIDY V POTRAVINÁŘSKÝCH HYDROLYZÁTECH BÍLKOVIN

*Jan VELÍŠEK, Tomáš DAVÍDEK, František PUDIL, Jiří DAVÍDEK,
Kateřina LEDAHUFCOVÁ, Marek DOLEŽAL*

*Vysoká škola chemicko-technologická - Ústav chemie a analýzy potravin,
Technická 5, 166 28 Praha 6*

V odpadních huminech z výroby potravinářských hydrolyzátů bílkovin byly nově identifikovány 1-estery 3-amino-1,2-propandiolu s palmitovou, stearovou a olejovou kyselinou, v hydrolyzátech byly přítomny pouze stopy těchto sloučenin. V modelových pokusech byly tyto sloučeniny prokázány jako reakční produkty 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu s amoniakem. V práci jsou uvedena hmotnostní spektra příslušných esterů s kyselinou palmitovou, stearovou, olejovou, linolovou a linolenovou (syntetizovaných látek), koncentrace sloučenin přítomných v huminech a diskutován je mechanismus jejich vzniku z 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu a amoniaku.

3-chlor-1,2-propandiol; estery 3-chlor-1,2-propandiolu; 3-amino-1,2-propandiol; estery 3-amino-1,2-propandiolu; hydrolyzáty bílkovin

Surovinami pro výrobu potravinářských hydrolyzátů bílkovin (chemických hydrolyzátů kyselinou chlorovodíkovou) jsou převážně rostlinné materiály, např. olejinové extrakční šrot. Zpravidla bývá hlavní surovinou sójový šrot, který obsahuje obvykle 1 až 2 % zbytkového tuku (S w e r n , 1964). Zbytkový tuk sójového šrotu tvoří z 60 % fosfolipidy, z esenciálních mastných kyselin převládá kyselina linolová (13 %) a kyselina linolenová tvoří asi 6 % veškerých mastných kyselin. Z dalších mastných kyselin je přítomna kyselina olejová (20 %), palmitová (16 %) a stearová (5 %), asi 0,2 % mastných kyselin je vázáno v lipoproteinech (D a v í d e k et al., 1981). Podobný obsah a složení zbytkových lipidů mají také další suroviny.

Během hydrolyzy bílkovinných surovin kyselinou chlorovodíkovou dochází nejen k rozsáhlé hydrolyze bílkovin, ale také prakticky k totální hydrolyze přítomných lipidů. Hotový hydrolyzát však obsahuje jen nízké množství lipofilních produktů, neboť tyto se z převážné části odstraňují spolu s tzv. huminy filtrací.

Kromě zbytkových lipidů, doprovodných látek lipidů a produktů jejich hydrolyzy byly v hydrolyzátech a v odpadních huminech prokázány také zcela nové, v jiných poživatinách se nevyskytující deriváty mastných kyselin, odvozené od

chlorovaných analogů glycerolu, a to od 3-chlor-1,2-propandiolu a 1,3-dichlor-2-propanolu. V surovém zneutralizovaném hydrolyzátu např. bylo bezprostředně před filtrací přítomno 35 mg diesterů a 4 mg 1-monoestrů 3-chlor-1,2-propandiolu a 8 mg esterů 1,3-dichlor-2-propanolu na 1 kg hydrolyzátu. Obsah těchto esterů v huminech byl sedm až devětkrát vyšší ze shora uvedených důvodů (V e l í š e k et al., 1980).

Identifikované monoestery 3-chlor-1,2-propandiolu jsou právě tak, jako i jiné chlorhydriny poměrně reaktivní sloučeniny. Pravděpodobně, vzhledem k chemickému složení hydrolyzáatů, jsou především jejich reakce s aminosloučeninami, reprezentovanými v hydrolyzátech hlavně aminokyselinami a amoniakem (amonnými solemi). Množství dusíku aminokyselin se na celkovém obsahu dusíku hydrolyzáatů podílí zhruba 50 až 60 %, amoniakový dusík reprezentuje běžně 10 %, ale také až 25 % z celkového obsahu dusíku (P á n e k , 1984).

Účelem této práce bylo studium reakcí 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu s aminosloučeninami přítomnými v hydrolyzátech a identifikace případných reakčních produktů jak v hydrolyzátech, tak i v odpadních huminech. Studium těchto reakcí bylo z počátku omezeno pouze na reakce s amoniakem.

MATERIÁL a METODY

Hydrolyzáty a huminy byly dodány podnikem Vitana Byšice. Estery 3-chlor-1,2-propandiolu a 1,3-dichlor-2-propanolu s vyššími mastnými kyselinami byly syntetizovány (D a v í d e k et al., 1980). Ostatní chemikálie byly výrobky podniku Lachema Brno, čistoty minimálně p. a. (některé chemikálie byly před použitím přečištěny).

Reakce syntetizovaných esterů chlorhydrinů glycerolu byly sledovány v ethanolových roztocích (80 %, v/v) obsahujících buď ester 1,3-dichlor-2-propanolu, diester nebo 1-ester 3-chlor-1,2-propandiolu s palmitovou kyselinou (asi 100 mg látky) a amoniak v 50násobném molárním přebytku. Kyselinou chlorovodíkovou bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 10,0. Reakce probíhala při teplotě 70 °C po dobu 15 hodin, po ochlazení roztoku byly reakční produkty extrahovány chloroformem a zahuštěný extrakt byl analyzován metodou plynové chromatografie (1-estery 3-chlor-1,2-propandiolu a jejich reakční produkty s amoniakem byly analyzovány po předchozí acetylaci).

Lipidy hydrolyzáatů byly získány extrakcí chloroformem z 1 kg vzorku, lipidy huminů (100 g vzorku) byly izolovány extrakcí podle Folche. Alikvotní podíl lipidů byl poté dělen chromatografií na sloupci silikagelu (200 x 20 mm) elucí rozpouštědly o rostoucí polaritě (směsi petroletheru s diethyletherem, samotný diethylether, methanol; objem 100 ml), získané frakce byly po odstranění

rozpuštědel acetylovány ve směsi pyridin-acetanhydrid (3:2, v/v) při 100 °C po dobu 20 minut a analyzovány plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Další alikvotní podíl lipidů (asi 0,5 g) byl nejprve acetylován a poté byly acetylované lipidy děleny na sloupci silikagelu shora popsaným způsobem.

Pro dělení a stanovení látek plynovou chromatografií byl používán chromatograf Hewlett-Packard, model 5890A, vybavený plamenovým ionizačním detektorem a 5m x 0,53 mm křemennou kapilární kolonou (tloušťka filmu 2,65 μm) se stacionární fází HP-1. Teplota kolony byla 250 °C.

Hmotnostní spektra látek byla změřena na přístroji Shimadzu QP-1000, při energii ionizujících elektronů 70 eV, po předchozím rozdělení látek shora popsaným způsobem.

VÝSLEDKY a DISKUSE

Reakce esterů chlorhydrinů glycerolu s amoniakem byla nejprve experimentálně sledována v modelových roztocích obsahujících buď ester 1,3-dichlor-2-propanolu, diester 3-chlor-1,2-propandiolu, nebo 1-ester 3-chlor-1,2-propandiolu s palmitovou kyselinou a amoniak v 50násobném molárním přebytku. Izolované reakční produkty byly analyzovány jednak přímo, jednak po acetylaci. V případě palmitátu 1,3-dichlor-2-propanolu a diesteru 3-chlor-1,2-propandiolu nebyly při této reakci s amoniakem, resp. s amonným pufrům o pH 10, prokázány žádné reakční produkty. Reakcí s monoesterem 3-chlor-1,2-propandiolu (1-palmitoyl-3-chlor-1,2-propan-diolem) vznikal ze 46 % příslušný aminoanalog, to je 1-monoester 3-amino-1,2-propandiolu s palmitovou kyselinou (1-palmitoyl-3-amino-1,2-propandiol).

V hmotnostním spektru této sloučeniny byl základním pík o hodnotě m/z 43 (CH_3CO^+ ; 100 %; sloučenina byla analyzována po acetylaci, tedy jako 1-palmitoyl-2-acetyl-3-amino-1,2-propandiol), dalším intenzivním píkem byl pík o m/z 30 (41,6 %) a dále následovaly ionty, které mají původ ve fragmentaci palmitové kyseliny, to znamená ionty o hodnotách m/z 41, 57, 55, 56 atd. (29,3; 23,0; 21,4; 21,2 %). Diagnosticky významné byly ionty M^+ o m/z 413, $(\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH})^+$ o m/z 350, $(\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CO})^+$ o m/z 310, $(\text{RCOOCH}_3)^+$ o m/z 280, $(\text{M}-\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3)^+$ o m/z 268, $(\text{RCO})^+$ o m/z 239, $(\text{M}-\text{C}_{14}\text{H}_{30})^+$ o m/z 217 (3,4 %) a některé další ionty.

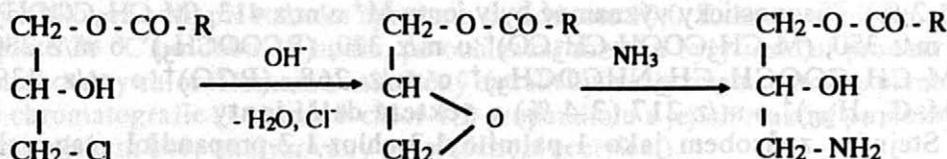
Stejným způsobem jako 1-palmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol reagovaly s amoniakem i odpovídající estery se stearovou, olejovou, linolovou a lino-lenovou kyselinou za vzniku příslušných 1-esterů 3-amino-1,2-propandiolu. Výtěžky těchto sloučenin se jako v případě palmitátu pohybovaly kolem 50 % teoretického množství. Hmotnostní spektra těchto esterů, obsahující pouze významnější ionty, jsou uvedena v tab. I.

I. Hmotnostní spektra 1-esterů 3-amino-1,2-propandiolu s vyššími mastnými kyselinami - Mass spectra of 3-amino-1,2-propanediol 1-esters with higher fatty acids

Ionty ¹	Hmotnostní spektrum ² [%]				
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
(M) ⁺	0,1	0,1	0,6	0,5	-
(M-CH ₂ CO) ⁺	-	-	0,4	0,4	0,1
(M-CH ₃ COOH) ⁺	0,3	0,3	2,0	3,1	1,1
(M-CH ₃ COO-CH ₃ CO) ⁺	0,4	0,5	0,3	0,6	0,2
(M-CH ₃ COOH-CH ₃ CO) ⁺	0,4	0,5	0,6	0,8	0,4
(M-CH ₃ COOCH ₂ CH ₂ NHCOCH ₃) ⁺	0,6	0,8	1,4	0,5	0,2
(RCO) ⁺	2,5	3,1	1,5	1,3	0,5
(RCO-H) ⁺	-	-	1,0	2,2	1,3
(M-RCOO) ⁺	9,6	15,0	36,4	33,3	23,2
(M-RCOOH) ⁺	12,5	19,4	30,2	30,6	19,9
(M-RCOO-CH ₂ CO) ⁺	5,2	9,2	19,1	20,0	15,6
(M-RCOOH-CH ₂ CO) ⁺	16,4	22,9	16,0	18,4	12,9
(CH ₃ CO) ⁺	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
(CH ₂ NH ₂) ⁺	41,6	47,6	37,9	50,8	55,6

¹ ions; ² mass spectrum

S ohledem na to, že vznik aminoanalogů esterů chlorhydrinů glycerolu byl prokázán pouze při reakci 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu s amoniakem lze předpokládat, že reakce probíhá následujícím způsobem, tedy *via* dehydrohalogenace výchozího esteru na epoxid (ester glycidolu, resp. hydroxymethyloxiranu), který potom reaguje s amoniakem za otevření oxiranového kruhu. V menším množství by mohl vznikat také isomerní ester 2-amino-1,3-propandiolu:



Aminoanalogy dalších dvou esterů chlorhydrinů glycerolu, to znamená esterů 1,3-dichlor-2-propanolu a diesterů 3-chlor-1,2-propandiolu by pak musely vznikat substitucí chloru amoniakem, ale jak bylo uvedeno, k této reakci za podmínek pokusu nedocházelo. Aminoanalogy těchto dvou esterů by mohly

také vznikat např. substitucí hydroxylové skupiny příslušných parciálních esterů glycerolu aminoskupinou za vyšších teplot (při teplotě 200 °C během deodorace olejů na příklad vznikají diestery 3-fenylamino-1,2-propandiolu reakcí diacylglycerolů s anilinem - Roncero, Gómez, 1987) nebo také interesterifikací 3-amino-1,2-propandiolu a 1,3-diamino-2-propanolu. Vznik 3-amino-1,2-propandiolu při reakci 3-chlor-1,2-propandiolu s amoniakem v modelových systémech a v hydrolyzátech bílkovin byl rovněž prokázán (Velíšek et al., 1991a).

