ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY

FOOD SCIENCES

4

ROČNÍK 11
PRAHA 1993
CS ISSN 0332-0568

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADÉMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY
FOOD SCIENCES

This journal is covered by Agrindex of FAO (AGRIS database), Food Science and Technology Abstracts, Dairy Science Abstracts, Chemical Abstracts, WLAS, TOXILINE PLUS and Czech Agricultural Bibliography.

REDAKČNÍ RADA — EDITORIAL BOARD

Předseda — Head of the Editorial Board

Ing. Zeno Šimůnek, CSc.

Členové redakční rady — Members of the Editorial Board

ing. Miloslav Adam, CSc., ing. Luisa Benešová, prof. ing. Dušan Čurda, CSc., prof. ing. Jiří Davídek, DrSc., ing. Jiřina Houšová, CSc., ing. Vladimír Hušek, CSc., prof. ing. Ivo Ingr, DrSc., ing. Milan Kováč, CSc., prof. ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. ing. Alexander Príbela, DrSc., prof. ing. Mojmír Rychtera, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc., ing. Jaroslav Vígner, CSc.

Vedoucí redaktorka — Editor-in-chief

RNDr. Marcela Braunová

© Institute of Agricultural and Food Information, Prague 1993

Contact address: Slezská 7, 120 56 Prague 2, Czech Republic, tel. 251 098

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 257-352

35 let trvání Výzkumného ústavu potravinářského v Praze

Přesto, že Výzkumný ústav potravinářský slaví v letošním roce 35. výročí svého vzniku, počátky jeho výzkumné činnosti v oblasti potravinářských technologií, techniky a výživy sahají mnohem dále, prakticky do poválečných let.

V roce 1947 byl na základě vládního usnesení zřízen samostatný organizační útvar - Svaz pro výzkumnictví v průmyslu výživy (SVPV), jehož hlavním posláním bylo plnit úkoly přenesené ze Státního úřadu plánovacího a Ministerstva výživy, koordinovat výzkum s potřebami průmyslu a informovat ústavy i průmyslové závody o všech dosažitelných novinkách. V SVPV byl sestaven první plán výzkumu, přičemž muselo být přihlédnuto k potřebám potravinářského průmyslu a jeho vývoji i k možnostem tehdejší výzkumné základny. Ta se v té době začínala utvářet zřizováním výzkumných ústavů pro jednotlivé obory, ústavy byly postupně začleňovány do SVPV.

V roce 1950 byl pak vyhláškou ministryně výživy zřízen Výzkumný ústav ministerstva výživy z bývalého SVPV a jeho ústavů.

Po více než jednoletém trvání byl tento ústav rozdělen na základní ústavy zabývající se průřezovou problematikou, Výzkumný ústav potravinářské technologie a Výzkumný ústav pro mechanizaci a ekonomiku potravinářského průmyslu a ústavy oborové, jejichž náplní bylo řešit výzkumné problémy příslušných potravinářských oborů.

Výnosem tehdejšího ministerstva potravinářského průmyslu a výkupu byl k 1. 4. 1958 vytvořen Ústřední výzkumný ústav potravinářského průmyslu (ÚVÚPP), který převzal působnost obou svrchu zmíněných průřezových ústavů, dále byl v rámci ústavu utvořen další útvar - Středisko technických informací potravinářského průmyslu a slovenská pobočka ÚVÚPP v Bratislavě, která byla součástí ústavu až do 1. 1. 1969, kdy byl zřízen samostatných Výskumný ústav potravinársky.

V červenci roku 1967 přešel ústav pod přímé řízení zemědělského a potravinářského výzkumu, z něhož později vznikla Česká akademie zemědělská (ČAZ). S účinností od 1. ledna 1969 byl změněn název ústavu na „Česká akademie zemědělská - Výzkumný ústav potravinářského průmyslu". Po zrušení České akademie zemědělské v roce 1974 byl ústav začleněn jako „Výzkumný ústav potravinářského průmyslu" do rezortní vědeckovýzkumné základny ministerstva zemědělství a výživy.

Od svého založení až do roku 1991 byl ústav rozpočtovou organizací a samostatným právním subjektem. Jeho posláním, jako jediného rezortního výzkumného ústavu v oblasti potravinářského průmyslu a výživy, bylo provádět všestranný výzkum a informatiku pro potravinářský průmysl v oborech potravinářské chemie a biochemie, potravinářského inženýrství a automatizace potravinářských výrob, balení a manipulace s potravinářskými výrobky, vývoje a konstrukce unikátních strojních zařízení pro potravinářský průmysl, kompletní ochrany potravinářských surovin, výrobků i provozoven před škůdci živočišného původu. Teritoriální působnost ústavu se vztahovala na území České republiky, na některých úsecích činnosti pak na základě pověření MZVž ČR a dohod s federálním a slovenským ministerstvem byla jeho činnost rozšířena na celou

federální republiku. To se hlavně týkalo funkcí odvětvového informačního střediska pro odvětví výroby potravin a pochutin a meziodvětvového vedoucího pracoviště vědecko-technického rozvoje pro oblast potravinářského průmyslu.

V roce 1992 se ústav stal příspěvkovou organizací, část jeho rozpočtu byla hrazena příspěvkem MZe ČR, zbytek bylo nutné zajistit aktivitami ústavu, které přinášely potřebné finanční zdroje. Ústav zároveň změnil svůj název na „Výzkumný ústav potravinářský Praha". Významným mezníkem bylo rovněž přestěhování ústavu ze starých, již nevyhovujících prostor na Smíchově do nově postavené, moderní budovy v Praze-Hostivaři.

Přechodem ústavu na příspěvkovou organizaci došlo k určitým změnám v zaměření činnosti, neboť bylo nezbytné podporovat i takové práce, které přinášely část finančních prostředků nezbytných k zajištění činnosti ústavu v plném rozsahu.

K dalším změnám došlo k 1. 1. 1993, kdy v rámci probíhajících restrukturalizací výzkumných ústavů rezortu ministerstva zemědělství došlo k vyčlenění Střediska potravinářských informací, které se stalo součástí samostatného Ústavu zemědělských a potravinářských informací.

Za dobu 35 let prošel ústav složitým vývojem až do dnešní podoby, kdy přes určitá omezení a problémy, které jsou v současné době společné všem výzkumným organizacím, se stal komplexním pracovištěm, schopným řešit na dobré úrovni úkoly základního, průřezového a aplikovaného výzkumu v oblasti chemie, biochemie a technologie potravin, potravinářského inženýrství a techniky, výživy i ochrany zásob před škůdci. V jeho činnosti se stále výrazněji promítají i hlediska snižování energetické náročnosti a ochrany životního prostředí. Ústav má dnes dvě pracoviště - v sídle ústavu v Praze 10 - Hostivaři, Radiové ul. 7 je těžiště výzkumných prací z oblasti chemicko-technologické, potravinářského inženýrství a ochrany zásob; vývoj, konstrukci a výrobu unikátní přístrojové a provozní potravinářské, balicí a manipulační techniky zajišťuje Vývojová základna potravinářské techniky v Hrušovanech nad Jevišovkou.

Hlavním posláním ústavu je iado budoucna zůstane zajištění zdravé a bezpečné výživy obyvatelstva této republiky. Pod tímto zorným úhlem jsou vedeny všechny výše uvedené aktivity ústavu.

Ing. Jiří C e l b a, CSc.,
ředitel ústavu

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 259-263

CHARACTERIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE Cr-COMPOUNDS FROM YEAST PRODUCT DIASTABIL

Miloš BERAN, Vít PAULÍČEK

Food Research Institute, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař, Czech Republic

An attempt to isolate biologically active species containing chromium from yeast product DIASTABIL has been made in the present work. The fractions isolated by gel filtration chromatography were separated using HPLC with reversed phase column (C18).

yeast chromium; glucose tolerance; factor

During the last 30 years great attention has been paid to the role of chromium in human carbohydrate and lipid metabolism. Insufficient dietary chromium leads to signs and symptoms similar to those associated with maturity-onset diabetes and/or cardiovascular diseases (A n d e r s o n, 1990).

The result of efforts to solve this problem in the Czech Republic is the commercial product DIASTABIL. This preparation from dried thermolysed yeast *Torulopsis ethanolitolerans* containing 200 - 400 μg per g d. w. of biologically bound chromium proved high efficiency in the treatment of glucose, cholesterol, and blood lipid metabolic disorders during clinical experiments (T r u n e c k á et al., 1991; K r e j z o v á, R u t, 1991 - unpublished report).

Many attempts (M e r t z et al., 1974; Toepfer et al., 1977; T u m a n et al., 1978; M i r s k y et al., 1980; K u m p u l a i n e n et al., 1978; H a y l o c k et al., 1983a, b; B e r a n et al., 1991) of the specification of glucose tolerance factor (GTF) have been made since it was postulated to be an organic form of chromium (M e r t z, S c h w a r z, 1959). However, contradictory conclusions were obtained as to the composition of these compounds. We suppose that such a wide diversity of results could be due to harsh extraction and separation methods, which may cause the degradation of biologically active yeast components.

MATERIAL and METHODS

Preparation of concentrated yeast extracts – The commercial yeast product DIASTABIL (Bioferm Kolín & Milltitech Praha, Czech Republic) was used in experiments. It is a thermolysed dried yeast biomass of *Torulopsis ethanolitolerans* containing 200 - 400 μg per g d. w. of chromium. Distilled water was used. 2.5 g of the dry thermolysed yeast was suspended in 50 ml of distilled water, shaked at 175 RPM for 18 hours at 30 °C and then centrifuged. All extracts were concentrated

about 10 times *in vacuo*. The control sample was prepared from a chromium-free yeast in the same way.

Gel filtration chromatography – Sephadex G50 (PHARMACIA, type fine, particle size 20 - 80 μm) was used to separate a chromium containing fraction from the concentrated yeast extract. The column (2.5 x 100 cm) was run in distilled water at room temperature under the following conditions: Loading: 3 ml, Flow rate: 0.6 ml per min, Detection: 254 nm.

HPLC separations – The fraction containing chromium after gel filtration chromatography was concentrated *in vacuo* to obtain more than 10 μg per ml of chromium. The corresponding control fraction was treated in the same way. The concentrated fraction was subjected to HPLC separations on reversed phase column, 4 x 250 mm (Separon SGX C18, 10 μm, TESSEK) with Tris-HCl (0.04 mol per l, pH 6.2) as a mobile phase at loading 10 μl and flow rate 0.5 ml per min. The HPLC-system HEWLET PACKARD 1090 with UV-VIS spectrophotometric detector was used for separations.

Preparative HPLC separations – Preparative HPLC-system equipped with isocratic pump, reversed phase column, 5 x 25 cm (SEPARATION SGX C18, 20 μm, TESSEK) and UV-VIS spectrophotometric detector LCD 2040 (Laboratorní přístroje, Prague) was used to prepare a greater amount of a sample for further characterization. The column was run in Tris-HPLC (0.04 mol/l, pH 6.2) at loading 10 ml and flow rate about 7 ml/min.

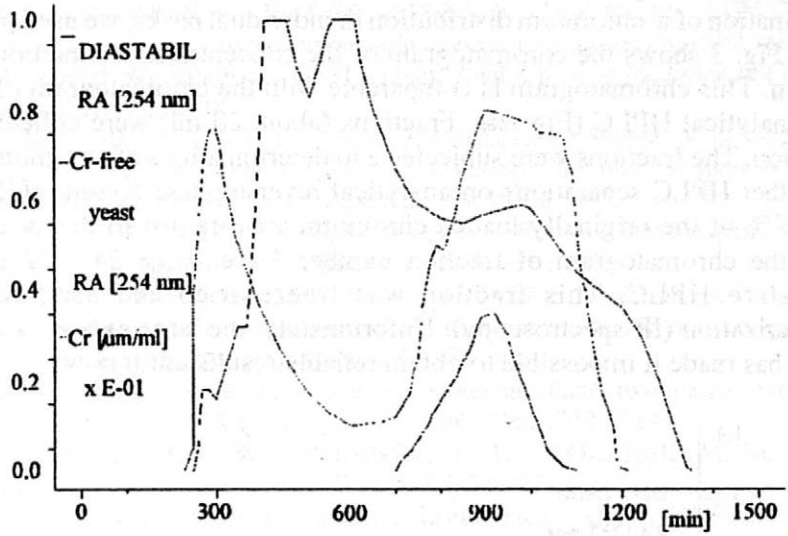
AAS measurements – Chromium was determined by atomic absorption spectrophotometry at 357.9 nm using flame (N_2O acetylene) or electrothermic atomization at lower Cr-contents. Solid samples were digested in the HNO_3 - $HClO_4$ mixture before analysis. IL-12 spectrophotometer and IL-755 graphite furnace (Instrumental Laboratory) with Smith-Heiftje background corrector were used for analysis.

RESULTS and DISCUSSION

About 50 % of the total chromium could be extracted from the dried thermolysed yeast (DIASTABIL) with distilled water alone. According to our previous results (unpublished) the thermolysis appears to be the most effective and simple method (as compared with autolysis and mechanical desintegration of cells) for releasing biologically bound chromium from yeast cells. It suggests that a considerable part of chromium is probably bound to the solid cell structures.

Fig. 1 shows gel filtration chromatograms of the concentrated extracts of DIASTABIL and the corresponding control sample. Chromium is eluted in the relatively wide fraction. These Cr- and corresponding control fractions were concentrated *in vacuo*. The concentrated fractions were used for biological assays.

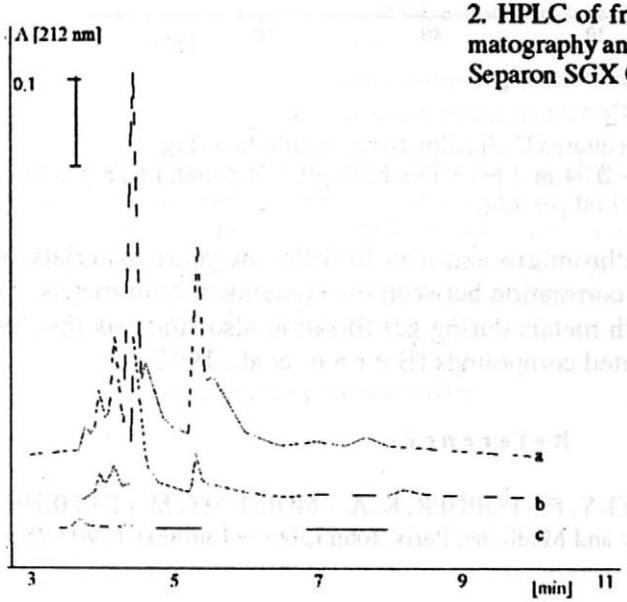
To achieve more distinct separation of chromium components from DIASTABIL we used HPLC with reversed phase column, SEPARON SGX C 18.



1. Gel chromatography of the concentrated extracts of DIASTABIL and control Cr-free yeasts. Conditions: Sephadex G 50-water; column size 2.5 x 100 cm; loading volume 3 ml; flow rate 0.6 ml per min

Concentrated fractions from gel filtration chromatography were injected into this column and eluted with 0.04 mol/l.

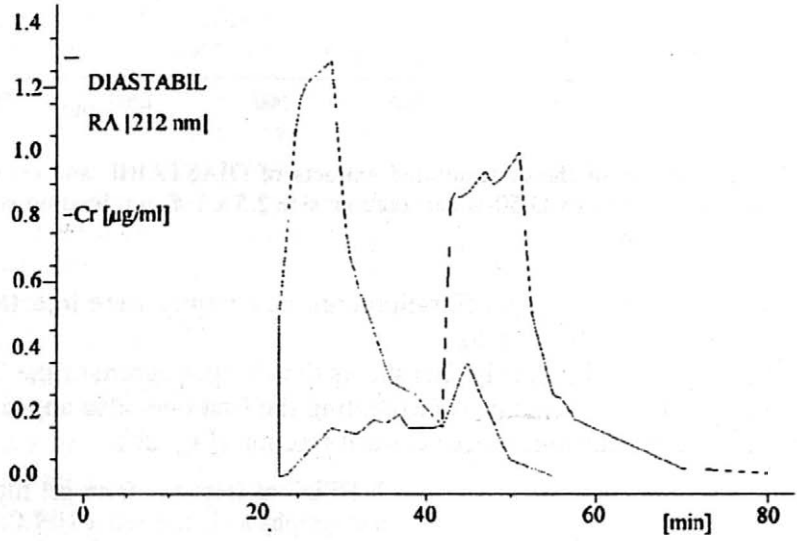
Tris-HCl buffer at pH 6.2. (Fig. 2a) shows the chromatogram of the Cr-fraction from DIASTABIL. The same peaks excepting the first one also appeared during the separation of the chromium-free control fraction (Fig. 2b).



2. HPLC of fractions from gel filtration chromatography and preparative HPLC. Conditions: Separon SGX C18 - 0.04 mol per min

a – sample of Cr peak from gel filtration chromatography (Fig. 1)
b – sample of the corresponding control Cr-free fraction from gel filtration chromatography (Fig. 1)
c – sample of Cr-peak (fraction No. 1, ret. time 24-27 min) from preparative HPLC (Fig. 3)

To prepare a greater amount of sample for further characterization and determination of a chromium distribution in individual peaks, we used preparative HPLC. Fig. 3 shows the chromatogram of the concentrated Cr-fraction from gel filtration. This chromatogram is comparable with the chromatogram of the same using analytical HPLC (Fig. 2a). Fractions (about 20 ml) were collected during separation. The fractions were subjected a to determinations of chromium by AAS and further HPLC separations on analytical reverse phase column (C18). In the least 90 % of the originally loaded chromium appears just in this peak. Fig. 2c shows the chromatogram of fraction number 1 (ret. time 24 - 27 min) from preparative HPLC. This fraction was freeze-dried and used for further characterization (IR spectroscopy). Unfortunately, the large excess of Tris in the sample has made it impossible to obtain reliable results untill now.



3. Preparative HPLC of the concentrated Cr-fraction from gel filtration (Fig. 1)
Conditions: Separon SGX C18 - 0.04 mol per l Tris-HCl; pH 6.2; column size 5 x 25 cm; loading volume 10 ml; flow rate 7 ml per min

During determination of chromium and iron in different yeast materials, we observed a distinct reversed correlation between the contents of both metals. The similarity in behavior of both metals during gel filtration also suggests that they could be incorporated in related compounds (B e r a n et al., 1991).

References

ANDERSON, R. A.: In: COLLERY, P. - POIRIER, R. A. - MOINFAIT, M. - ETTIENE, J. C. (Eds.): Metal Ions in Biology and Medicine. Paris, John Libbery Eurotext 1990 : 95 p.

BERAN, M., Jr. - NEUMAN, P. - RUT, M. - BENEŠ, B. - BERAN, M. - LENGYEL, J.: Identification of biologically active component in diabetic preparation Diastabil using AAS and HPLC. In: 6th Int. Workshop on Trace Elements Anal. Chem. in Medicine and Biology. Munchen-Neuherberg, April 1991.

HAYLOCK, S. J. - BUCKLEY, P. D. - BLACKWELL, L. F.: Separation of biologically active chromium-containing complexes from yeast extracts and other sources of glucose tolerance factor (GTF) activity. J. Inorg. Biochem., *18*, 1983a : 195.

HAYLOCK, S. J. - BUCKLEY, P. D. - BLACKWELL, L. F.: The relationship of chromium to the glucose tolerance factor. J. Inorg. Biochem., *19*, 1983b : 105.

KUMPULAINEN, J. - KOIVISTOINEN, P. - LAHTINEN, S.: Isolation, purification and partial chemical characterisation of chromium (III) fractions existing in brewers' yeast and Sabouraud's liquid medium. Bioinorg. Chem., *8*, 1978 : 419.

MERTZ, W. - SCHWARZ, K.: Relation of glucose tolerance factor to impaired intravenous glucose tolerance of rat on stock diets. Am. J. Physiol., 196, 1959 : 614.

MERTZ, W. - TOEPFER, E. W. - ROGINSKI, E. E. - POLANSKYM. M.: Present knowledge of the role of chromium. Fed. Proc., *33*, 1974 : 2275.