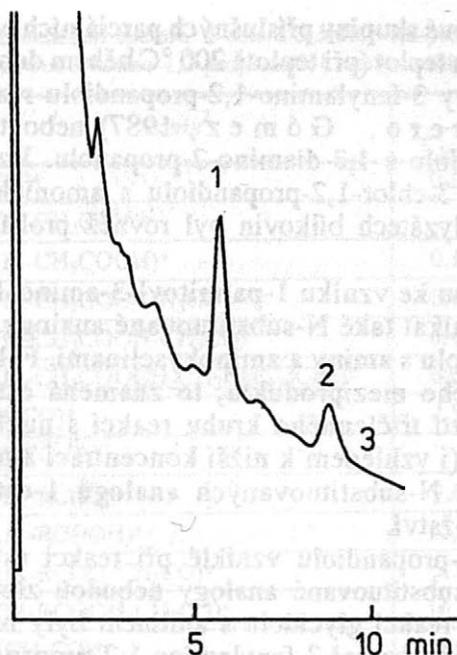
Stejným sledem reakcí, které vedou ke vzniku 1-palmitoyl-3-amino-1,2-propandiolu budou nepochybně vznikat také N-substituované analogy při reakci 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu s aminy a aminokyselinami. Faktorem ovlivňujícím reaktivitu vzniklého meziprojektu, to znamená esteru glycidolu, je zrušení stérického pnutí tříčlenného kruhu reakcí s nukleofilním činidlem. Zřejmě bude proto (i vzhledem k nižší koncentraci aminů ve srovnání s amoniakem) vznikat N-substituovaných analogů 1-esterů 3-amino-1,2-propandiolu menší množství.

Identifikované estery 3-amino-1,2-propandiolu vzniklé při reakci esterů glycidolu s amoniakem a jejich N-substituované analogy nebudou zřejmě jedinými produkty těchto reakcí. Při reakci glycidolu s anilinem byly např. identifikovány jako sekundární produkty, kromě 3-fenylamino-1,2-propandiolu, který vznikal jako hlavní produkt, také další minoritní produkty (Roncero, Gómez, 1987; Roncero et al., 1984).

Analogické reakční produkty lze očekávat také při reakcích 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu s aminokyselinami (Velíšek et al., 1991b).

S ohledem na výsledky získané při sledování reakce esterů chlorhydrinů glycerolu s amoniakem v modelových pokusech, byla možnost této reakce předpokládána také v hydrolyzátech bílkovin během jejich výroby. Vzhledem k tomu, že uvedené reakční produkty, tzn. 1-estery 3-amino-1,2-propandiolu, jsou lipofilní sloučeniny, bylo možné dále předpokládat, že i v případě jejich vzniku v hydrolyzátech bude jejich koncentrace v komerčních hydrolyzátech minimální, a že tyto sloučeniny budou spíše přítomny v odpadních huminech.

Z huminů získaných po filtraci průmyslových zneutralizovaných hydrolyzátů byly lipidy izolovány postupem podle Folche, alikvotní podíl izolovaných lipidů byl dělen chromatografií na sloupci silikagelu a získané frakce byly po acetylaci analyzovány. Ve frakci získané elucí diethyletherem byla prokázána přítomnost 1-palmitoyl-3-amino-1,2-propandiolu. Vzhledem k tomu, že se jednalo o jeden z minoritních píků chromatogramu a ester 3-amino-1,2-propandiolu byl navíc jednou ze složek tohoto píku, nebylo možné stanovit obsah této látky ve vzorku ani identifikovat případné další



1. Dělení 1-esterů 3-amino-1,2-propandiolu izolovaných z huminů metodou plynové chromatografie - Gas chromatographic separation of 3-amino-1,2-propanediol 1-esters isolated from humins

1 = palmitát - palmitate; 2 = stearát - stearate; 3 = oleát - oleate

estery 3-amino-1,2--propandiolu. Alikvotní podíl izolovaných lipidů byl proto nejprve acetylován a vzniklé acetylderiváty byly znovu separovány chromatografií na sloupci silikagelu a získané frakce analyzovány metodou plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Chromatogram jedné z frakcí (eluce diethletherem) je uveden na obr. 1. Porovnáním retenčních indexů a získaných hmotnostních spekter s daty autentických syntetizovaných slou-

čenin byly ve zmíněné frakci acetylovaných lipidů identifikovány 1-estery 3-amino-1,2-propandiolu s palmitovou, stearovou a olejovou kyselinou. Absence esterů linolové a linolenové kyseliny a přítomnost malého množství esteru olejové kyseliny nepřekvapuje, neboť analyzované huminy byly před analýzou skladovány po dobu čtyř let za přítomnosti vzduchu při laboratorní teplotě. V čerstvých huminech budou nepochybně tyto estery rovněž přítomny.

Obsah palmitátu byl 574 mg na 1 kg, obsah stearátu 96 mg na kg a obsah oleátu byl menší než 10 mg na kg huminů.

V hydrolyzátech byl obsah palmitátu 3-amino-1,2-propandiolu tak nízký, že nebylo možné získat jeho hmotnostní spektrum, na přítomnost této sloučeniny bylo usuzováno pouze z retenčních dat příslušného píku chromatogramu.

Uvedené estery 3-amino-1,2-propandiolu, vznikající v hydrolyzátech bílkovin zřejmě dříve popsaným sledem reakcí, byly jako reakční produkty 1-esterů 3-chlor-1,2-propandiolu v hydrolyzátech bílkovin i v poživatinách obecně prokázány prvně. Jejich případné negativní fyziologické účinky, ani účinky jejich N-substituovaných analogů, s výjimkou N-fenylsubstituovaných analogů (Roncero et al., 1984; Roncero, Gómez, 1987) nebyly studovány.

Literatura

- DAVÍDEK, J. - POKORNÝ, J. - VELÍŠEK, J. - HAKLOVÁ, J. - ČMOLÍK, J.: Vliv lipoproteinů na energetický obsah a nutriční hodnotu olejninových extrakčních šrotů. *Krmivářství a Služby*, 17, 1981, s. 38-41.
- DAVÍDEK, J. - VELÍŠEK, J. - KUBELKA, V. - JANÍČEK, G. - ŠIMICOVÁ, Z.: Glycerol chlorohydrins and their esters as products of the hydrolysis of tripalmitin, tristearin and triolein with hydrochloric acid. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 171, 1980, s. 14-17.
- PÁNEK, J.: Bílkovinné hydrolyzáty. [Kandidátská disertace.] Praha, 1984, s. 63. - VŠCHT.
- RONCERO, A. V. - DURÁN, R. M. - CONSTANTE, E. G. - DEL VALLE, C. J.: Nuevos derivados de la anilina en aceites asociados al síndrome tóxico. I. Esteres grasos del 1,2-propanodiol-3-amino-fenilo. *Grasas y Aceites*, 35, 1984, s. 15-21.
- RONCERO, A. V. - GÓMEZ, R.G.: Esteres grasos de 3-arilamino-1,2-propanodiol. *Grasas y Aceites*, 38, 1987, s. 87-92.
- SWERN, D.: *Bailey's industrial oil and fat products.*, New York, London, Sydney, John Wiley and Sons, Inc. 1964.
- VELÍŠEK, J. - DAVÍDEK, J. - KUBELKA, V. - JANÍČEK, G. - SVOBODOVÁ, Z. - ŠIMICOVÁ, Z.: New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates. *J. agric. Food Chem.*, 28, 1980, s. 1142-1144.
- VELÍŠEK, J. - DAVÍDEK, T. - DAVÍDEK, J. - HAMBURG, A.: 3-Chloro-1,2-propanediol derived amino alcohol in protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, 56, 1991a, s. 139-141.
- VELÍŠEK, J. - DAVÍDEK, T. - DAVÍDEK, J. - KUBELKA, V. - VÍDEN, I.: 3-Chloro-1,2-propanediol derived amino acids in protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, 56, 1991b, s. 136-138.

Došlo dne 13.6.1991

J. Velíšek, T. Davídek, F. Pudil, J. Davídek, K. Ledahudcová, M. Doležal
(Institute of Chemical Technology, Department of Food Chemistry and Analysis,
Praha, Czechoslovakia)

New lipids in food protein hydrolysates

Raw materials currently employed for the production of protein hydrolysates (e. g. oil seed meals) contain at least 1 to 2 % of residual fat, 40 % of which represent neutral lipids and almost 60 % phospholipids. These residual lipids react with hydrochloric acid during the hydrolysis process and chlorine-containing analogues of the original esters of glycerol arise as the reaction products. Important groups of these reaction products are esters of 1,3-dichloro-2-propanol, diesters and 1-monoesters of 3-chloro-1,2-propanediol with palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid.

Reactions of these glycerol chlorohydrins esters with ammonia were carried out in model solutions at pH 10 and 70 °C. The individual reaction mixtures were analyzed by gas-liquid chromatography and coupled gas chromatography-mass spectrometry. It was found that esters of 1,3-dichloro-2-propanol and diesters of 3-chloro-1,2-propanediol did not react with ammonia whereas 1-esters of 3-chloro-1,2-propanediol (being reactive

chlorohydrins) gave rise to the corresponding esters of 3-amino-1,2-propanediol. Mass spectra of 1-esters of 3-amino-1,2-propanediol with palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid are summarized in Table I. Mechanism of this reaction involves dehydrochlorination of 3-chloro-1,2-propanediol ester to the corresponding ester of hydroxymethyloxirane (glycidol), the ring of which is then split by a nucleophilic attack of ammonia.

Analysis of commercial protein hydrolysates and the corresponding waste humins revealed the presence of 1-esters of 3-amino-1,2-propanediol with palmitic, stearic and oleic acid. The separation of these esters by gas-liquid chromatography is documented in Fig. 1. The amount of palmitate in waste humins was 574 mg/kg, stearate and oleate were present at a level of 96 and 10 mg/kg, respectively. In liquid commercial hydrolysates only traces of the individual esters of 3-amino-1,2-propanediol were detected.

The identified esters of 3-amino-1,2-propanediol with palmitic, stearic and oleic acid represent a quite new group of protein hydrolysates constituents. Up to now these compounds have not been identified in any other food.