MIRSKY, N. - WEISS, A. - DORI, Z.: Chromium in biological systems. I. Some observation on glucose tolerance factor in yeast. J. Inorg. Biochem., *13*, 1978 : 11.

TOEPFER, E. W. - MERTZ, W. - POLANSKY, M. M. - ROGINSKI, E. E. - WOLF, W. R.: Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extracts and by synthesis. J. Agric. Food Chem., *25*, 1977 : 162.

TRUNECKÁ, E. - BENEŠ, B. - PLATILOVÁ, H. - ŠIMEČKOVÁ, A. - STOLBA P. - VONDRA, K. - ZAMRAZIL, K.: Prakt. Lékař, *71*, 1991 : 346.

TUMAN, R. W. - BILBO, J. T. - DOISY, R. J.: Comparison and effects of natural and synthetic glucose tolerance factor in normal and genetically diabetic mice. Diabetes, *27*, 1978 : 49.

Received for publication March 16, 1993

M. Beran, V. Paulíček (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Izolace a identifikace biologicky aktivních Cr^{III+} sloučenin z kvasničného produktu DIASTABIL^{R}

V práci je popsán pokus o izolování biologicky aktivních látek obsahujících chrom. Jako zdroj těchto látek byl vybrán kvasničný produkt DIASTABIL (Millitech Praha & Bioferm Kolín). Jedná se o běžně dostupný komerční výrobek. Obsah biologicky vázaného chromu se v DIASTABILU pohybuje mezi 200 až 400 μg na 1 g suchého produktu. Frakce látek byly izolávány gelovou filtrací a dále děleny pomocí HPLC s reverzní fází (C18).

kvasničný chrom; tolerance glukosy; faktor

AD eko A.S.

VÝHODNÝ LEASING
STROJŮ A ZAŘÍZENÍ
NEJEN PRO ZAČÍNAJÍCÍ
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

✦

Potrav. Vědy, *11*, 1993 (4) : 265-273

ASCORBIC ACID STABILITY IN YOGHURT

Vlasta FIEDLEROVÁ, Karin SHULTIS[1], *Milan HOUŠKA, Petr KŘIŠŤAN*

Food Research Institute, Radiova 7, 102 31, Praha 10 - Hostivař, Czech Republic;
[1]*University of Alberta, Department of Food Science, Edmonton, Alberta, Canada*

Stability of ascorbic acid was examined in two types yoghurt: Pragolaktos plain yoghurt of Bulgarian style and plain yoghurt Danone. The yoghurts were prepared in the laboratory by standard procedures. Ascorbic acid was added in two different ways: into milk before incubation, into milk after incubation and after incubation in the form of enriched sweetened concentrate. The stability of ascorbic acid and the rate of its degradation was followed by two methods; high performance liquid chromatography (HPLC) and titration with 2,6-dichlorophenol-indophenol (DPIP) with potentiometric indication of the equivalence point.

ascorbic acid; enrichment; stability; yoghurt

The work was aimed at improvement of the nutritional value of yoghurts by means of addition of ascorbic acid (vitamin C, hereinafter only AA). It was found out that the vitamins C, A and E were frequently deficient in the Czech diet (B l a t t n á et al., 1990).

In spite of the fact that milk consumption had considerably decreased since 1989, the consumption of fermented milk products, especially of yoghurts was constantly increasing (H u š e k, 1989). The choice of yoghurts as vitamin C carriers might therefore be – from the point of view of meeting the dietary requirements of a broad range of population – regarded as highly suitable.

Ascorbic acid is easily oxidized by atmospheric oxygen to dehydroascorbic acid; the reaction path leads to the formation of substances that are physiologically inactive. Procedures and methods ensuring vitamin protection against degradation both during the manufacture and during the storage of products have therefore to be investigated. This is the only way to provide the consumer with products of defined quality containing the recommended daily intake of vitamins necessary for adequate and healthy nutrition.

The study was aimed at the examination of optimal procedures of yoghurt enrichment with vitamin C and at the testing of its stability during storage.

MATERIAL and METHODS

Chemicals - Ascorbic acid p. a. (Merck, Darmstadt) - stock solution 50 mg per 100 ml in 3% HPO_3 was further diluted for HPLC analyses. Fresh solution must be prepared on daily basis as follows:

Metaphosphoric acid (Merck Darmstadt) p. a. - 3% aqueous solution;

2,6-dichlorophenol-indophenol (Fluka Chemie, Buchs);

Acetonitrile p. a. (Laborchemie, Apolda);

Potassium dihydrogen phosphate (Lachema, Brno).

Sample preparation - The yoghurts were prepared from 2 l liquid UHT milk with fat content of 3.7 % into which 160 g of dry semi-skim milk Eligo was added. After mixing the dry milk powder the mixture was heated under constant stirring to 80 °C and then it was cooled in a water bath to 48 °C. At this temperature 300 g of fresh yoghurt (Plain yoghurt Pragolaktos or plain yoghurt Danone) was added as inoculum. Immediately after the inoculation the batch was separated into two portions (500 ml each) and the third portion contained 1000 ml volume. AA in the form of aqueous solution (0.125 g in 5 ml of distilled water) was then added into 500 ml portion and the sample was thoroughly stirred. Then it was transferred into insulated 1 l glass thermos and incubated till the next day.

The second and third portions were poured into insulated containers and incubated till the next day. The fermentation tool from 17 to 18 hours: AA in distilled water (0.125 g in 5 ml) was added into the second 500ml portion and the container was vigorously stirred. The third yoghurt portion was directly filled into glass jars. Each jar contained 85 g yoghurt and 15 g of the fruit component enriched with AA. The calculated concentration of ascorbic acid in each 100 g of product was 25 mg (the same theoretical amount was contained also in the yoghurt without fruit enriched with vitamin C). The yoghurts from the first and second portion were also filled into glass jars (approximately 100 g in each) and stored at 4 °C. The stability of the added AA was estimated at this temperature.

The fruit component was prepared from bananas that practically do not contain any vitamin C. 300 g of peeled bananas were cut into pieces and 300 g of sugar were added. The mixture was heated to 80 °C. Juice was released at this temperature and sugar dissolved in it. The sweetened fruit was then cooled to 20 °C and AA (1 g in 5 ml water) was added. The mixture was constantly stirred and cooled to 20 °C. It was then stored in a fridge till the next day, when it was poured into the third portion of yoghurt (as described above).

Titrational method – The method is based on the reduction of 2,6-dichloro-phenol--indophenol (DPIP) and oxidation of AA to dehydroascorbic acid. The indication of the equivalence point is carried out potentiometrically. The method is used in compliance with the Czechoslovak standard ČSN 56 0050. Approximately 20 g of homogenized yoghurt was weighed into a volumetric flask 100 ml and made up to 100 ml with 3 % HPO_3. After filtration 10 ml of extract is used for titration

(after dilution with 10 ml 3% HPO_3). The titration was carried out with approximately 0.001M DPIP solution, its exact concentration was determined by titration of 1 ml standard solution of AA added into 20 ml 3% HPO_3.

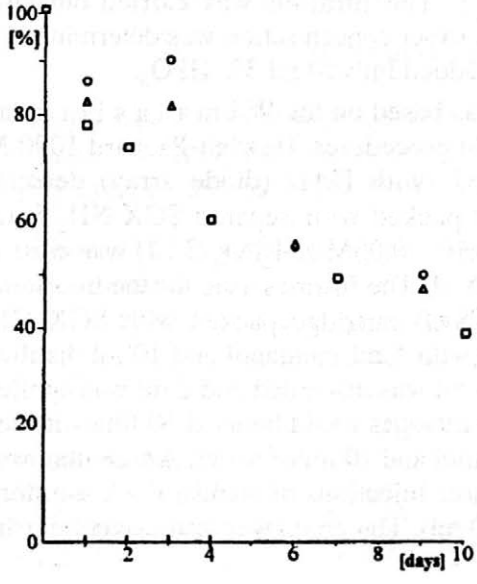
HPLC method - The determination was based on the W i m a l a s i r i et al. (1983) and P a r v i a i n e n et al. (1986) procedures. Hewlett-Packard 1090 M liquid chromatograph (Waldbronn, FRG) with DAD (diode array) detector (267 nm) and glass column 3 x 150 mm packed with Separon SGX NH_2 5 µm (Tessek) was applied. Mixture of acetonitrile - 0.05M KH_2PO_4 (3 : 1) was used as mobile phase. The injection volume was 5 µl. The filtrates used for the titrational determination were pretreated in a PRESEP cartridge packed with SGX C18 (Tessek). The cartridge was first washed with 5 ml methanol and 10 ml distilled water, then 5 ml of filtrate was applied. 3 ml was discarded and 2 ml was applied for HPLC determination. The PRESEP cartridges could be used 10 times if they were after use washed with 5 ml of methanol and 10 ml of water. AA content was evaluated by calibration diagram from three injections of standard AA solutions (AA concentration from 1 to 8 mg per 100 ml). The graph was tested every day by an analysis of standard AA solution.

RESULTS and DISCUSSION

Results of AA determination in the samples are presented in Tables I and II. They show the course of AA decomposition in the yoghurts prepared by the use of the Pragolaktos and Danone starter cultures.

I. Results of ascorbic acid determination in yoghurts prepared by the use of Pragolaktos yoghurt as starter culture (mg AA/100 g of product)

Storage time (days)	AA added					
	before incubation		after incubation		into yoghurt in fruit	
	titration	HPLC	titration	HPLC	titration	HPLC
0	22.6	-	25.5	20.3	24.9	20.9
1	17.7	15.4	21.1	17.6	21.5	19.2
2	16.8	14.2	-	-	-	-
3	-	-	20.9	19.3	22.5	18.7
4	13.7	14.2	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	14.3	13.2	13.8	14.1
7	11.2	10.2	-	-	-	-
9	-	-	12.0	10.2	12.5	10.4
10	8.9	6.9	-	-	-	-



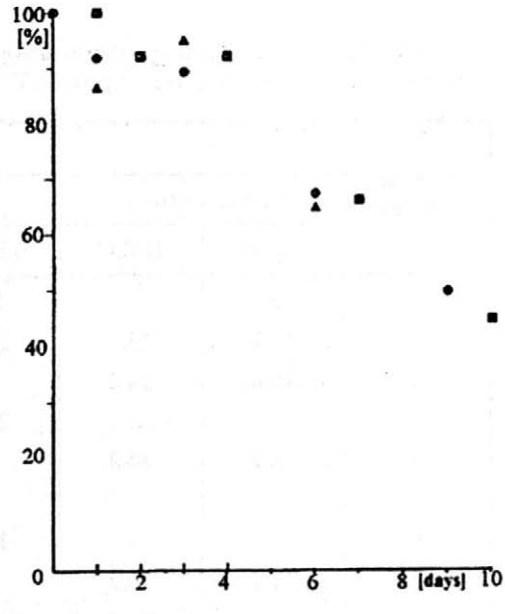
1. AA degradation for the yoghurt of Pragolaktos type - determined by titration

Holds for Figs. 1 - 4:
residual AA (%) - storage time (days)
□ AA befor cultivation
Δ AA after cultivation
○ AA by fruit

Tables III and IV give the normalized data obtained by relation of all values to the initial value of AA concentration which is considered as initial 100% content.

The data in Tables I and II show that the values obtained by HPLC are in the mean by 15 % and 7 % lower for the Pragolaktos and Danone yoghurts, resp. than those obtained by titration. The titrational procedure is less specific because other substances reducing the titration agent are determined simultaneously. HPLC is selective and therefore only values determined by this method will be hereinafter evaluated.

The data in Table I also indicate that the vitamin concentration decreases similarly if it has been added into the milk after incubation in the form of the fruit component. A slightly higher decrease was observed if the vitamin had been added into the milk before incubation because the ascorbic acid was partly utilized for the growth of lactic acid bacteria. The results in Tables I and III show that the content of AA decreased by up to 55 % after 10 days of storage.



2. AA degradation for the yoghurt of Pragolaktos type - determined by HPLC

II. Results of ascorbic acid determination in yoghurts prepared by the use of Danone yoghurt as starter culture (mg AA/100 g of product)

Storage time (days)	AA added					
	before incubation		after incubation		into yoghurt in fruit	
	titration	HPLC	titration	HPLC	titration	HPLC
0	23.7	23.5	24.2	23.9	21.8	21.0
1	21.6	22.2	-	-	-	-
2	-	-	23.3	24.6	19.8	18.8
3	21.9	21.5	23.9	21.5	18.5	17.6
4	21.5	21.2	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	20.6	20.4	13.6	12.7
7	19.4	17.9	-	-	-	-
8	-	-	19.5	18.8	11.5	10.7
9	19.7	17.8	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

It is also obvious from the results presented in Table I that no significant differences in AA concentration were recorded after 10 days of storage in relation to the enrichment procedure applied. This means that the decomposition course of AA is the same and is not affected by the enrichment procedure. This finding is revealed also in Figs. 1 and 2. No special procedure has therefore to be used for the enrichment of Pragolaktos yoghurt.

Table II shows the data obtained with the application of Danone yoghurt as the starter culture. Danone culture obviously differed from that contained in Pragolaktos and the decrease in AA concentration is in this case lower. Lower AA values were observed solely in experiments when AA had been added in the form of the fruit component when compared with those in which AA was added before or after incubation. This fact was confirmed by repeated measurements.

Tables III and IV give the normalized data of AA levels remaining in the product with the initial AA concentration expressed as 100 %. It is interesting that no significant differences in AA concentration were observed in the data obtained by the two methods if normalized data were considered. The most important values are the percentage AA levels at the end of storage. In the Pragolaktos yoghurts they were ranging from 39 to 50 % of the initial AA concentration independently on the analytical procedure applied. If the Danone yoghurts were applied, the final AA levels were 50 - 80 % in relation to the enrichment procedure used.

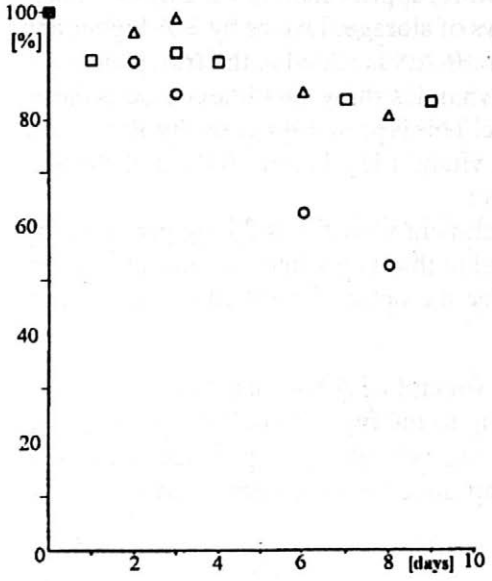
The same data are shown in Figs. 3 and 4. Each figure shows the results for one method of AA analysis. The figures also prove that in the Pragolaktos yoghurt the decomposition rate of AA is higher than that in the yoghurts with Danone starter

III. Absorbic acid levels remaining in the yoghurts of Pragolaktos type expressed as percente of the original concentration

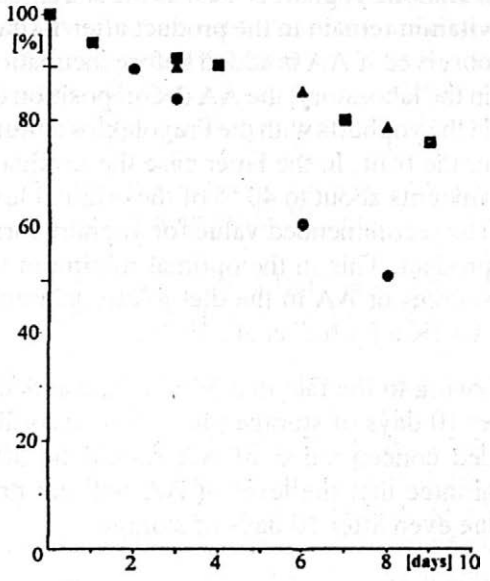
Storage time (days)	AA added					
	before incubation		after incubation		into yoghurt in fruit	
	titration	HPLC	titration	HPLC	titration	HPLC
0	100	-	100	100	100	100
1	78.3	100	82.8	86.7	86.4	91.9
2	74.3	92.2	-	-	-	-
3	-	-	82.0	95.1	90.4	89.5
4	60.6	92.2	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	56.1	65.0	55.4	67.5
7	49.6	66.2	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	47.6	50.2	50.2	49.8
10	39.4	44.8	-	-	-	-

IV. Absorbic acid levels remaining in the yoghurts of Danone type expressed as percentage of the original concentration

Storage time (days)	AA added					
	before incubation		after incubation		yoghurt in fruit	
	titration	HPLC	titration	HPLC	titration	HPLC
0	100	100	100	100	100	100
1	91.1	94.5	-	-	-	-
2	-	-	96.3	-	90.8	89.5
3	92.4	91.5	98.8	89.9	84.8	83.8
4	90.7	90.2	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	85.1	85.3	62.4	60.5
7	83.5	80.0	-	-	-	-
8	-	-	80.6	78.7	52.5	50.9
9	83.1	75.7	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-



3. AA degradation for the yoghurt of Danone type - determined by titration



4. AA degradation for the yoghurt of Danone type - determined by HPLC

culture, except for the experiments in which AA has been introduced in the fruit component; in the latter case AA decomposed with the same rate as in the two types of yoghurt with the Pragolaktos culture. This quicker decomposition can be explained by the fact that the fruit has not been freed from air (as normally done in industrially processed fruit). A slight decomposition of AA sets therefore in already in the fruit processed in the laboratory. This assumption is also confirmed by the lower AA content at the start of storage (21 mg per 100 g product) as seen in Table II.

The figures further show that the lowest residual value after 10 days of storage is 40 % of the initial level independently on the type of yoghurt. On basis of these findings a doubler addition of AA can be recommended. This will guarantee AA concentration in the yoghurt stored for 10 days amounting to the generally recommended content of 25 mg per 100 g product.

CONCLUSIONS

The results of the above experiments can be concluded as follows:

1. If Pragolaktos yoghurt is used as the starter culture, approximately 50 % of the added vitamin remains in the product after 10 days of storage. Losses by 5 % higher are observed if AA is added before incubation. The addition of the fruit component does not affect AA losses.

2. If Danone yoghurt is used as the starter culture, approximately 75 % of the added vitamin remain in the product after 10 days of storage. Losses by 3 % higher are observed if AA is added before incubation. If AA is added in the fruit processed in the laboratory, the AA decomposition dynamics show the same course as those in the yoghurts with the Pragolaktos culture. This is probably caused by air content in the fruit. In the latter case the residual vitamin level after 10 days of storage amounts about to 40 % of the original level.
3. The recommended value for yoghurt enrichment with AA is 25 mg per 100 g of product. This in the optimal minimum value that takes into account also other sources of AA in the diet jointly guarantee the optimal daily allowance 60 mg AA (K a j a b a et al., 1989).

Owing to the fact that 50 % of the added amount of AA remains in the product after 10 days of storage (40 - 75 % according to the type of yoghurt applied), the added concentration of AA should be 50 mg per 100 g of product. This will guarantee that the level of AA will not drop under the recommended minimum value even after 10 days of storage.

Literatura

BLATTNÁ, J. - FIEDLEROVÁ, V. - HOLASOVÁ, M. et al.: Vitaminový program. VÚPP, Report for the Czech Governement 1990.

HUŠEK, J.: New trends in the manufacture and consumption of fermented milk products. Proc. Liberecké dny nové techniky v mlékárenském průmyslu. 1989.

KAJABA, I. - BUDLOVSKÝ, J. - DVORSKÝ, A. et al.: New recommended nutritional intakes for the population of the CSFR. Výživa a zdravie, *34*, 1989 : 68-70, 129-132.

PARVIAINEN, M. T. - NYYSSONEN, K. - PENTTILA, I. K. et al.: A method for routine assay of plasma ascorbic acid using HPLC. J. Liquid Chromatogr., *9*, 1986 : 2185-2197.

WIMALASIRI, P. - WILLS, R. B. H.: Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by light-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., *256*, 1983 : 368-371.