3-chloro-1,2-propanediol; 3-chloro-1,2-propanediol esters; 3-amino-1,2-propanediol; 3-amino-1,2-propanediol esters; protein hydrolysates

STANOVENÍ 4-METHYLIMIDAZOLU V KULÉRU

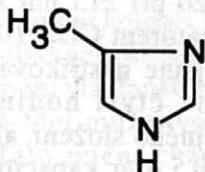
Jitka MORAVCOVÁ, Jan STANĚK, jr., Barbora MÍLOVÁ¹, Jiří JARÝ

Vysoká škola chemicko-technologická - Ústav chemie přírodních látek,
Technická 5, 166 28 Praha 6; ¹Okresní hygienicko-epidemiologická stanice,
360 00 Karlovy Vary

Byla vypracována analytická metoda pro stanovení 4-methylimidazolu (4-Mel), toxické sloučeniny, která je jednou ze složek amoniakálního kuléru a jejíž normami povolená maximální koncentrace je 200 µg/g při optické mohutnosti kuléru 20 000 EBC jednotek. 4-Mel byl extrahován metodou extrakce iontových párů s kyselinou bis(2-ethylhexyl)fosforečnou (DEHPA) do chloroformu, po zpětné extrakci zředěnou kyselinou fosforečnou byl stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na československých CGC kolonách Separon Six C₁₈ nebo Separon SGX C₁₈. Jako mobilní fáze byla používána směs dihydrogenfosforečnanu sodného, vody a methanolu s přídavkem dodecylsulfátu sodného, UV detekce byla prováděna při 215 nm. Kompletní analýza trvala dvě hodiny, detekční limit byl 5 µg 4-Mel na 1 g kuléru. Metoda je vhodná pro servisní účely.

vysokoúčinná kapalinová chromatografie; cizorodé látky; kulér, 4-methylimidazol

Na stanovení 4-methylimidazolu (4-Mel, vzorec I) v amoniakálním kuléru se doposud používá nejčastěji plynová chromatografie. Počet prací zaměřených na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) je podstatně menší (Moravcová, 1991). Společným znakem obou metod je nezbytnost předseparace vzorku před vlastní chromatografickou analýzou. Vzhledem k dostupnosti kvalitních HPLC kolon československé výroby jsme si pro vypracování servisní metody zvolili HPLC. Vycházeli jsme z práce, kterou publikovali Thomsen a Willumsen (1981), kteří používali kolonu plněnou Nukleosilem 5 C₈ a mobilní fází methanol - dihydrogenfosforečnan draselný ($c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$) - voda (32,5:25:42,5) s přídavkem dodekansulfonátu sodného o koncentraci $0,005 \text{ mol/dm}^3$. Za těchto podmínek dosáhli detekční limit 4 µg/g; 4-Mel extrahovali z kuléru ve formě iontového páru s kyselinou bis(2-ethylhexyl)fosforečnou (DEHPA).



Vzorec I

MATERIÁL a METODY

4-Methylimidazol byl obchodní preparát firmy Fluka (Švýcarsko), DEHPA firmy BDH Chemicals Ltd (Velká Británie) a dodecylsulfát sodný firmy Bush Boake Allen (Velká Británie). Hodnoty pH jsme kontrolovali na pH-metru Radelkis OP-211/1 (Maďarsko).

Extrakce 4-MeI z kuléru

Používali jsme upravený postup, který uveřejnili Thom sen, Willu m sen (1981). K navážce 12,5 g kuléru jsme ve 100ml odměrce přidali přibližně 80 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného ($c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$), jehož pH jsme předem upravili na 6,5 přidávkem hydroxidu draselného ($c = 2 \text{ mol/dm}^3$). Po rozpuštění kuléru jsme zkontrolovali pH a znovu dotitrovali hydroxidem draselným na 6,5. Teprve potom jsme odměrku doplnili po rysku roztokem dihydrogenfosforečnanu draselného. Z takto připraveného roztoku jsme odpipetovali 4 ml (0,5 g kuléru) do centrifugační zkumavky, přidali 4 ml roztoku DEHPA v chloroformu ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$), důkladně protřepali a odstředili. Injekční stříkačkou jsme odsáli vrchní, vodnou vrstvu a z chloroformové jsme odpipetovali 2 ml do nové centrifugační zkumavky, kam jsme předložili 2 ml kyseliny fosforečné ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$). Po roztřepání a odstředění jsme vodný podíl z této druhé extrakce používali k analýze HPLC. Takto získaný extrakt kuléru je čirý, bezbarvý až mírně nažloutlý, za nepřístupu světla při 5 °C je stálý po dobu několika týdnů. Analogickým způsobem jsme extrahovali i standardní, kalibrační roztoky 4-MeI.

HPLC na CGC kolonách Separon Six C₁₈

Analýzy jsme prováděli na CGC koloně Separon Six C₁₈ (Laboratorní přístroje Praha). Jako mobilní fázi jsme používali methanol - dihydrogenfosforečnan sodný ($c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$) - voda v poměru 32,5:25:42,5 s dodecylsulfátem sodným (DDS) ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$). Průtok mobilní fáze jsme při laboratorní teplotě udržovali pumpou Varian 8 500 na 15 ml/h. K detekci jsme používali UV detektor Pye Unicam PU 4020 při 215 nm se zapisovačem TZ 4200 (Laboratorní přístroje Praha) a integrátorem CDS 100 (Varian). Pomocí smyčkového dávkovače Rheodyne 7105 jsme nastříkovali 20 µl vodného podílu z druhé extrakce. Kolonu jsme čtyři hodiny kondicionovali, analýzy jsme poté prováděli mobilní fází stejného složení, ale bez přidávku DDS. Doba analýzy byla 70 minut, detekční limit 5 µl/g, kapacitní faktor 4-MeI byl 6,0 a chloroformu 16,1.

HPLC na CGC kolonách Separon SGX C₁₈

Pro analýzy na CGC koloně Separon SGX C₁₈ 5 μm (Tessek sdružení Praha) jsme používali shodné přístrojové vybavení, způsob detekce i průtok mobilní fáze jako v příkladě uvedeném výše s tím rozdílem, že na kondicionaci kolony jsme potřebovali 15 hodin a mobilní fázi s obsahem DDS jsme používali i pro vlastní stanovení. Detekční limit i doba trvání jedné analýzy byly prakticky stejné jako v předchozím případě.

VÝSLEDKY a DISKUSE

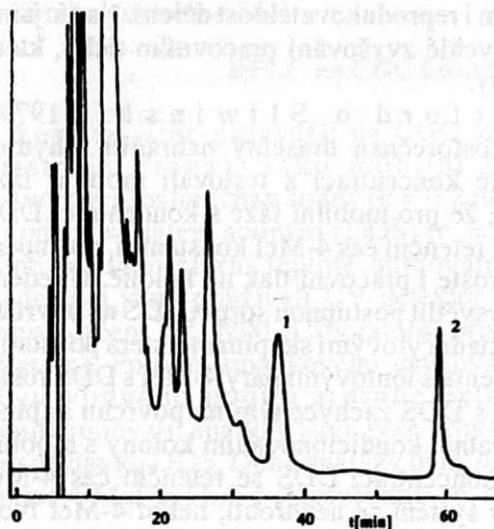
Stanovení 4-MeI ve formě iontového páru s dodekansulfonátem sodným kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (Thomson, Willumson, 1991) dává z metod popsaných v literatuře (Moravcová, 1991) nejlepší výsledky. Pro servisní analýzy kulérů představuje značný problém dostupnost dodekansulfonátu sodného požadované čistoty. Z látek, které jsme zkoušeli jako možnou, u nás dostupnou náhradu, byla nejvhodnější sloučenina podobné struktury, dodecylsulfát sodný (DDS, laurylsíran sodný); pro použití tuzemských CGC kolon jsme optimalizovali postup HPLC právě s tímto činidlem.

Jestliže jsme do mobilní fáze methanol - voda - dihydrogenfosforečnan draselný přidali DDS o stejné koncentraci jako se používá dodekansulfonát sodný, tj. $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, vylučoval se po krátkodobém stání krystalický zákal, který byl tvořen převážně dodecylsulfátem draselným. Chromatografické dělení s touto mobilní fází po filtraci bylo sice velmi dobré, ovšem nemohli jsme dodržet stále složení mobilní fáze, a tím i reprodukovatelnost dělení. Navíc jsme při sériových analýzách pozorovali rychlé zvyšování pracovního tlaku, které vedlo k brzkému znehodnocení kolony.

Podobné těžkosti popisují i Barford a Sliwinski (1979). Z tohoto důvodu jsme dihydrogenfosforečnan draselný nahradili dihydrogenfosforečnanem sodným o shodné koncentraci a testovali mobilní fáze s různým obsahem DDS. Ukázalo se, že pro mobilní fáze s koncentrací DDS v rozmezí 10^{-4} až $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ není retenční čas 4-MeI konstantní, postupem času se prodlužuje a současně s tím roste i pracovní tlak na koloně. Uvedené chování kolony Separon Six C₁₈ lze vysvětlit postupnou sorpcí DDS na povrchu silikagelu ne zcela modifikovaného oktadecylovými skupinami, která podstatně mění vlastnosti náplně. Interakce sorbentu s iontovými páry 4-MeI s DDS roste, 4-MeI může tvořit iontové páry také s DDS zachyceným na povrchu náplně. Tato změna charakteru sorbentu je vratná: kondicionováním kolony s mobilní fází s nižší nebo dokonce nulovou koncentrací DDS se retenční čas 4-MeI postupně opět snižuje, ale analytický systém se nezhroutí, neboť 4-MeI tvoří

iontové páry se zakotveným DDS tak dlouho, dokud se veškerý DDS s povrchu náplně nevymyje. Mobilní fázi bez přídavku DDS se 4-MeI vymývá z kolony bez možnosti tvorby iontového páru a pochopitelně s nulovým objemem kolony.

Tento fakt jsme s výhodou využili pro optimalizaci sériového stanovení 4-MeI. Kolonu Separon Six C_{18} jsme před analýzou kondicionovali čtyři hodiny promýváním mobilní fázi s DDS ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³), kapacitní faktor 4-MeI postupně vystoupil až na hodnotu 6,0. Chloroform, který je v nastříknutém extraktu přítomen a který by při UV detekci při 215 nm mohl se stanovením 4-MeI interferovat, vykazoval za těchto podmínek podstatně vyšší kapacitní faktor. Za tohoto stavu kolony jsme začali analyzovat vzorky extraktu kuléru mobilní fázi methanol - voda - dihydrogenfosforečnan sodný bez jakéhokoli přídavku DDS; postupné zkracování retenčního času 4-MeI pouze vyžadovalo, abychom asi po 20. analýzách znovu kolonu kondicionovali zhruba dvouhodinovým promýváním mobilní fázi s obsahem DDS na opětovné dosažení kapacitního faktoru 6,0 pro 4-MeI. Popisovaná úprava režimu kapalinové chromatografie prodloužila podstatně životnost kolony v porovnání s kolonou trvale promývanou mobilní fázi s obsahem DDS. Typický chromatogram extraktu amoniakálního kuléru obsahujícího 164 μ g na 1 μ g 4-MeI je uveden na obr. 1. Účinnost extrakce a následné analýzy extraktu kapalinovou chromatografií za uvedených podmínek byla 100% v rozmezí koncentrací 4-MeI 58 až 456 μ g/g, relativní směrodatná odchylka vypočítaná z deseti souběžných stanovení 4-MeI ($c = 192$ μ g/g) činila 2,3 % a detekční limit byl 5 μ g/g.



1. Chromatogram extraktu amoniakálního kuléru, CGC kolona Separon Six C_{18} mobilní fáze methanol - dihydrogenfosforečnan sodný ($c = 0,2$ mol.dm⁻³) - voda (32,5:25:42), průtok 15 ml.h⁻¹, UV detekce 215 nm - Chromatogram of an extract of ammonia caramel, CGC column Separon Six C_{18} mobile phase methanol-sodium dihydrogenphosphate ($c = 0.2$ mol.dm⁻³) - water (32.5:25:42.5) flow rate 15 ml.h⁻¹, UV detection 215 nm

1 = 4-MeI (164 μ g.g⁻¹)
2 = chloroform

V průběhu naší práce změnil výrobce (Tessek Praha) náplň v komerčních kolonách, místo Separonu Six C₁₈ používá nyní Separon SGX C₁₈. Změna náplně se odrazila i na chování kolony za vypracovaných podmínek HPLC. Povrch Separonu SGX je podle našich zkušeností více vysycen okta-decylsilylovými skupinami, a jeví podstatně menší tendenci k zachycování DDS z mobilní fáze, změny retenčního času 4-MeI jsou podstatně pomalejší. Při servisních analýzách extraktu kuléru jsme proto postupovali tak, že na kondicionaci i vlastní stanovení 4-MeI jsme používali mobilní fázi s DDS ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Retenční čas 4-MeI mírně narůstá, po několika desítkách analýz dosáhne hodnotu retenčního času pásu chloroformu a obě látky se na koloně nedělí. Dalším kondicionováním se dokonce pás 4-MeI posune až za pás chloroformu. Zkracování retenčního času 4-MeI lze opět dosáhnout promýváním mobilní fází bez přídatku DDS. Výsledky hodnocení účinnosti metody, reprodukovatelnosti i detekční limit byly shodné s údaji uvedenými výše.