Received for publication January 26, 1993

V. Fiedlerová, K. Shultis, M. Houška, P. Křišťan (Výzkumný ústav potravinářský, Praha; University of Alberta, Edmonton, Kanada)

Stabilita kyseliny askorbové v jogurtu

Jedním ze způsobů, jak snížit deficit vitaminu C u našeho obyvatelstva, je i obohacování některých výrobků široké spotřeby tímto faktorem. Vzhledem ke zvýšené konzumaci jogurtových výrobků s ovocnou složkou, uvažovali jsme o možnosti jejich obohacování vitaminem C. Cílem práce bylo ověření metod a postupů fortifikace jogurtu vitaminem C v laboratorním měřítku a sledování jeho stability v průběhu skladování.

Stabilitu kyseliny askorbové (dále AK) jsme sledovali ve dvou typech jogurtů: Pragolaktos - bílý jogurt bulharského typu a bílý jogurt Danone. Jogurty jsme připravovali laboratorně standardním postupem. AK jsme přidávali různými způsoby: do mléka před zráním (po rozpuštění v destilované vodě 25 mg AK na 100 g mléka), po zrání a po zrání ve formě fortifikovaného slazeného ovocného koncentrátu. Jogurty jsme skladovali při 4 °C po dobu 10 dní. Obsah AK jsme stanovili jednak titračně s 2,6-dichlorfenolindofenolem (podle ČSN 56 0050) s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence a jednak metodou HPLC [upravená metoda podle W i m a l a s i r i (1983) a P a r v i a i n e n a et al. (1986)].

Výsledky stanovení obsahu AK v jogurtech typu Pragolaktos a Danone v závislosti na době skladování pro jednotlivé způsoby přidání jsou uvedeny v tab. I a II. V tab. III a IV uvádíme normalizovaná data, která jsme získali po vztažení na počáteční hodnotu obsahu AK. Tatáž data jsou graficky zobrazena na obr. 1 až 4 vždy pro jednu metodu stanovení AK.

Z uvedených výsledků vyplynulo, že v případě použití jogurtu Pragolaktos jako startovací kultury zůstává po 10 dnech skladování ve výrobku asi 50 % přidaného vitaminu. Ztráty vyšší o 5 % jsou v případě přídavku AK před zráním, kde je AK využívána pro růst mléčných bakterií. Přídavek ovocné složky ztráty AK neovlivňuje. V případě použití jogurtu Danone jako startovací kultury zůstává po 10 dnech skladování ve výrobku asi 75 % přidaného vitaminu. V případě přidání AK ve formě slazeného ovocného koncentrátu jsou vyšší ztráty AK (cca 60 %) pravděpodobně způsobeny faktem, že použitý ovocný výrobek nebyl zbaven vzduchu (jak se provádí průmyslově v případě asepticky vyráběného kouskovitého ovoce). Vzhledem k tomu, že v jogurtu zůstane za 10 dní skladování průměrně 50 % přidaného množství, je třeba volit přídavek 50 mg AK na 100 g výrobku, abychom zajistili minimální obsah 25 mg AK na 100 g výrobku po celou záruční lhůtu výrobku

kyselina askorbová; obohacování; stabilita; jogurt

Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha

n a b í z í

informace o novinkách a trendech ve výrobě potravin, inovaci potravinářských výrobků, balení potravin, hodnocení kvality potravin apod.

z **potravinářské databáze**

FSTA - FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY ABSTRACTS

Databáze obsahuje přes
400 000 anotovaných záznamů v anglickém jazyce,
které jsou shromažďovány od roku 1969

V databázi jsou zpracovány tyto hlavní oblasti světové a odborné literatury: potravinářská věda a technologie, potravinářské inženýrství, biotechnologie, hygiena a toxikologie potravin, balení, potraviny rostlinného a živočišného původu, kvasný a nápojový průmysl, přídavné látky.

Informace z databáze **FSTA** zajišťujeme
v různých formách počítačových výstupů:

- průběžné rešerše (SDI) na základě trvalých objednávek z měsíčních přírůstků databáze (seznam témat SDI zasíláme na vyžádání)
- retrospektivní rešerše s úplnou retrospektivou 23 let databáze na kompaktním disku, případně s časovým vymezením na 5 až 10 let na věcná témata (případně rešerše na autory, instituce, výrobce zařízení); rešerše jsou dodávány buď tištěné, nebo na disketách
- doplňující dialogové rešerše z posledních ročníků až do roku 1993 v systému GOLEM; databáze je dialogově zpřístupněna za období 1985 až 1993 s pravidelnou měsíční aktualizací

Vaše dotazy a objednávky zasílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
Londýnská 55, 120 21 Praha 2
tel. 250 051-4, Fax 207 411

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 275-280

FLOW-MICROCALORIMETRIC DETERMINATION OF CELLOBIASE ACTIVITY AND ITS END INHIBITION BY GLUCOSE

Vít PAULÍČEK, Miloš BERAN

Food Research Institute, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař, Czech Republic

A method for measuring cellobiase activity of the *Trichoderma reesei* CCF 1853 cellulase complex using a Thermal Activity Monitor and a flow - mix mode is described. The kinetic constant K_M and the linear dependence of dQ_{max}/dt (the maximum heat flow at the total saturation of enzyme with substrate) on the enzymes activity were determined. The process of the end product inhibition of cellobiase activity by glucose was also observed. The obtained results allow to determine the mechanism of inhibition and an inhibition constant for glucose. The procedure is completely general in nature and is applicable to other enzymatic systems.

heat-flow micro-calorimetry; cellobiase-activity; enzyme kinetic; inhibition

Many enthalpimetric methods concerning the analysis of enzymatic reactions have been described during the last twenty years (Antonelli et al., 1990; Carunchio et al., 1983; Danielsson, 1990; Martin, Marini, 1979; McGlothlin, Jordan, 1975; Sica et al., 1978; Spink, Wadsö, 1980; Watt, 1990). The use of calorimetry to determine enzyme activities has many attractive features, such as the possibility of continuous flow operation, insensitivity to the optical properties of the sample, simple procedures, general detection principle, dynamic monitoring range of several orders of magnitude in substrate concentrations, and high sensitivity. Moreover, thermodynamic information can greatly aid the development of molecular interpretation of enzymatic systems.

There is now world-wide interest in the commercial potential of using cellulases to generate glucose feedstocs which can be used for further chemical and biological conversion. Not surprisingly, this interest has resulted in considerable research activity in the area in recent years. Commonly used standard assays, such as carboxymethyl cellulase (CMC) assay, cellobiase assay and filter paper assay are all based on the same principle of estimating a fixed amount of glucose from the relevant substrate (IUPAC, 1984). A large disadvantage of these methods is that they are rather laborious and time-consuming. That is why we have developed the method of flow microcalorimetric determination of CMC, xylanase and cellobiase enzymatic activities (Beran, Paulíček, 1992). We used this method for

determination of the end product inhibition of cellobiase activity by glucose in the present work.

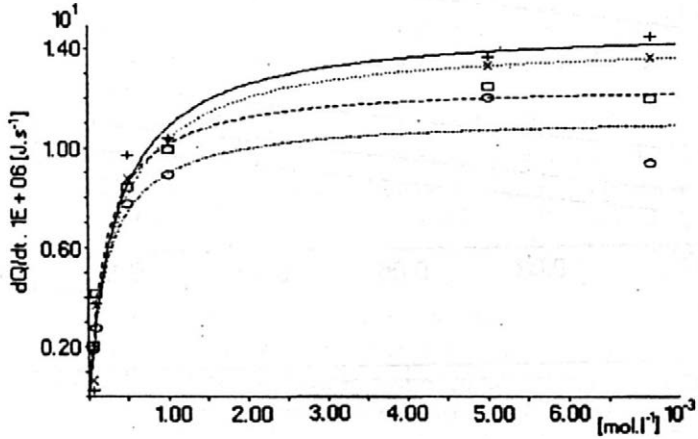
MATERIAL and METHODS

Production of crude enzymatic preparation – The industrial enzymatic preparation P10 Kolín was produced by using *Trichoderma reesei* CCF 1853 in the Food Research Institute in Prague. The culture medium was separated on a through-flow separator and the supernatant was filtered. The filtrate was concentrated by ultrafiltration (cut off 10 kDa) and spray dried. The obtained preparation contained 64% (w/w) of proteins and these enzymatic activities - CMC activity: 2,303 IU per g, xylanase activity: 2,098 IU per g, cellobiase activity: 16.63 IU per g, and filter paper activity: 585 IU per g. CMC, cellobiase and filter paper activities of the enzymatic preparation were determined according to standard assay procedures for cellulase enzyme system proposed by the Commission on Biotechnology, IUPAC, in 1984. Xylanase activity was determined in a similar way (M a n d e l s, 1982).

Apparatus and operative conditions – Microcalorimetric experiments were performed by using an LKB 2277 Thermal Activity Monitor (Thermometric AB, Sweden), a free-standing multichannel microcalorimeter. Continuous heat leakage measurements are conducted isothermally. The instrument is equipped with an LKB 2132 MicroPerpex Pump. A single circuit for flow-through and a double circuit for flow-mix experiments are available. The continuous flow-mix system was used for our experiments. All measurements were performed at 50 ± 0.0002 °C, flow rate of 55 cm^3/h, and residence time of 40 s. The buffer used for all solutions of both enzyme and sugars was 0.05M citrate buffer pH 5.0. The stable base-line on the chart recorder and zero were established by mixing the clean buffer and the enzymatic preparation solution. Both the solutions were located outside the microcalorimeter at room temperature under continuous stirring and pumped with exactly the same rate into the microcalorimeter. After mixing in the flow-mix cell of the instrument, the mixed flow passed through the measuring cell. When the stable base-line was obtained, the clean buffer was exchanged step by step for solutions with different concentrations of cellobiose or mixture of cellobiose and glucose in the buffer. The heat effect generated by the enzymatic reaction, and also by other side-reactions, was measured in the measuring cell. To obtain the heat flow generated only by the enzymatic splitting cellobiose to glucose, the measured signal outputs were corrected by subtraction of the individual dilution heat flows of cellobiose and glucose, the interaction heat flows of cellobiose with glucose, and the interaction heat flows of only glucose with enzyme preparation. The dilution resp. interaction heat effects of sugars were obtained by measuring the heat flows generated after mixing of the solutions of the individual sugars, and/or their mixture with the clean buffer. The interaction heat flows of the denaturated enzymatic preparation with both sugars were negligible.