ZÁVĚR

Vysokou účinná kapalinová chromatografie na československých CGC kolonách Separon Six C₁₈ nebo Separon SGX C₁₈ je vhodnou analytickou metodou pro stanovení 4-methylimidazolu v kuléru. Vyžaduje jednoduchou a přitom účinnou předseparaci vzorku metodou extrakce iontových párů. Jedna kompletní analýza trvá dvě hodiny, podle účinnosti, přesnosti i citlivosti je srovnatelná s publikovaným postupem (Thomson, Willumsen, 1981). Pomocí této vypracované metody jsme v roce 1987 analyzovali pro VVZ CP Modřany šedesát vzorků amoniakálního kuléru. V případě 40 laboratorních vzorků kolísal obsah 4-MeI v rozmezí 66 až 463 µg/g (počítáno bez ohledu na optickou mohutnost), pro 20 provozních vzorků odpovídal obsah 4-MeI normě WHO.

Literatura

- BARFORD, R. A. - SLIWINSKI, B. J.: Problems related to the use of sodium dodecylsulphate in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 171, 1979, s. 445-447.
 MORAVCOVÁ, J.: Metody stanovení 4-methylimidazolu v kuléru. *Potrav. Vědy*, 9, 1991, s. 307-314.
 THOMSEN, N. - WILLUMSEN, D.: Quantitative ion-pair extraction of 4(5)-methylimidazole from caramel and its determination by reversed-phase ion pair liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 211, 1981, s. 2133-221.

Došlo dne 20. 3. 1991

J. Moravcová, J. Staněk, jr., B. Mílová, J. Jarý (University of Chemical Technology, Department of Chemistry of Natural Compounds, Praha, Czechoslovakia)

Determination of 4-Methylimidazole in Caramel Colours

Caramel colours manufactured by sugar-ammonia or by sugar-ammonia-sulphite processes have been widely used as food colouring additives. Among the imidazole, pyrazine and pyridine derivatives presented in these colours, 4-methylimidazole (4-Mel) is controlled by WHO due its neurotoxicity. The acceptable limit of 4-Mel is specified as 200 mg per g for a caramel colour having a colour intensity of 20,000 EBC units. Routine analytical method for 4-Mel has been developed and it is described in this paper.

4-Mel was extracted from the caramel colour in the form of a ion-pair with bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid in chloroform according to Thom sen and W i l l u m s e n (1981), the optimum pH value of the extraction was found now to be 6.5. The reversed-phase HPLC analysis of an extract was achieved on the CGC column Separon Six C₁₈ using methanol - sodium dihydrogen phosphate ($c = 0.2 \text{ mol/dm}^3$) - water (32.5:25:42.5) as the mobile phase containing sodium dodecylsulphate (DDS) as the counter ion. The retention time of 4-Mel rose with increasing concentration of DDS. However, under constant concentration of DDS, the retention time was not fixed and gradually increased with the ageing of the column (as well as the column pressure). This effect is probably caused by the reversible sorption of DDS on the sorbent surface, thus changing the separation characteristics of the column. Such behaviour proved to be useful for optimization of analytic conditions. Generally, the Separon Six C₁₈ column was eluted with the mobile phase containing DDS ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$) before the first run to reach the value of 6.0 for the capacity factor of 4-Mel. Then, routine analyses were started with the mobile phase having zero concentration of DDS. The observed decrease of the retention time of 4-Mel with time was slow; after approximately 20 runs it was necessary to equilibrate the column again. The life-time of the column was considerably prolonged in this mode when compared to that one eluted with the mobile phase of constant concentration of DDS. The typical chromatogram of an extract of the colour containing 164 µg 4-Mel per gram is depicted in Fig. 1. The recovery of 4-Mel was estimated to be 100 % at 4-Mel concentrations ranging from 58 to 456 µg/g, relative standard deviation calculated from 10 runs at 192 µg/g was 2.3 %, and the detection limit was established to be 5 µg/g.

The modified CGC columns Separon SGX C₁₈ from the same manufacturer (Tessek) were tested in determination of 4-Mel as well. The increase of the retention time of 4-Mel was slower than in the previous case, so that both equilibration and routine analyses could be realized with constant concentration of DDS in the mobile phase, with somewhat lower column life. The recovery, sensitivity, and accuracy estimated for this system were close to those obtained with Separon Six C₁₈ columns. About 60 samples of ammonia caramel colour were analysed in 1987 by these methods, the content of 4-Mel in laboratory samples ranged from 66 to 463 µg/g. All commercial products tested full-filled the above mentioned WHO limit.

HPCL; contaminants caramel colour; 4-methylimidazole

STANOVENÍ REZIDUÍ RŮSTOVÉHO REGULÁTORU PACLOBUTRAZOLU V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

Věra SCHULZOVÁ, Jana HAJŠLOVÁ, Kateřina HOLADOVÁ,
Tomáš ROZTOČIL

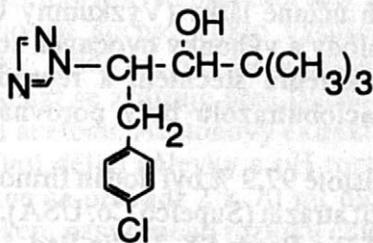
Vysoká škola chemicko-technologická - Ústav chemie a zkoušení potravin,
Technická 5, 166 28 Praha 6

Byla vyvinuta a ověřena analytická metoda pro stanovení reziduí růstového regulátoru paclobutrazolu v rostlinném materiálu (jablka, meruňky, broskve, zelené části rostlin, brambory). Stanovení bylo prováděno GLC metodou s využitím NP detektoru na kapilární koloně HP-5. Alternativní možností stanovení je využití HPLC metody na reverzní fázi C18 s detekcí v UV oblasti. Mez stanovitelnosti obou metod je srovnatelná (0,005 mg/kg pro ovoce a zelené části rostlin a 0,01 mg/kg pro brambory).

paclobutrazol; růstové regulátory; rezidua v rostlinách; GLC; HPLC

Paclobutrazol [(2RS,3RS)-1-(4-chlorfenyl)-4,4-dimethyl-2(H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol] - obr. 1, je nově zaváděný růstový regulátor firmy ICI, dodávaný pod komerčním názvem CULTAR (registrace pod číslem PP-333). Paclobutrazol má ve své molekule dvě chirální centra, resp. asymetrické uhlíkové atomy (C-2 a C-3), triazolový kruh a hydroxylovou funkční skupinu na C-3.

Účinek paclobutrazolu na rostliny spočívá v inhibici syntézy giberelinů (K u t i n a , 1988; W a n g et al., 1986). Přímým morfologickým důsledkem jeho aplikace je snížení vegetativního růstu, zvýšení asimilační schopnosti, reprodukčního růstu, zvýšení tvorby květů, plodů a jejich růstu. Paclobutrazol je používán především k ošetření ovocných stromů (I C I , 1984; R i c h a r d s o n et al., 1986; W a n i c h k u l , 1987), okrasných květin (M e n g e l et al., 1978) a zabránění poléhání obilnin a rýže (M i k u l k a , 1985). Paclobutrazol, obdobně jako některé další triazolové deriváty, vykazuje také fungicidní aktivitu.



1. Struktura paclobutrazolu - Structure of paclobutrazol

Ke stanovení reziduí triazolových fungicidů je nejlépe používána metoda plynové chromatografie (GLC), k detekci je běžně užíván termoionizační dusíko-fosforový detektor (NPD).

Vlastní chromatografické stanovení reziduí paclobutrazolu a ostatních triazolových derivátů, lze provést jak na náplňových, tak i na kapilárních kolonách. Reed (1988) používal ke stanovení reziduí kapilární kolonu 30 m x 0,53 mm DB 17 megabore. Stahl a Buchanan (1986) prováděli stanovení reziduí paclobutrazolu v plodech ošetřených ovocných stromů na skleněné koloně 1,8 m x 2 mm, se stacionární fází 3% OV-17 na Chromosorbu WHP. Mendes (1985) stanovoval deriváty triazolových sloučenin na skleněné koloně 1,8 m x 2 mm, plněné 1,5% OV-101 nebo 3% OV-17 na Chromosorbu W. Firma ICI doporučuje ke stanovení reziduí paclobutrazolu v plodech ovocných stromů a v půdě skleněnou kolonu 0,9 m x 3 mm s navázanou 3% OV-17 na Chromosorbu P nebo skleněnou kolonu 1,4 m x 2 mm naplněnou 10% OV-22 na Chromosorbu WHP (Freeman et al., 1986).

Rezidua triazolových sloučenin lze též stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Separaci je možné provést na oktadecylovaném silikagelu (reverzní fázi), mobilní fází je pak směs methanol - voda a detekce je prováděna v UV oblasti (Borek et al., 1987). Husen et al. (1985) se zabývali separací 16 triazolových pesticidů na koloně plněné silikagelem a jako mobilní fází používali směs hexanu a ethylacetátu.

Cílem předkládané práce byla optimalizace stanovení reziduí paclobutrazolu v různých typech rostlinných maticí. V práci je diskutováno využití plynové chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie jako alternativních instrumentálních koncovek.

MATERIÁL a METODY

Jako zkoumaný materiál byly použity brambory a bramborová nať ošetřené přípravkem Cultar o různých koncentracích účinné látky (Výzkumný Ústav bramborářský Havlíčkův Brod) a ošetřené plody a výhonky ovocných stromů (jablka, meruňky, broskve - VŠZ Brno, katedra šlechtění a reprodukce zahradnických rostlin). Nálezy reziduí paclobutrazolu byly porovnávány s neošetřenými rostlinami.

Chemikálie - Standard paclobutrazolu o čistotě 97,9 % byl dodán firmou ICI (Velká Británie), jako vnitřní standard byl užit atrazin (Supelco Co, USA). Dále byl používán Celit (ICI, Velká Británie) a gel Bio-Beads SX-3 (Bio Rad, USA). Ostatní použité chemikálie byly čistoty p. a. (Lachema Brno), použitá rozpouštědla byla přečištěna (Organičká syntéza, 1977) a předestilována, popř.

redestilována, Síran sodný (Lachema Brno) byl žhán při teplotě 550 °C po dobu pět hodin.

Přístroje - Pro stanovení paclobutrazolu metodou GLC byl používán plynový chromatograf Hewlett Packard 5880 (USA), vybavený dusíko-fosforovým detektorem (NPD).

Analýza reziduí metodou HPLC byla prováděna na kapalinovém chromatografu Hewlett Packard 1090 (USA), rezidua byla detekována v UV oblasti diode-array detektorem HP 1040.

K přečištění vzorků pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) byla používána HPLC pumpa HPP 4001 s nástřikovou smyčkou a dávkovacím kohoutem Rheodyne (USA) o vnitřním objemu 2 ml.

Izolace reziduí paclobutrazolu z rostlinného materiálu

a) Izolace reziduí z jablek, meruněk, broskví a zelených částí rostlin (postup I)

20 g rozmixovaného vzorku se homogenizuje se 4 g Celitu, 20 ml acetonu a 20 ml vody po dobu čtyř minut. Získaný homogenát se zfiltruje přes Buchnerovu nálevku a filtrační koláč se promyje 50 ml vody. Filtrát se převede do 200ml odměrné baňky a doplní po značku vodou. Obsah baňky se převede do 500ml dělicí nálevky, baňka se vypláchne 10 ml vody a hodnota pH se upraví na 11 (roztokem NaOH $c = 1 \text{ mol/l}$). Extrakce se provádí 2 x 70 ml dichlormethanu, případná tvořící se emulze se rozruší přidávkem nasyceného roztoku chloridu sodného (20 ml). Dichlormethanová vrstva se přefiltruje přes žháný síran sodný do 250ml kulaté baňky, síran se promyje 10 ml dichlormethanu. Spojené dichlormethanové extakty se odpaří na vakuové rotační odparce do sucha (40 °C).

b) Izolace reziduí z brambor (postup II)

10 g rozmixovaných brambor se v třecí misce rozetře se 70 g bezvodého síranu sodného do sucha. Takto vysušený vzorek se převede do homogenizační nádoby, přidá se 100 ml acetonu a homogenizuje se čtyři minuty. Získaný homogenát se zfiltruje přes Buchnerovu nálevku a filtrační koláč se promyje 100 ml acetonu. Acetonový extrakt se odpaří do sucha a převede se 2 x 100 ml do 500ml dělicí nálevky a pH roztoku se upraví na 11 (NaOH $c = 1 \text{ mol/l}$). Extrakce se provádí 2 x 70 ml dichlormethanu, tvořící se emulze se rozruší přidávkem nasyceného roztoku chloridu sodného. Dichlormethanová vrstva se přefiltruje přes žháný síran sodný do 250ml kulaté baňky, síran se promyje 10 ml dichlormethanu. Spojené dichlormethanové extakty se odpaří na vakuové rotační odparce do sucha (40 °C).

Přečištění extraktů

a) **Extrakcí na pevnou fázi** - Přečištění rostlinných extraktů bylo prováděno na kolonkách Pressep firmy Tessek, Praha. Analyt byl z kolonek eluován organickými rozpouštědly v různém poměru. Byly testovány tyto čisticí postupy:

Typ kolonky	Kondicionace [ml]	Eluce směsi [ml]	Postup
Separon SGX	hexan (1)	diethylether : hexan 1:9(2), 3:7(2), 1:1(2), 1:0(5)	1
	hexan (1)	diethylether : hexan 1:1(2,2,2), 1:0(5)	2
	hexan (1)	aceton : hexan 1:9(2), 3:7(2), 1:1(2), 1:0(5)	3
	hexan (1)	methanol : hexan 1:9(2), 3:7(2), 1:1(2), 1:0(2)	4
	hexan (1)	methanol : hexan 1:9(2), 1:1(5), 1:0(5)	5
Separon SGX C18	methanol:voda 4:6(1)	methanol : voda 7:3(6), 1:0(4), aceton(4)	6
	hexan (2)	aceton : hexan 1:9(2), 3:7(5), 1:0(5)	7
Separon SGX CN	hexan (2),	aceton : hexan 1:9(2), 3:7(2), 1:1(5), 1:0(5)	8

b) **Gelovou permeační chromatografií** - Přečištění extraktů pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) bylo prováděno na ocelové nerez koloně (50 cm x 0,8 cm) dodané firmou Tessek, naplněné gelem Bio-Beads SX-3. Eluce byla prováděna směsí cyklohexan : chloroform 1:4 a 1:1. Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min.

Podmínky plynové chromatografie - kolona: křemenná kapilární kolona (wide-bore) HP-5 (10 m x 0,53 mm), tloušťka filmu 2,6 µm, se zakotvenou stacionární fází fenylmethylsilikon (5% fenyl) - Hewlett Packard, USA; teplota injektoru: 250 °C; technika nástřiku: splitless (aktivace ventilu 60 s); teplota detektoru: 300 °C; teplotní režim: 60 °C (1 min.), 20 °C/min do 220 °C a 3 °C/min do 250 °C; průtok nosného plynu kolonou (dusík): 5 ml/min; přídavný plyn (make up) - dusík: 25 ml/min; nastříkované množství: 1 µl.

Chromatogramy byly vyhodnocovány technikou vnitřního standardu - roztok atrazinu v isooktanu o koncentraci 0,001 mg/ml. Odparek vzorku byl před analýzou rozpuštěn v 1 ml vnitřního standardu.

Podmínky kapalinové chromatografie - kolona: skleněná kolona 3x150 mm, plněná Separon SGX C18, o zrnění 5µm (Tessek, Ltd. Praha); nastříkované množství: 20 µl; teplota: 40 °C; mobilní fáze: methanol : voda

(70:30 v/v), průtok 0,5 ml/min; detekce: optimalizace detekce diode-array detektorem, rozsah 200-400 nm, šířka pásu 4 nm, měřeno spektrum 222 nm. Vzorek byl před nástřikem rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze.

VÝSLEDKY a DISKUSE

V první fázi práce byl optimalizován postup izolace reziduí paclobutrazolu, dále byl hledán vhodný postup k přečištění extraktů od interferujících látek a na závěr byla ověřena možnost využití jak HPLC, tak GLC pro analýzu získaných přečištěných vzorků.

Izolace reziduí z rostlinného materiálu

Pro úvodní extrakci reziduí paclobutrazolu z ošetřeného rostlinného materiálu byl používán aceton, který se zdál v porovnání s dalšími rozpouštědly (např. acetonitrilem, doporučovaným firmou ICI - F r e e m a n , 1986) nejvhodnějším z hlediska účinnosti, nízké toxicity i cenové dostupnosti (W h e e l e r , 1982). Nejprve byl vypracován izolační postup pro jablka a dále pak použit i pro ostatní druhy ovoce a zeleniny včetně zelených částí rostlin. Při extrakci reziduí z brambor však docházelo k tvorbě stabilních emulzí, které nebylo možné odstranit. Proto byl postup pro izolaci paclobutrazolu z brambor modifikován. Extrakce acetonem byla prováděna až po vysušení vzorku bezvodým síranem sodným. Byla sledována závislost výtěžnosti reextrakce acetonového extraktu dichlormetahanem na hodnotě pH. K účinnější extrakci analytu dochází z alkalického prostředí (pH 11), zřejmě v důsledku potlačení ionizace.

Přečištění extraktů

Z rostlinného materiálu je současně s rezidui paclobutrazolu extrahováno i velké množství koextraktů, které sice nemusí přímo interferovat při stanovení sledované látky, ale mohou přispívat k postupnému zhoršování vlastností chromatografické kolony. Z tohoto důvodu byla hledána možnost přečištění vzorků před vlastním analytickým stanovením. Bylo testováno přečištění tzv. extrakcí na pevnou fázi (solid phase extraction) na kolonkách Presep se silikagelem, oktadecylovaným silikagelem a kyanopropylovaným silikagelem a přečištění gelovou permeační chromatografií na gelu Bio-Beads SX-3.

Při přečištění extraktů na kolonkách Presep nebylo dosaženo zároveň selektivního oddělení reziduí paclobutrazolu od rostlinných koextraktů a uspokojivé výtěžnosti čistícího postupu pro daný analyt.

Na kolonkách plněných silikagelem (postup 1 až 5) byl čistící efekt výrazný, výtěžnost samotného přečištění byla však velmi nízká (do 40 %) a opako-

vatelnost uvedených postupů nebyla uspokojivá. Na kolonkách s vázaným oktadecylem (postup 6 a 7) bylo dosaženo uspokojivé výtěžnosti, čistící efekt byl však minimální.

Šarže kolonek se silikagelem modifikovaným kyanopropylem (postup 8) nebyla pro dané účely použitelná, neboť ze sorbentu byly eluovány nečistoty, které dále interferovaly při analytickém stanovení.

Při čištění rostlinných materiálů na koloně plněné gelem Bio-Beads SX-3 bylo dosaženo při eluci mobilní fází cyklohexan : chloroform (1:1) výrazného oddělení většiny koextraktů. Na základě elučních křivek bylo zjištěno, že analyt je kvantitativně eluován ve frakci 16 až 19 ml. Přečištění všech sledovaných rostlinných extraktů na koloně je výrazné, odstranění koextraktů je účinné, čištění je časově nenáročné a jednoduché. Opakovatelnost čistícího postupu je velmi dobrá, výtěžnost byla $98,0 \pm 4,6$ %. Malá spotřeba rozpouštědel a mnohonásobná použitelnost gelu snižují výrazně náklady na analýzu. Příklad přečištění extraktu jablek na koloně Bio-Beads SX-3 je uveden na obr. 2.

Optimalizace podmínek plynové chromatografie

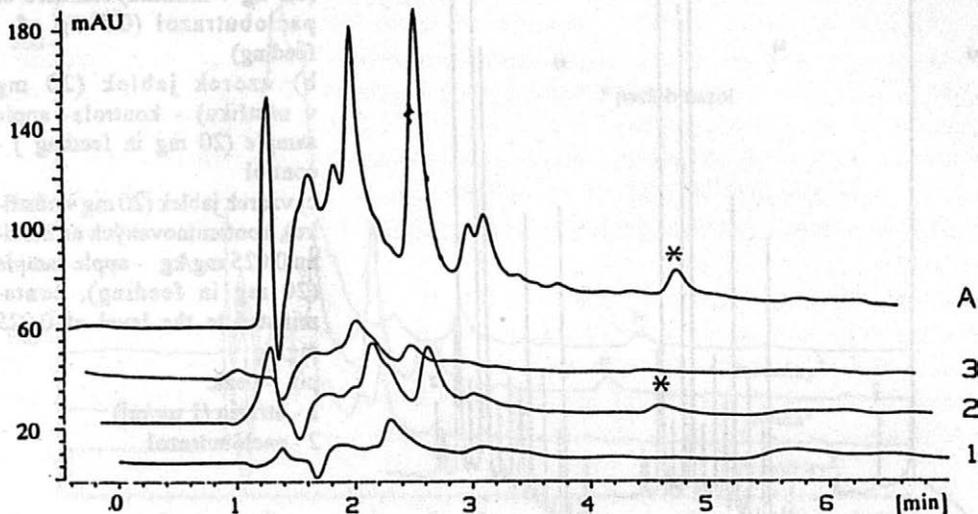
Při optimalizaci podmínek pro stanovení reziduí paclobutrazolu metodou GLC byly testovány různé chromatografické kolony a hledána kolona, na které paclobutrazol poskytuje symetrickou eluční zónu.

Protože při analýze standardních roztoků paclobutrazolu na náplňových kolonách s mírně polárními silikonovými stacionárními fázemi 3% OV-17 a 3% OV-330 pík sledované látky silně chvostoval, byla ověřena možnost použití kolony s přidavkem hydroxidu draselného (3%) ke stacionární fází 5% Apiezon L, který měl potlačit případné interakce bázičského analytu s nosičem. Ani v tomto případě však nebylo dosaženo výrazného potlačení chvostování píků. Proto byla dále užita křemenná kapilární kolona HP-5 se stacionární fází 5% fenylmethylsilikon, na které bylo dosaženo symetrických zón.

Vzhledem k tomu, že paclobutrazol obsahuje ve své molekule několik heteroatomů, byla porovnávána možnost jeho stanovení pomocí dusíko-fosforového detektoru (NPD) a detektoru elektronového záchyty (ECD). Pro další analýzy byl využíván dále jen NPD, neboť detekce EC detektorem byla sice citlivější pro modelové roztoky (detekční limit 0,01 ng v nástřiku), ale při analýze reálných vzorků se použití detektoru s ohledem na jeho nižší selektivitu ukázalo zcela nevhodné.

Pro zlepšení opakovatelnosti analýzy při užití nástřikové techniky (splitless) byl hledán vhodný vnitřní standard. Z testovaných sloučenin nejvíce vyhovoval atrazin (substituovaný chlortriazin).