RESULT and DISCUSSION

Many studies concerning the analysis of enzymatic kinetics of endo- and exo-glucanases produced by filamentous fungi such as *Trichoderma reesei*, involving various mechanisms of feedback control, have been published during the last forty years. However, only small attention has been paid to the kinetics of β-glucosidase (cellobiase) and the inhibition mechanism of the end-product inhibition of cellobiase by glucose. The described method allows to directly determine the cellobiase activity, or the cellobiose concentration, by simply measuring the heat involved in the cellobiose hydrolysis (Fig. 1). The detection limit is about 1.10^{-5} mol/l of cellobiose. The obtained curve has the typical hyperbolic shape for Michaelis--Menten kinetic behaviour. The value K_M for the cellobiase activity was determined as 0.37 ± 0.004 mmol/l. The method according to Eady (Š í c h o et al., 1981) was used for the computation of K_M and Q_{max} (the heat flow under conditions of total saturation of enzyme with substrate).



1. Inhibition influence of glucose. x-axis presents cellobiose concentration.
Conditions: Concentration of cellobiase activity: 1.25 IU.ml^{-1}; Concentration of glucose (mol.l^{-1}): + 0; x 2.78 E-03; □ 2.78 E-02; ○ 10.139

An HPLC method was used for determination of a the rate of cellobiose conversion. The obtained results allow us to replace the Michaelis-Menten equation:

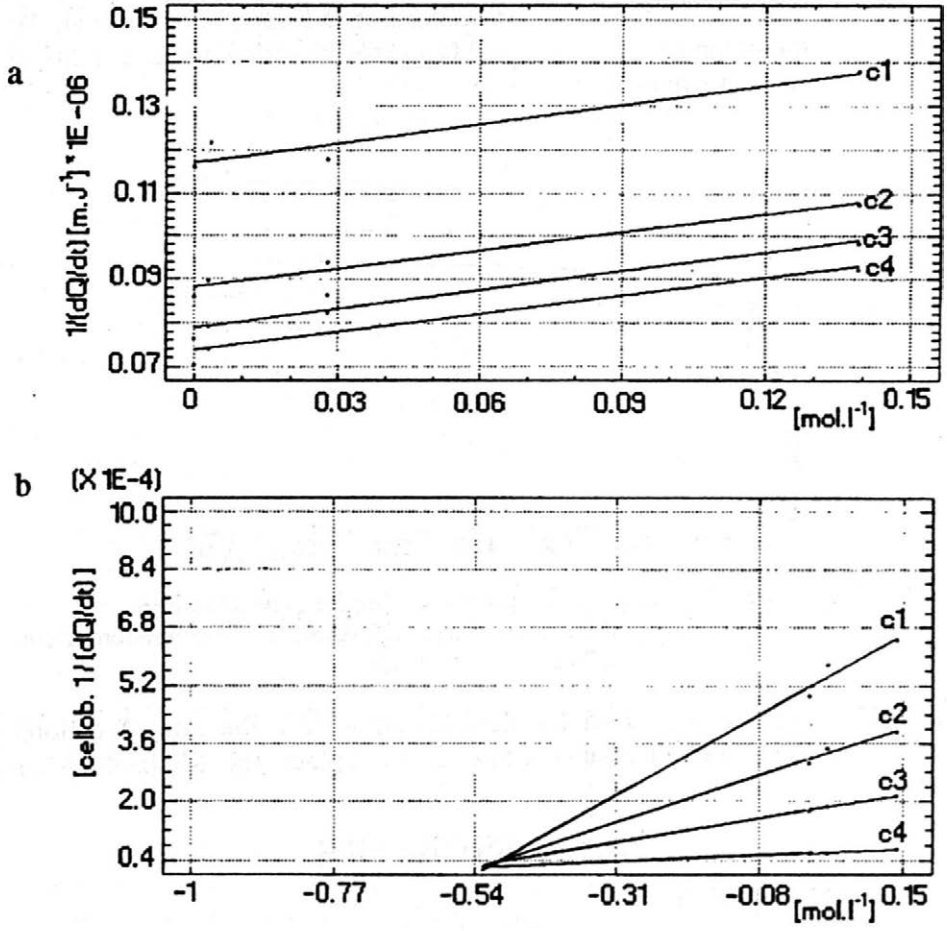
$$V = V_{max} . [S] / (K_M + [S])$$

by an analogous equation:

$$dQ / dt = [(dQ_{max} / dt) . [S]] / (K_M + [S])$$

where: $dQ_{max} / dt = k . [E]$
dQ / dt - heat flow [J.s^{-1}]
dQ_{max} / dt - the heat flow under conditions of total saturation of enzyme with substrate [J.s^{-1}]

Fig.1. shows saturation curves of cellobiase activity with different concentrations of glucose. To obtain an inhibition constant and distinguish the type of inhibition, the heat flow (dQ / dt) against glucose concentration data was analysed graphically by the methods after Dixon (1953) and Cornish-Bowden (1974). The different types of inhibition have characteristic effects on these plots. The Dixon plots (Fig. 2a) give parallel lines. The lines intersect above the base-line by using the Cornish-Bowden plots (Fig. 2b). These results are typical of the uncompetitive nature of the glucose inhibition of the cellobiase activity.



2 a, b. Determination of inhibition type. a) Dixon plots; b) Cornish-Bowden plots; x axis present inhitor concentration

Conditions: Concentration of cellobiase activity: 1.25 IU.ml^{-1}. Cellobiose concentration (mol.l^{-1}): c1 .... 5E-04; c2 .... 2E-03; c3 .... 4E-03; c4.... 7E-03

Therefore, the inhibitor (glucose) can be bound only when a binding substrate (cellobiose) changes the enzyme conformation suitably. Moreover, the Cornish-Bowden plots make it possible to determine the value of the uncompetitive inhibition constant K_{IU}. At the intersection point the concentration of an inhibitor (glucose) is equal to the value of K_{IU}. The constant $K_{IU} = 0.52 \pm 2.42.10^{-2}$ mol/l of glucose was found.

The method is a very suitable tool for observing various mechanisms of feedback control by products of enzymatic action. The observation of the glucose inhibition of the cellobiase activity described here is a demonstration of the use of the method in this way.

References

ANTONELLI, M. L. - CARUNCHIO, V. - LUCIANI, M.: A new microcalorimetric method for determination of lipase activity and substrate concentration in aqueous medium. Analyt. Lett., *23*, 1990 : 1-22.

BERAN, M. - PAULÍČEK, V.: Flow-microcalorimetric determination of enzymatic activities of the *Trichoderma viridae* - cellulase complex. J. Therm. Analyt., *38*, 1992 : 1979-1988.

CARUNCHIO, V. - ANTONELLI, M. L. - BUCCI, R. - MAGRI, A. D.: Flow-microcalorimetry applied to the enzymic determination of urea. Analyt. Lett., *16*, 1983 : 1-7.

CORNISH-BOWDEN, A.: Simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and noncompetitive inhibitions. Biochem. J., *137*, 1974 : 143-144.

DANIELSSON, B.: Calorimetric biosensors. J. Biotechnol., *15*, 1990 : 187-200.

DIXON, M.: Detection of enzyme-inhibitor constants. Biochem. J., *55*, 1953 : 170-171.

MANDELS, M.: Cellulases. Annu. Rep. Ferment. Proces., *5*, 1982 : 35-78.

MARTIN, C. J. - MARINI, M. A.: CRC Analyt. Chem., *8*, 1979 : 230.

McGLOTHLIN, C. D. - JORDAN, J.: Enzymic enthalpimetry, a new approach to clinical analysis. Glucose determination by hexokinase catalyzed phosphorylation. Analyt. Chem., *47*, 1975 : 786 and 1479.

McGLOTHLIN, C. D. - JORDAN, J.: Thermochemical determination of glucose in serum, plasma and whole blood without prior deproteinization. Clin. Chem., *21*, 1975 : 745.

SICA, L. - GILLI, R. - BRIAND, C. - SARI, J. C.: A flow-microcalorimetry method for enzyme activity measurements: application to dihydrofolate reductase. Analyt. Biochem., *165*, 1987 : 341-348.

ŠÍCHO, V. - VODRÁŽKA, Z. - KRÁLOVÁ, B.: Potravinářská biochemie. Praha, SNTL 1981. : 166p.

SPINK, C. H. - WADSO, I.: Calorimetry as an analytical tool in biochemistry and biology. CRC Analyt. Chem., *9*, 1980 : 14.

WATT, G. D. (1990): A microcalorimetry procedure for evaluating the kinetic parameters of enzyme-catalyzed reactions: kinetic measurements of the nitrogenase system. Analyt. Biochem., *187*, 1990 : 141-146.

Commission on Biotechnology, IUPAC: Measurement of Cellulase Activities. 1984.