Detekční limit paclobutrazolu byl při analýze modelové směsi stanoven 0,02 ng v nástřiku, mez stanovitelnosti 0,1 ng v nástřiku. Chromatogram



2. HPLC chromatogram nepřechištěného (A) a prečištěného (1,2,3) extraktu jablka na koloně Bio-Beads SX-3, mobilní fáze cyklohexan : chloroform (1:1) - HPLC chromatogram of unpurified (A) and purified (1, 2, 3) apple extract on the column Bio-Beads SX-3, mobile phase cyclohexane : chloroform (1:1)

A - jablka kontaminovaná na hladinu 0,1 mg/kg - apples contaminated to the level 0.1 mg/kg
frakce - fraction (ml): 1 = 12-15, 2 = 15-19, 3 = 19-22

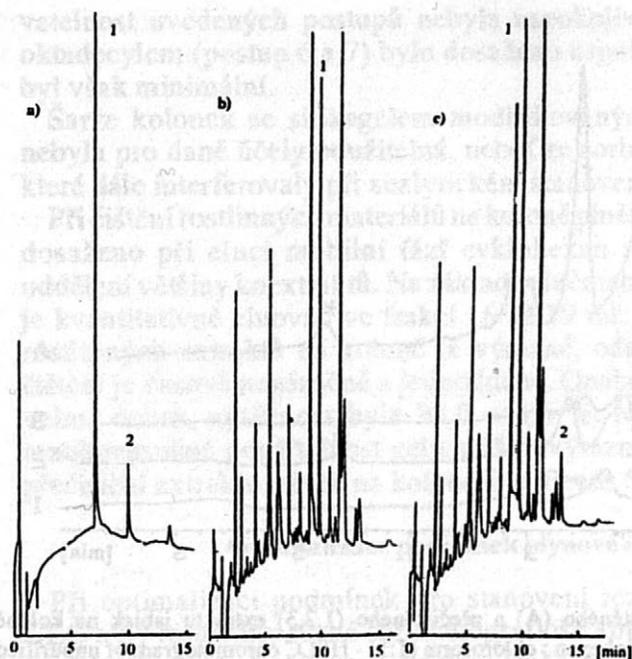
standardu paclobutrazolu je uveden na obr. 3a. Na obr. 3b a 3c je uveden chromatogram kontrolního vzorku jablka a jablka kontaminovaných na hladinu 0,025 mg/kg.

Závislost odezvy NPD na množství injektovaného analytu byla lineární v koncentračním rozmezí 10^{-4} až 10^{-1} μg paclobutrazolu v nástřiku. Z chromatogramů je zřejmé, že s píkem odpovídajícím paclobutrazolu neinterferují žádné koextrakty. Mez stanovitelnosti 0,1 ng v nástřiku odpovídá (pro poměr signálu a šumu 5:1) 0,005 mg/kg pro jablka a ostatní materiál uvedený v postupu I a 0,01 mg/kg pro brambory (postup II).

Optimalizace podmínek kapalnóvé chromatografie

Stanovení reziduí paclobutrazolu v prečištěných extraktech bylo prováděno také metodou HPLC.

Separace byla prováděna na reverzní fázi C18. Jako mobilní fáze byla testována směs methanol : voda v různém poměru. Optimálního rozdělení bylo



a) standard paclobutrazolu (0,5 ng v nástřiku)-standard of paclobutrazol (0.5 ng of feeding)

b) vzorek jablek (20 mg v nástřiku) - kontrola- apple sample (20 mg in feeding) - control

c) vzorek jablek (20 mg v nástřiku), kontaminovaných na hladinu 0,025 mg/kg - apple sample (20 mg in feeding), contaminated to the level of 0.025 mg/kg

pík - peak:

1 - atrazin (1 µg/ml)

2 - paclobutrazol

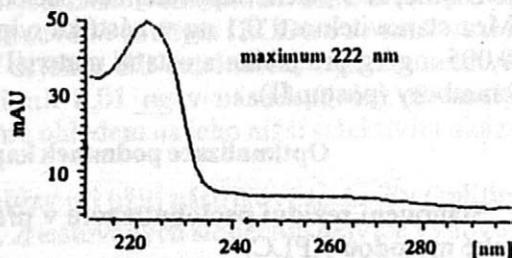
3. GLC chromatogram standardu a extraktu jablek - GLC chromatogram of apple standard and extract

(7:3). Za těchto podmínek byl analyt eluován do pěti minut. Absorbční maximum paclobutrazolu je v dané mobilní fázi 222 nm, absorbční spektrum paclobutrazolu v mobilní fázi methanol : voda (7:3) je uvedeno na obr. 4.

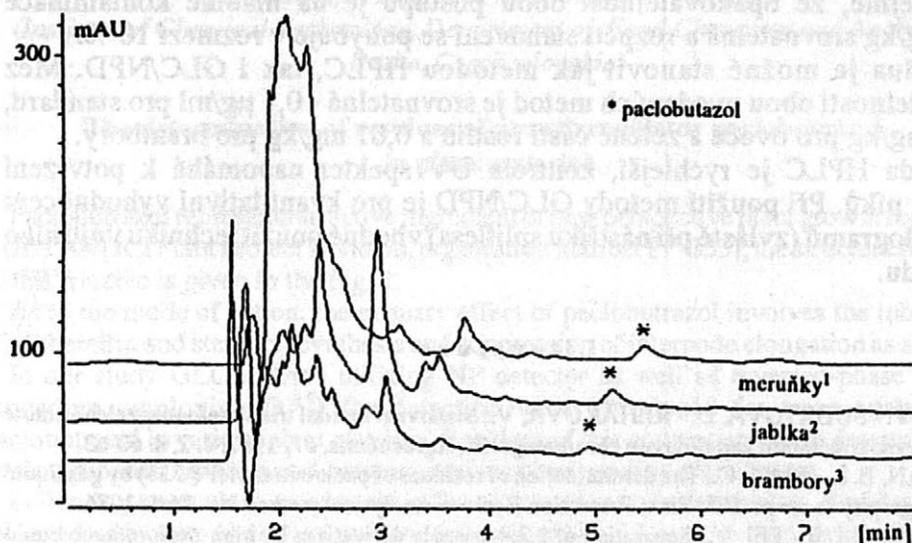
Sledování retenčních časů a současná kontrola čistoty spekter (prováděná pomocí funkce peak purity, instalované v HPLC ChemStation) eluovaných látek přispívá ke spolehlivému potvrzení identity analytu. V analyzovaném materiálu přirozené koextrakty neinterferují se sledovaným analytem (obr. 5).

Závislost odezvy detektoru na koncentraci paclobutrazolu je lineární v rozmezí koncentrací 10^{-4} až 10^{-1} µg v nástřiku.

Mez detekce je pro paclobutrazol za daných podmínek 0,03 µg/ml (0.6 ng v nástřiku), mez stanovitelnosti je 0,1 µg/ml (2 ng v nástřiku), to odpovídá 0,005 mg/kg jablek a ostatního materiálu z postupu I a 0,01 mg/kg brambor.



4. Absorbční spektrum paclobutrazolu - Absorption spectrum of paclobutrazol



5. Extrakty rostlinných materiálů kontaminovaných na hladinu 0,1 mg/kg - Extracts of plant materials contaminated to the level of 0.1 mg/kg

¹apricot; ²apple; ³potatoe

ZÁVĚR

Byla vypracována metoda pro izolaci, přečištění a kvantifikaci reziduí paclobutazolu v ošetřených plodinách.

Ve srovnání s dostupnými pracemi, zabývajícími se příbuznou problematikou, publikovanými na toto téma v literatuře (R e e d , 1988; S t a h l y , B u c h a - n a n , 1986), je zde prezentovaný postup podstatně jednodušší a rychlejší, k čemuž přispívá především optimalizace čisticího kroku, resp. použití GPC.

Výtěžnost izolace reziduí z materiálu kontaminovaného na různé hladiny je uvedena zvláště pro postup I a II. Analytické vyhodnocení výsledků je v tomto případě provedeno metodou GLC.

Hladina kontaminace [mg/kg]	Výtěžnost [%]	
	jablka	brambory
1,00	90,6 ± 5,2	90,1 ± 5,6
0,10	78,5 ± 5,5	82,6 ± 8,8
0,05	74,0 ± 9,3	61,3 ± 9,7

Je zřejmé, že opakovatelnost obou postupů je na hladině kontaminace 0,05 mg/kg srovnatelná a rozpětí stanovení se pohybuje v rozmezí 10 %.

Rezidua je možné stanovit jak metodou HPLC, tak i GLC/NPD. Mez stanovitelnosti obou uvedených metod je srovnatelná - 0,1 µg/ml pro standard, 0,005 mg/kg pro ovoce a zelené části rostlin a 0,01 mg/kg pro brambory.

Metoda HPLC je rychlejší, kontrola UV spekter napomáhá k potvrzení identity píků. Při použití metody GLC/NPD je pro kvantitativní vyhodnocení chromatogramů (zvláště při nástřiku splitless) vhodné použít techniku vnitřního standardu.

Literatura

BOREK, V. - ŠUBRTOVÁ, D. - ŘEHÁKOVÁ, V.: Stanovení reziduí triadimefonu v zelené hmotě ječmene vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. *Agrochémia*, 27, 1987, č. 2, s. 60-63.

FREEMAN, B. L. - MAK, C.: The determination of residues of paclobutrazol (PP 333) by gas liquid chromatography in crops. ICI, Plant Protection Residue Analytical method No. 76/1, 1986.

HSUEN, W. - LI, R. - PEI, Y.: Separation of 1,2,4-triazole derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.*, 356, 1986, s. 433 - 437.

KUTINA, J.: Regulařory rústu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví. Praha, SZN 1988, s. 431.

MENDES, M. C. S.: A gas chromatographic method for the determination of residues of bitertanol. *J. agric. Food Chem.*, 33, 1985, č. 4, s. 557-560.

MIKULKA, S.: Vedlejší účinky paclobutrazolu na plevele. *Agrochémia*, 25, 1985, č. 6, s. 178 - 180.

REED, A. N.: Quantification of triazole and pyrimidine plant growth retardants. *J. Chromatog.*, 438, 1988, s. 393-400.

RICHARDSON, P. J. - WEBSTER, A. D. - QUINLAN, J. D.: The effect of paclobutrazol sprays with or without the addition of surfactants on the shoot growth, yield and fruit quality of apple cultivars Cox and Suntan. *J. Hort. Sci.*, 61, 1986, č. 4, s. 439-446.

STAHLY, E. A. - BUCHANAN, D. A.: Extraction, purification and quantitation of paclobutrazol from fruit tissues. *Hort. Sci.*, 21, 1986, č. 3, s. 534-535.

WANG, S. Y. - BUYN, J. K. - STEFFENS, G. L.: Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system II. Biological and physiological alternations in apple seedlings. *Pl. Physiol.*, 63, 1985, s. 169-175.

WANICHKUL, K.: Die wirkung von paclobutrazol auf das vegetative und generative verhalten von apfelbaumen. [Dissertation.] Bonn, 1987.

WHEELER, W. B. - EDELSTEIN, R. L. - THOMPSON, N. P.: Extraction of pesticide residues from plants. In: MIYAMOTO, J. - KEARNEY, P. C. (Eds): Pesticide chemistry. vol.4. IUPAC, 1982, s. 429-54.

ICI: Plant Protection Division. England, firemní materiály, 1984.

Organická syntéza. Praha, Academia 1977, s. 734.

Došlo dne 17. 6. 1991

V. Schulzová, J. Hajšlová, K. Holadová, T. Roztočil
(Institute of Chemical Technology, Department of Food Chemistry and Analyses,
Praha, Czechoslovakia)

The determination of residues of growth regulator paclobutrazol in plant material

Paclobutrazol represents an active ingredient of new perspective plant growth regulator CULTAR (ICI Plant Protect Division, registration number PP-333), the structure formula of this triazole is given in the Fig. 1.

As to the mode of action, the primary effect of paclobutrazol involves the inhibition of gibberellin and sterol biosynthesis and suppression of internode elongation as a result.

In our study GLC method utilizing NP detector as well as reversed-phase HPLC procedure employing DAD for detection were introduced for trace analysis of paclobutrazol in various plant matrices. Residues of this compound were determined in apples, peaches, apricots and potatoes and in corresponding plant leaves.

Following steps were carried out in the course of sample processing. Residues were extracted with acetone/water mixture, selective liquid-liquid partition into dichloromethane was utilized for isolation of triazole from the aqueous phase after its alkalization. Removal of remaining interfering substances was achieved by gel permeation chromatography on Bio-Beads SX3 column (mobile phase cyclohexane/chloroform 1:1 (v/v)). The recovery of this purification step for standard is 98.0 - 4.6 %. In Fig. 2 there is given the chromatogram of apple extract spiked with paclobutrazol at 0.1 ppm level. The efficiency of clean-up step is here well demonstrated.

GLC separations of purified samples were carried out on HP-5 wide-bore capillary column (10 m x 0.53 mm), utilizing splitless injector mode (60 s), nitrogen was a carrier gas. Internal standard method (atrazin was used as i. s.) was applied for quantization. The GLC chromatograms of paclobutrazol standard and apple extracts are shown in Fig. 3. The detection limit of paclobutrazol is 0.1 ng per injection (1 μ l), i. e. 0,005 ppm in sample.

HPLC separations were carried out on a reversed phase C18 column (mobile phase methanol/water 7:3 (v/v)), detection was carried out at UV spectrum (detector wavelength was set at 222 nm, absorption spectrum of paclobutrazol is in Fig. 4). In Fig. 5 there is given the HPLC chromatogram of extracts of apples, apricots and potatoes spiked at 0.1 ppm level. The detection limit of this procedure was 2 ng of paclobutrazol per injection (20 μ l), i. e. 0.005 ppm in analysed sample.

In table present in the conclusions of this paper there are summarized the recoveries of all analytical procedures for plant materials spiked at 0.05, 0.1 and 1 ppm levels.

paclobutrazol; growth regulator; residues in plant; GLC; HPLC

AD *eko*
A.S.

**VÝHODNÝ LEASING
STROJŮ A ZAŘÍZENÍ
NEJEN PRO ZAČÍNÁJÍCÍ
PODNIKATELE**

ADEKO a. s. Vám nabízí

- kapitálovou účast v jiných podnikatelských subjektech
- společné podnikání
- poradenskou, konzultační a zprostředkovatelskou činnost v oboru ekologie
- investorskou a investiční činnost
- řešení odbytových potíží výrobcům a obchodním organizacím formou leasingového financování

ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2
tel.: 258 342
fax.: 207 229



AKTUALITY

AKTUÁLNÍ POHLEDY NA NĚKTERÉ RIZIKOVÉ FAKTORY VÝŽIVY

Nepříznivý vývoj zdravotního stavu naší populace zákonitě vyvolává i otázky související s „bezpečností“ potravin. Obavy veřejnosti se, s ohledem na rozsáhlou kontaminaci našeho životního prostředí, soustředí zejména na výskyt zvýšených hladin toxických kovů (olova, kadmia, rtuti apod.), z organických látek pak na rezidua pesticidů, polychlorovaných bifenyly (PCB) a dalších antropogenních sloučenin především polychlorovaných dibenzodioxinů (PCDD) a dibenzofuranů (PCDF). Četné diskuse budí i zdravotní riziko vyplývající z používání potravinových aditiv - především konzervačních prostředků, syntetických barviv, aromatizujících látek či antioxidantů. Percepce rizik odborníky je však zásadně odlišná (H a l l , 1992): za prioritní problém je považována otázka mikrobiální kontaminace, mimořádná pozornost je v posledních letech věnována i problematice přírodních toxinů (M o r g a n . F e n w i c k , 1990). Jak vyplývá z následujících příkladů, je zcela mylné se domnívat, že co je „přírodní“ je zdravé či neškodné. Veřejnost totiž často akceptuje zkrácený názor, že existuje definovaná skupina "toxických" chemikálií ohrožujících zdraví člověka, převážně syntetického původu, které je nutné pečlivě sledovat a v maximální možné míře z prostředí eliminovat. Na tomto místě je vhodné připomenout jeden z nejstarších, ale dosud stále platných zákonů toxikologie, který už před 400 lety zformuloval středověký lékař Paracelsus: „... faktorem, který rozhoduje o tom, zda se dostaví negativní účinky na zdraví, je dávka, resp. hladina expozice“. Jinými slovy všechny látky jsou potenciálně "jedovaté".

Známý současný americký toxikolog B. N. Ames v jedné ze svých prací (A m e s , 1991) poukazuje na skutečnost, že i když počet různých biologicky aktivních látek včetně jejich degradačních produktů potenciálně přítomných v naší stravě lze odhadnout na 5 až 10 tisíc, jejich toxicita bohužel nebyla dosud systematicky studována. Ze 427 sloučenin dosud podrobených standardním testům chronické toxicity na myších a krysách připadlo plných 82 % na syntetické sloučeniny - především pesticidy, průmyslové chemikálie, léčiva a aditivní látky. Při expozici experimentálních zvířat dietou relativně vysokým dávkám (maximum tolerated dose) těchto látek, zhruba u poloviny z nich byly prokázány karcinogenní účinky. Zdánilivě překvapivá je skutečnost, že přibližně stejný počet pozitivních výsledků (47 %) bylo prokázáno u souboru 75 testovaných přírodních látek. Z nejrozšířenějších lze jmenovat kyselinu kávovou a její estery (chlorogenová a neochlorogenová kyselina), jež se vyskytují nejenom v pražené kávě, ale i v jablkách, meruňkách, švestkách, hroznovém vínu, hlávkovém salátu, mrkvi apod. Také D-limonen je běžně přítomný v pomerančovém džusu, mangu či v černém pepři, sinigrin, resp. jeho metabolit allylisokyanát je charakteristický pro řadu druhů zeleniny příslušejících k čeledi brukvovitých jako je zelí, kapusta, květák apod., ve vysokém množství jej lze nalézt i v hořčici. Obecně v jednotlivých rostlinných druzích lze nalézt (B e i e r , 1990) až desítky bioaktivních často toxických látek, někdy jsou nazývány přírodními pesticidy

(fytoalexiny), neboť u rostlin se během milionů let vyvinuly jako součást obranného systému proti napadení hmyzem, cizopasnými houbami či predátory. Řada prací přináší údaje o vzrůstu jejich hladin při „poranění“ rostlin či expozici některým exogenním činitelům (např. nízké teploty, ultrafialové záření, ošetření sztetickými pesticidy apod.). V procesu domestikace dnešních kulturních plodin došlo k výraznému snížení hladin přirozených toxinů. Tak např. hlízy divokých brambor (*Solanum acaule*) obsahují třikrát více toxických glykoalkaloidů (solaninu) než běžně pěstované brambory, *Solanum tuberosum*. Je nutné připomenout, že snaha eliminovat v maximální možné míře používání agrochemikálií rezultuje mimo jiné ve šlechtění rezistentních rostlinných druhů, pro které je charakteristický právě vysoký obsah přírodních pesticidů. Velmi ilustrativní (A m e s et al., 1990) je případ nové odrůdy celere s vysokou rezistencí proti napadení hmyzími škůdci. Brzy po jeho zavedení do zemědělské praxe byly zaznamenány četné případy výskytu různých ekzémů u lidí, které tuto plodinu sklízeli. Příčinou těchto potíží, jak bylo posléze ozřejmeno, byly extrémně vysoké hladiny karcinogenních (a mutagenních) derivátů psoralenu (6200 mg/kg - téměř 10x více než u běžných odrůd). Jiným příkladem je nová rezistentní odrůda brambor, která byla před několika lety zavedena v USA. Bez ohledu na vysoké ekonomické ztráty, muselo být od jejího pěstování upuštěno s ohledem na nepřijatelně vysoké hladiny toxických glykoalkaloidů. Výskyt přírodních toxinů však není omezen jen na rostliny. Také živočišné produkty je mohou obsahovat. Příkladem může být kumulace paralytických jedů v měkkých korýších v důsledku výskytu toxického planktonu či řas. Také při skrmování jedovaných rostlin či krmiva kontaminovaného některými mykotoxiny může resultovat v jejich vylučování do mléka.

Podle odhadů amerických toxikologů (A m e s , 1990) denní příjem přírodních toxinů dietou se blíží 1,5 g. V úvahu je třeba vzít i skutečnost, že také při výrobě potravin a zejména tepelné úpravě pokrmů dochází ke vzniku řady nežádoucích látek, někteří autoři předpokládají, že jen množství produktů pyrolýzy v denní dietě činí zhruba 2 g, přičemž mezi nimi lze nalézt řadu karcinogenů jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), heterocyklické amíny, furfural, aromatické nitrované uhlovodíky apod. Tak např. v pražené kávě dodnes bylo identifikováno 826 těkavých sloučenin, 21 z nich bylo toxikologicky hodnoceno na hlodavcích a u 16 byla prokázána karcinogenita. Vezmeme-li v úvahu i přítomnost netěkavé frakce, resp. kyseliny kávové, potom lze dospět k odhadu, že průměrný šálek kávy obsahuje asi 10 mg látek s karcinogenními účinky.

Výše uvedená fakta jistě budí otázku, jak je možné odolávat bez vážného poškození zdraví takovýmto expozicím. Vysvětlením je skutečnost, že člověk si proti mnohým toxinům (které jsou nevyhnutelnou složkou jeho diety) postupně vyvinul účinné obranné mechanismy, přičemž v tomto smyslu není zásadního rozdílu mezi detoxikací látek přírodních či syntetických. Vždyť i ve složení lidské diety v posledních tisíci letech došlo k řadě zásadních změn a mnohé ze sloučenin obsažených např. v kávě, čaji, kakau, kukuřici, avokádu, olivách, zelí, brokolici atd. byly pro organismus „nové“ a musel se na ně adaptovat. Pro mnohé odpůrce chemizace zemědělství jsou jistě poněkud překvapivé závěry, které uveřejnil A m e s (1990). Hodnotíme-li expozici člověka pesticidům,

potom je nutné konstatovat, že 99,99 % odpovídá látkám přírodního původu (denní příjem reziduí „syntetických“ pesticidů dietou se odhaduje na 0,05 mg/kg, což je dávka podstatně nižší než hodnoty používané při testování chronické toxicity). Přes nepochybné přednosti realizace alternativních (biologických) forem zemědělství, zejména pokud jde o ochranu krajiny a přirozených biocenóz, je nutné přijmout - jakkoliv nepopulární - objektivní fakta uváděná citovaným autorem, která ilustrují význam syntetických pesticidů při řešení některých globálních problémů. Tak např. nespornou „zásluhou“ tolik kritizovaného DDT je skutečnost, že v řadě oblastí světa tato látka pomohla prakticky eliminovat malárii a další infekční nemoci přenášené hmyzem. Všeobecně známým důsledkem aplikace použití DDT je bioakumulace jejich reziduí v tukových tkáních živých organismů. Na druhé straně, zatímco u DDT karcinogenní účinky prokázány nebyly, řada produktů sekundárního metabolismu plísň napadajících potravinářské suroviny či produkty jsou vysoce účinné karcinogeny (zejména α -toxiny). Je evidentní, že případná rezidua syntetických pesticidů, resp. fungicidů bránících rozvoji toxikogenní mikroflóry při aplikaci za podmínek tzv. „dobré zemědělské praxe“ reprezentuje pro zdraví člověka podstatně menší riziko. Je třeba zdůraznit, že ochrana sklizně pomocí vhodných agrochemikálií (moderní pesticidy jsou na rozdíl od DDT podstatně perzistentní) umožnila zvýšení výnosů, a tak snížení cen ovoce a zeleniny, což zákonitě přispělo ke zvýšení jejich spotřeby. Právě v těchto produktech je totiž obsaženo vysoké množství přirozených antioxidantů, vitamínů a vlákniny, které jsou považovány za významné antikarcinogeny (Ames, Gold, 1990).

Závěrem je nutné zdůraznit, že problematika hygienicko-toxikologické jakosti potravin vyžaduje komplexní, multidisciplinární přístup - objektivní zohlednění všech nastíněných souvislostí. Jen na takovémto základě pak mohou být přijata rozhodnutí o prioritách výzkumu, kontrolní či monitorizační činnosti, případně navrženy a realizovány progresivní metody výroby, skladování a distribuce potravin. V neposlední řadě by všechny aktuální poznatky měla reflektovat příslušná legislativa i vlastní výživová politika.