Received for publication March 16, 1993

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 275-280

V. Paulíček, M. Beran (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Mikrokalorimetrické stanovení celobiasové aktivity a její inhibice glukosou

V práci je popsána metoda tepelně vodivostní mikrokalorimetrie ve spojení se stanovením celobiasové aktivity. Pro měření byl použit biologický mikrokalorimetr (Thermal Activity Monitor - TAM 2277, LKB-Broma, Švédsko). Celobiasová aktivita pocházela z enzymového preparátu vláknité houby *Trichoderma reesei* CCF 1853. Během pokusů byla stanovena základní kinetická konstanta K_M ($K_M = 0,37 \pm 0,004$ mmol/l) a lineární závislost dQ_{max}/dt (maximální tepelný tok při plné saturaci enzymu substrátem) na enzymové aktivitě. Jako metoda pro porovnání správnosti výsledků byla vybrána metoda stanovení celobiasové aktivity, doporučená IUPAC. Byla sledována produktová inhibice glukosou. Získané výsledky dovolily stanovit typ inhibice jako akompetetivní a inhibiční kinetickou konstantu K_{IU} ($K_{IU} = 0,52 \pm 2,42.10^{-2}$ mol/l). Popsaná metoda je obecná a použitelná pro sledování jiných enzymových systémů.

tepelně vodivostní mikrokalorimetrie; celobiasová aktivita; kinetika enzymů; inhibice

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 281-289

BIOLOGICKÝ TEST NA KYSELINU SORBOVOU A NĚKTERÉ LÁTKOVÉ SLOŽKY LIMONÁD POMOCÍ ORGANISMŮ *LEBISTES RETICULATUS* A *DAPHNIA MAGNA*

Klára POPADIČOVÁ, Ivan BOHAČENKO

Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 03 Praha 10 - Hostivař

Byla ověřována možnost aplikace biologických screeningových testů na kyselinu sorbovou, resp. její sole, v limonádách pomocí akvarijních rybek (*Lebistes reticulatus*) a dafnií (*Daphnia magna*). Z důvodů experimentálně prokázané nespecifické citlivosti na chemické konzervační látky vzhledem k látkám přirozeným, nelze však výše uvedené vodní organismy pro uvažované biologické testy doporučit.

biologický test; kyselina sorbová; ovocné nápoje; *Lebistes reticulatus; Daphnia magna*

Vzhledem k obecně se zvyšujícímu trendu minimalizace obsahu cizorodých látek v potravinách, objevuje se i stále větší snaha o vypracování jednoduchých a rychlých screeningových metod pro jejich detekci, tak jako je tomu při sledování kontaminace složek životního prostředí. Vedle metod chemických a fyzikálně-chemických jsou již delší dobu v popředí zájmu i metody biologické, které jsou založeny na využití různých druhů organismů jako bioindikátorů znečištění prostředí. Ve sféře vodního hospodářství je pro tento účel používáno především aktivních vodních živočichů (např. planktonní korýši *Daphnia magna* či akvarijní rybky *Lebistes reticulatus*), na kterých je možné velmi dobře pozorovat známky stresu. Jako příklady tohoto využití je možné uvést testy s planktonními korýši pro stanovení toxicity těžkých kovů v povrchových vodách (Baudouin, Scoppa, 1974; Ingersoll et al., 1990) nebo obdobné testy na toxicitu vybraných pesticidů, popř. dalších organických látek (Sanders, 1970; Day, Maguire, 1990; Adema, 1978; Elendt, 1990; Kenaga, 1978). Zajímavé je i využití vodních organismů pro ekotoxikologické hodnocení rizikovosti tuhých průmyslových odpadů ve formě vodního výluhu (Metodický návod..., 1988). Pokud se týká oblasti hodnocení zdravotní nezávadnosti potravin, jsou vodní živočichové využíváni k biologickým testům velmi sporadicky. Za poslední období lze citovat práce Ústavu hygieny a výživy LFM UK Praha (1990), kde k toxikologickému testování vybraných detergentů, dezinfekčních činidel, konzervačních látek, pesticidů, tenzidů a rostlinných toxinů byly, mimo jiných (bakterie, kvasinky, nižší houby, semena rostlin, krysí sperma, tkáňové kultury), použity i dafnie a akvarijní rybky. Všechny testy byly prováděny na úrovni standardních roztoků jednotlivých účinných látek.

Cílem naší práce bylo ověření možnosti praktické aplikace výše uvedených poznatků o biologických testech s dafniemi a akvarijními rybkami při stanovení přítomnosti chemických konzervačních látek ve „sterilovaných, čerstvých" či „přírodních" potravinách, u nichž je jejich použití nepřípustné, resp. stanovit, zda nebyla překročena nejvyšší přípustná koncentrace jejich obsahu v chemicky konzervovaných potravinách. Z důvodů nenáročného experimentálního uspořádání jsme se rozhodli v první fázi provádět testace ve vybraných druzích konzumních limonád.

Nejrozšířenějším konzervačním činidlem, používaným v současné době při zpracování ovoce a zeleniny a při výrobě nealkoholických nápojů, je kyselina sorbová, resp. její soli, výjimečně pak kyselina benzoová či parahydroxybenzoová. Nejvyšší přípustná koncentrace kyseliny sorbové a jejích solí, jejichž toxikologií se zabýval např. W a l k e r (1990), činí podle Směrnice o cizorodých látkách v poživatinách č. 50 pro limonády 200 mg/kg a pro ostatní konzervárenské produkty na bázi ovoce a zeleniny (sirupy, šťávy, protlaky, džemy apod.) se pohybuje v rozmezí 300 až 800 mg/kg.

Je obecně známo, že mechanismus účinku konzervačních látek typu organických kyselin či jejich solí je závislý na pH, které ovlivňuje jejich disociaci v kapalném podílu potraviny (K y z l i n g, 1980). Nedisociované molekuly mohou taktéž prostupovat buněčnou blanou kontaminujících mikroorganismů poměrně rychle podle obecných pravidel difuse, kdežto pronikání iontů je, vzhledem k elektrickému náboji na jejich povrchu, podstatně pomalejší až zcela zanedbatelné. Proto jsou tyto látky vždy účinnější v kyselém než v neutrálním prostředí nebo v alkalických roztocích. Optimum konzervační účinnosti kyseliny sorbové se pohybuje v rozmezí pH 3,0 až 5,5 (K y z l i n k, 1980). Obdobný efekt pH na akutní toxicitu pryskyřičných kyselin u *Daphnia magna* pozoroval Z a n e l l a (1983), z jehož prací vyplývá, že toxicita u těchto látek se snižuje se zvyšujícím se pH. Matematický model aktivního a pasivního transportu iontů u vodních organismů popsal S p a r g a r e n (1990).

MATERIÁL a METODY

Nejprve jsem ověřili vliv pH prostředí na přežívání testovaných organismů a dále jejich mortalitu v závislosti na pH a koncentraci kyseliny sorbové. I když z potravinářského hlediska představují limonády, se kterými měly být prováděny praktické aplikace, relativně jednoduchý systém organických a anorganických látek v roztoku, považovali jsem za nutné ověřit i možný vliv dalších, v nich přítomných komponent, na mortalitu použitých organismů. Na základě složení limonád, deklarovaného našimi výrobci, jsme vybrali sacharosu, barviva a především kyselinu citronovou, která je do nich přidávána ve vyšších množstvích a vykazuje též sama konzervační účinky. Taktéž jsme provedli i testaci modelových směsí výše uvedených látek, jejichž složení bylo voleno tak, aby co nejvíce odpovídalo reálnému složení limonád. V závěru pak byly provedeny pokusy se čtyřmi druhy konzumních limonád.

Biologický test – Před použitím byly akvarijní rybky z vlastního chovu (věk čtyři týdny, délka 10 mm) adaptovány 24 hodin v odstáté pitné vodě (bez aerace

a bez krmení). Obdobně tomu bylo u dafnií (průměrná velikost 1,3 mm), které byly adaptovány v ředicí vodě dle Bringmann-Kuhnové (Metodika hodnocení..., 1985).

K jednomu pokusu bylo použito vždy pět rybek, resp. 10 dafnií, které byly umístěny v 750 ml, resp. 80 ml zkoumaného vzorku. U rybek byly sledovány vzhled a úhyn v 30minutových intervalech v průběhu prvních čtyř hodin a konečný stav po 24 hodinách. U dafnií byl určován stav jejich úhynu po 48 hodinách. Prováděny byly vždy tři paralerní pokusy a kontrola. V případě, že úhyn u kontroly byl větší jak 10 % byl celý test zopakován. Za průkaz přítomnosti cizorodých látek o dané koncentraci s pH ve vzorku považujeme poloviční úhyn testovaných organismů, tj. 50% mortalitu.

Stanovení LC-50 – LC-50 je koncentrace toxické látky, při které uhyne 50 % testovacích organismů v daném prostředí a časovém intervalu. Vypočítána byla probitovou analýzou podle ČSN 46 6807 na základě údajů o mortalitách *Dafnia magna* a *Lebistes reticulatus*.

Vliv prostředí na mortalitu organismů – Pokusy byly prováděny podle druhů organismů v pitné nebo v ředicí vodě, přičemž pH v rozmezí 3,5 až 7,5 bylo upravováno buď 10% roztokem HCl nebo 30% roztokem NaOH. Výsledky jsou uvedeny v tab. I.

I. Vliv pH prostředí na mortalitu testovaných organismů – The effect of pH value of the medium on mortality of tested organism

pH	Mortalita[1] [%]		pH	Mortalita [%]	
	Lebistes reticulatus	*Daphnia magna*		*Lebistes reticulatus*	*Daphnia magna*
3,5	100	100	5,5	0	39,6
3,8	93,3	100	6,0	0	9,9
4,0	40,2	100	6,5	0	6,6
4,5	9,7	100	7,0	0	0
5,0	6,7	82,5	7,5	0	0

[1]mortality

Stanovení toxicity kyseliny sorbové pro akvarijní rybky a dafnie v závislosti na její koncentraci a pH – Pokusy byly prováděny v odstáté pitné vodě nebo ředicí vodě, do níž byla přidávána kyselina sorbová p. a. v rozmezí výsledných koncentrací 10 až 1000 mg/l a pH upravováno na požadovanou hodnotu 10% roztokem HCl nebo 30% roztokem NaOH. Mortalita organismů je uvedena v tab. II a III a z nich vypočítané hodnoty LC-50 jsou uvedeny v tab. IV.

Stanovení toxicity kyseliny citronové pro akvarijní rybky v závislosti na její koncetraci a pH – Pokusy byly provedeny stejně jako při stanovení kyseliny sorbové, obdobně byla vypočítána i LC-50 (tab. IV a V).