Literatura

- HALL, R. L.: Toxicological burden and shifting burden of toxicology. *Food Technol.*, 46, 1992 : 109-112.
 AMES, B. N.: Natural carcinogens and dioxins. *Sci. Total. Environ.*, 104, 1991 : 159-166.
 BEIER, R. C.: Natural pesticides and bioactive components. *Rev. Environ. Food Toxicol.*, 113, 1990 : 48-106.
 AMES, B. N. - PROFET, M. - GOLD, L. S.: Nature's chemicals: Comparative toxicology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1990 : 7782-7786.
 AMES, B. N.: Dietary pesticides (99,99 % all natural). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1990 : 7777-7781.
 AMES, B. N. - GOLD, L. S.: Chemical carcinogenesis: Too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1990 : 7772-7776.
 MORGAN, M. R. A. - FENWICK, G. R.: Natural foodborn toxicants. *Lancet*, 336, 1990 : 1492-1495.

Doc. ing. Jana H a j š l o v á , CSc.
 VŠCHT - Ústav chemie a zkoušení potravin, Praha

INFORMACE

VÝŽIVA A STRAVOVÁNÍ

Na Fakultě potravinářské a biochemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze se na školní rok 1993/1994 plánuje nové atraktivní studijní zaměření "Výživa a stravování". Lidská výživa je obor, který není nikde v Československu vyučován a stravování je rovněž mimo zájem vysokého školství, s výjimkou ekonomiky společného stravování.

Ve studijním plánu se uvažuje se silným teoretickým základem biologickým, chemickým i fyzikálně-matematickým, ale již od třetího ročníku studia se začnou studenti profilovat v uvedeném studijním zaměření studiem chemie potravin, analýzy potravin a využití statistických metod v biologii.

Od čtvrtého ročníku studia má být výuka již plně zaměřena na zvolené studijní zaměření. Do výuky jsou zařazeny přednášky a semináře ze základů výživy, výživové politiky, fyziologické lidské výživy, dále z hygieny výživy a toxikologie výživy. Prakticky zaměřené budou přednášky, semináře a laboratorní cvičení ze základů potravinářské technologie, technologie přípravy stravy a některých vybraných speciálních technologií. Na analýzu potravin navazuje senzorická analýza a jiné speciální metody analýzy potravin, včetně náročných mikrobiologických předmětů. Důležitá je obecná ekonomika a předmět Základy technicko-administrativních prací a marketingu, protože pracovník ve společném stravování musí ovládat i tyto obory. Náplň ročníku doplňuje předmět informatika a literární rešerše, protože zpracování informací je nejvýznamnější náplní přípravy pro moderní technologie. Tyto předměty navazují na dokonalé zvládnutí moderních metod výpočetní techniky v nižších ročnících studia. Výuku završí odborná exkurze a několikátýdenní stáž v závodech společného stravování. Ekonomika výživy je další předmět, který je neobyčejně důležitý v praxi, hlavně v zemi s tržním hospodářstvím.

V pátém ročníku studia budou studenti muset zvládnout metody mikroskopického a mikrobiologického zkoumání potravin a hotových pokrmů, chemické a fyzikálně-chemické analýzy hotových pokrmů a nápojů a technik společného stravování. Dalším předmětem je patofyziologie výživy a dietetika. Strojní vybavení závodů společného stravování zvládnou v předmětu Technika společného stravování a administrativní příprava bude dokončena absolvováním předmětu Rozbory hospodářských činností.

Studium bude ukončeno diplomovou prací, její obhajobou a rigorózní zkouškou ze čtyř hlavních předmětů.

Absolventi budou určeni pro řídicí a výzkumnou činnost v oboru lidské výživy a společného stravování. Jsme přesvědčeni, že zavedení tohoto nového studijního zaměření přispěje ke zlepšení výživy našeho obyvatelstva, a tím i ke zlepšení jeho zdraví a aktivity ve všech oblastech života.

Prof. Jan Pokorný, DrSc.

INFORMATION

Collaboration with the City College of the City University of New York (CCNY)

Positive political changes starting in Czechoslovakia after the Velvet Revolution opened new challenges for wide international collaboration, including with the overseas countries. The representatives of the Faculty of Food and Biochemical Technology embraced this opportunity to establish the conditions for long-term programs with several U. S. universities in teaching, research and other activities. The City College of the City University of New York (CCNY) was the first U. S. institution with which the mutual collaboration became effective and fruitful.

CCNY is the oldest institution in the City University of New York. It was founded in 1847 and moved to its current location on Convent Avenue and 138th Street in 1907. CCNY now occupies a thirty-five acre Gothic and modern campus in historic St. Nicolas Heights. The College reflects the rich ethnic and cultural diversity of New York City, and roughly half of the students were born in one of 80 different countries. It consists of the College of Liberal Arts and Science and five professional schools - the School of Engineering, the School of Education, the School of Architecture and Environmental Studies, the School of Nursing and Medical School. A long list of distinguished CCNY alumni, including seven graduates awarded the Nobel Prize, seven who have been elected to the prestigious National Academy of Sciences and several top-level executives in American business and industry, demonstrates the high standard of this well nationwide known and internationally recognized institution.

The contacts with CCNY already started in 1989 from the initiative of Dean A. S. Posamentier. His understanding for our temporary problems, experience in international relations and wide knowledge of American living style enable us to create promptly a very interesting cooperative program. This effort was fully supported by Professor Bernard W. Harleston, the president of CCNY, and by Professor Čestmír Černý, rector of the Prague Institute of Chemical Technology (PICT), who have signed a Memorandum of Agreement. Then Professor A. S. Posamentier and Professor J. Káň endorsed and submitted a proposal „Integration and Advancement of Environmental Studies in the Biology and Chemistry Curricula“ for the University Affiliation Program competition. This proposal was accepted and granted by the USIA (United States Information Agency) and it was the real beginning of intensive and very effective collaboration. The initiation of the project was further potentiated by the stay of Professor J. Káň at CCNY granted by the Fulbright Foundation. His presence at CCNY enabled to better organize the already running project and in addition, to prepare conditions for the widening of the present contacts to the other professional areas and to prepare a new grant proposal.

The joint project started first by the intense exchange of teaching experience both in Prague and New York. Professor S. Coley gave in Prague a „Laboratory Course of



International collaboration of CCNY: From left - Professor Káš (Prague ICT), Professor Schlieman (Humboldt University, Berlin), astronaut Runco-alumnus of CCNY, Professor Bohm (University of Vienna), Professor B. W. Harleston, President of CCNY, Professor A. S. Posamentier, Dean of the School of Education

Genetic Engineering" (June 1992) and Professor J. Káš gave lectures on „Applied Biochemistry“ at CCNY in the academic year 1991/92. A new lecturing program has been prepared for the fall semester in Prague, where Professor Ch. Russell will give a course of „Biorganic Chemistry“ for graduate students (September 1992) and Professor M. Steinberg will present a very up-to-date course „Fundamentals of Biotechnology“ (November 1992). On the other hand, the course in the field of Chemical Engineering will be given for graduate students at CCNY by Prague's Professor V. Bejček. The research collaboration is realized in close relationship with the above-mentioned teaching activities and in addition, in independent and intense experimental cooperative work mainly in the genetics of microorganisms, water purification and various analytical methods related to the granted environmental project. We can conclude this short report with a statement that the mutual collaboration between CCNY and PICT started well, brings benefits to both institutions, contributes to better understanding between the faculty and students of both countries, improves the university curricula and mainly helps to widen the background for the future cooperation. The good relation between both these institutions has also prepared a good starting point for other universities for the extension of American and Czechoslovak collaboration.

Prof. Jan Káš, D.Sc.

INTERNATIONAL ASSOCIATION
of ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY
INSTITUTE of CHEMICAL TECHNOLOGY,
DEPARTMENT of FOOD CHEMISTRY and ANALYSIS, PRAGUE
CZECHOSLOVAK COMMITTEE on FOOD ADDITIVES and CONTAMINANTS
and
the MINISTRY of ENVIRONMENT

**4th WORKSHOP
ON CHEMISTRY AND FATE OF MODERN PESTICIDES
AND RELATED POLLUTANTS**

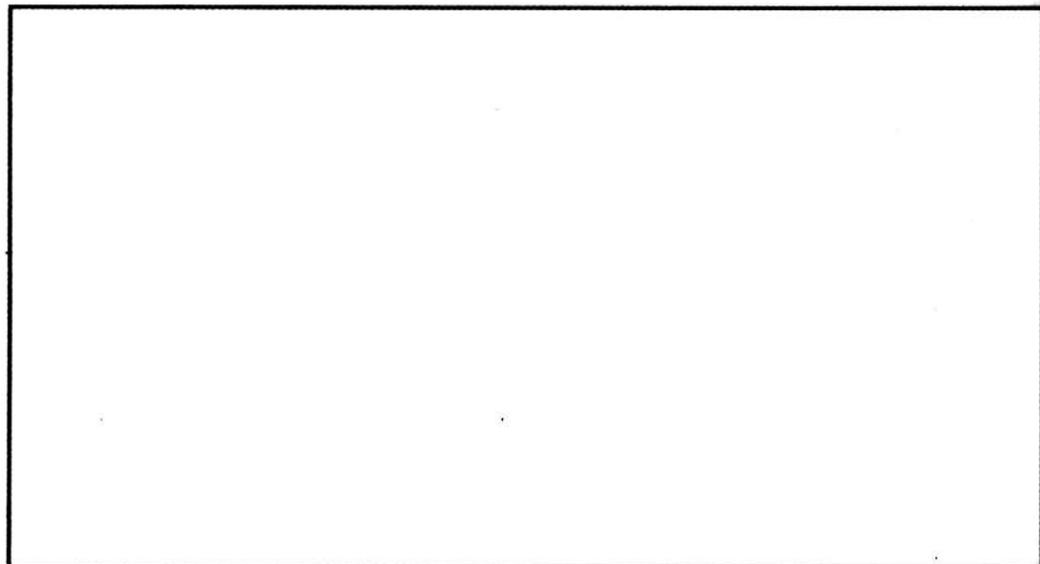
Prague, Czechoslovakia, September 8-10, 1993

Previous Workshops on this topic were held in Amsterdam, NL (1986), Barcelona, E (1987) and Bilthoven, NL (1991). Due to significant environmental problems in Eastern Europe, the previous topic, Modern Pesticides, has been extended with withdrawn pesticides: organo-Cl, PCBs. Environmental chemists, food chemists, analytical chemists, toxicologists and biologists will discuss in an interdisciplinary way relevant scientific problems. Emphasis will be placed on: residue monitoring programs, chemical and biological screening methods, quality control, toxicology and legislation. Advances in analytical techniques, results of ecotoxicological studies etc. will be presented.

Symposium language: English, no simultaneous translation

Sponsors (tentative list): International Association of Environmental Analytical Chemistry, Ministry of the Environment of Czech Republic, J. T. Baker, Hewlett-Packard, Czechoslovakia

Important addresses: Secretary and registration (*only for Czechoslovakia*): Dr. Jana Hajšlová (Chair), Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Technická 5, CS-166 28 Prague 6, Fax: (0422)3119990, 3119919, Tel. (0422)3323185. *For all the other countries:* Marianne Frei-Häusel, P.O. Box 46, CH-4123 Allschwill 2, Switzerland, Fax:: 41-61-4820805



Vědecký časopis POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY • Vydává Akademie zemědělských věd
ČSFR - Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází čtyřikrát
ročně • Redaktorka RNDr. Marcela Braunová • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7,
telefon 25 10 98 • Sazba a tisk ÚVTIZ Praha • © Ústav vědeckotechnických
informací pro zemědělství, Praha 1992

Rozšuuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá admi-
nistrace PNS, doručovatel tisku a Administrace centralizovaného tisku, Kafkova 19,
160 00 Praha 6