II. Mortalita [%] *Lebistes reticulatus* v závislosti na koncentraci kyseliny sorbové a pH – Mortality rate [%] of *Lebistes reticulatus* depending upon sorbic acid concentrations and pH value

pH	Kyselina sorbová[1] (mg . l^{-1})							
	10	25	50	100	200	400	800	1000
5,2	0	0	13,4	40,2	67,0	93,3	100	100
5,6	0	0	0	20,1	46,9	87,1	100	100
5,8	0	0	0	6,7	20,1	67,0	93,3	100
6,0	0	0	0	0	0	40,2	87,1	93,3
6,4	0	0	0	0	0	13,4	46,9	87,1
6,7	0	0	0	0	0	0	13,4	80,4
7,0	0	0	0	0	0	0	0	40,2

[1]sorbic acid

Vliv barviv a sacharosy na mortalitu testovacích organismů – Pokusy byly prováděny v odstáté pitné vodě, resp. ředicí vodě, do níž byly přidávány barviva (Tatrazin a Košenilová červeň) v rozmezí koncentrací 25 až 75 mg/l (jedná se o reálné koncentrace podle údajů výrobce). Totéž bylo provedeno u roztoků sacharózy v rozmezí koncentrací 3 až 9 %. Ve všech případech byla zjištěna nulová mortalita.

III. Mortalita (%) *Daphnia magna* v závislosti na koncentraci kyseliny sorbové a pH – Mortality rate [%] of *Daphnia magna* depending upon sorbic acid concentrations and pH value

pH	Kyselina sorbová[1] (mg . l^{-1})								
	10	25	50	100	150	200	250	300	350
6,0	9,9	23,1	33,3	52,8	52,8	62,7	66,0	74,0	75,9
6,5	6,6	16,5	23,1	39,6	46,2	52,8	60,0	63,0	66,0
7,0	0	6,6	13,2	23,1	33,3	33,3	39,6	39,6	46,2
7,5	0	0	0	9,9	16,5	19,8	23,1	29,7	33,3

[1]sorbic acid

Testy modelových směsí – Složení a pH modelových směsí lze vyčíst z tab. VI. Vlastní pokusy byly prováděny standardním způsobem. Výsledky jsou v tab. VI.

Chemické složení limonád – K rozborům byly vzaty vzorky konzumních limonád Athena oranž, Athena citron, Livie a Grepus. U nich pak byl stanoven obsah kyseliny sorbové, citronové a benzoové izotachoforetickou metodou, obsah sacharosy pomocí HPLC. Výsledky jsou uvedeny tab. VII, přičemž obsah barviv je údaj uvedený výrobcem.

IV. LC-50 [mg/l] kyseliny sorbové pro *Lebistes reticulatus* a *Daphnia magna* a LC-50 (mg/l) kyseliny citronové pro *Lebistes reticulatus* – LC-50 [mg/l] of sorbic acid for *Lebistes reticulatus* and *Daphnia magna* and LC-50 [mg/l] of citric acid for *Lebistes reticulatus*

	Kyselina sorbová[1]						Kyselina citronová[2]	
	Lebistes reticulatus						*Lebistes reticulatus*	
pH	5,2	5,6	5,8	6,0	6,4	pH	5,2	5,6
LC-50	124,1	167,9	290,1	453,1	728,6	LC-50	3117,5	5000
	Daphnia magna							
pH	6,0	6,5	7,0	7,5				
LC-50	102,9	167,9	434,0	687,9				

[1]sorbic acid; [2]citric acid

V. Mortalita [%] *Lebistes reticulatus* v závislost na koncentraci kyseliny citronové a pH – Mortality rate [%] of *Lebistes reticulatus* depending upon citric acid concentrations and pH

pH	Kyselina citronová[1] [mg.l^{-1}]					pH	Kyselina citronová [mg.l^{-1}]				
	1000	2000	3000	4000	8000		1000	2000	3000	4000	8000
5,2	0	20,1	46,9	67,0	100	6,0	0	0	0	6,7	100
5,6	0	6,7	13,4	40,2	100	6,4	0	0	0	6,7	100
5,8	0	0	0	26,8	100	6,7	0	0	0	0	100

[1]citric acid

VI. Testy s modelovými směsmi – The effect with model mixtures

Číslo vzorku[1]	Složení vzorku[2]					Mortalita[3] [%]		
	pH	kyselina sorbová[4]	kyselina citronová[5]	barviva[6]	sacharosa[7]	*Lebistes reticulatus*		*Daphnia magna*
		[mg .l^{-1}]			[%]	24 h	48 h	48 h
1	6,0	200	3000	50	8	100	100	100
2	6,4	200	3000	50	8	100	100	100
3	6,4	50	3000	50	8	100	100	100
4	6,4	70	3000	50	8	100	100	100
5	6,4	70	2000	50	8	73,2	100	100
6	6,4	70	1000	50	8	79,9	100	100
7	6,4	70	500	50	8	19,6	100	100

[1] sampes no.; [2] sample composition; [3]mortality; [4] sorbic acid; [5] citric acid; [6]pigments; [7]sucrose

VII. Chemické složení limonád – Chemical composition of refreshments

Vzorek[1]	Kyselina sorbová[2]	Kyselina citronová[3]	Sacharosa[4]	pH	Barviva[5]	Kyselina benzoová[6]
	[mg . l^{-1}]		[%]		[mg . l^{-1}]	
Athena oranž	62,5	3078,0	8	2,8	25 - 70	25 - 70
Athena citron	66,3	3226,0	8	1,6	25 - 70	25 - 70
Livie	125,0	3496,0	9	3,7	25 - 70	25 - 70
Grepus	87,5	3382,0	8	2,6	25 - 70	25 - 70

[1]sample; [2]sorbic acid; [3]citric acid; [4]sucrose; [5]pigments; [6]benzoic acid

Biologické testy v limonádách – Vzorky byly nejprve zbaveny CO_2 vložením do ultrazvukové lázně na jednu hodinu, odstředěny 10 minut při 9 tis. ot/min, poté intenzivně provzdušněny po dobu 1 hodiny a nakonec u nich bylo upraveno pH na hodnotu 6,4 přídavkem 30% NaOH. Vlastní biologické pokusy byly prováděny standartdním způsobem. Mortalita byla u obou testovacích organismů 100 %, a to již po půl hodině.

DISKUSE

Z hodnocení citlivosti organismů na pH prostředí (tab. I) vyplývá, že mortalita akvarijních rybek je prakticky nulová od pH vyšších než 5,0 až 5,5 a u dafnií od pH 6,5 až 7,0, což určuje i dolní hranici pH pro screeningové testy, o kterých je možné předpokládat, že u nich mortalita organismů nebude zatížena vlivem pH prostředí.

Na základě stanovení toxicity kyseliny sorbové (tab. II a III), resp. hodnoty LC-50 (tab. IV), bylo stanoveno, že:

a) citlivost testovacích organismů, odpovídající minimálně prokazatelné mortalitě 10 %, činí v případě *Lebistes reticulatus* 50 mg/l při pH 5,2 a u *Dafnia magna* 10 mg/l při pH 6,0.

b) 50 % mortality v případě koncentrace 200 mg/l (tj. nejvyšší přípustné koncentrace kyseliny sorbové v limonádách podle Směrnice č. 50) bylo u *Lebistes reticulatus* dosaženo při pH 5,5 a u *Dafnia magna* při pH 6,5.

Pokud se týká sacharosy a barviv, dalších významných komponentů limonád, nemají v reálně se vyskytujících množstvích (tab. VII) na mortalitu žádný vliv. Zcela jiná je situace u účinku kyseliny citronové, jakožto přirozeného konzervačního činidla. Z výsledků závislosti její toxicity na koncentraci a pH u akvarijních rybek a z nich vypočítaných příslušných hodnot LC-50 (tab. IV a V) je zřejmé, že hodnotě LC-50 pro koncentraci 3000 mg/kg, tj. průměrného množství kyseliny citronové přidávané do limonád (tab. VII), odpovídá pH 5,2.

Protože pH u LC-50 pro koncentraci kyseliny sorbové 200 mg/kg je velmi blízké pH pro LC-50 koncentrace kyseliny citronové 3000 mg/kg, bylo nutné řešit též otázku možné kumulace toxického účinku obou kyselin, které by mohlo podstatným způsobem ovlivnit screeningové testy. Toto se pak potvrdilo na modelových pokusech (tab. VI). U modelových vzorků, obsahujících výše uvedené koncentrace kyselin, došlo při pH 6,0 a 6,4 po 24 hodinách k úplnému úhynu testovacích organismů, ačkoliv by podle předchozích výsledků neměla být jejich mortalita z titulu samostatného účinku jednotlivých kyselin prakticky ovlivněna. Dále je výsledný kumulativní účinek více ovlivňován kyselinou sorbovou (pokusy 3 až 7 v tab. VI).

Z výše uvedeného vyplývá, že mechanismus účinku chemických a přirozených konzervačních látek typu organických kyselin či solí, založený u mikroorganismů na průniku nedisociovaných molekul buněčnou blanou, je s největší pravděpodobností obdobný účinku těchto látek i na vodní organismy při průniku jejich žábrami, včetně kumulativního efektu (K y z l i n k, 1980).

Pokud se týká testace vzorků limonád, naznačuje rychlý úhyn organismů (již po půl hodině), že se zde zřejmě projevují i jiné, námi neověřované vlivy na mortalitu testovacích organismů, zvláště pak vliv dalších možných minoritních komponentů organického či anorganického původu, které jsou přítomny v limonádách. Tyto faktory jsme však již dále neprověřovali, a to vzhledem k rozhodujícímu vlivu kumulace toxicit kyseliny sorbové a citronové na reprodukovatelnost screeningových testů.

ZÁVĚR

Z uvedených důvodů, především pak nespecifické citlivosti na chemické konzervační látky vzhledem k látkám přirozeným, lze vodní organismy *Lebistes reticulatus* a *Daphnia magna* jen velmi obtížně doporučit jako testovací organismy pro biologické screeningové testy na stanovení přítomnosti kyseliny sorbové, případně benzoové, parahydroxybenzoové, resp. jejich solí, v limonádách či jiných konzervárenských produktech na bázi ovoce a zeleniny. Současně též upozorňujeme na poměrně značné technické i časové nároky pro zajištění zdravotně nezávadných chovů testovacích organismů, podmiňujících reprodukovatelnost výsledků, které by mohly být v podmínkách provozních kontrolních laboratoří zdrojem nemalých obtíží.

Literatura

ADEMA, D. M. M.: *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. Hydrobiologia, *59*, 1978 : 125-134.

BAUDOUIN, M. F. - SCOPPA, P.: Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. Bull. Environ. Contam. Toxicol., *12*, 1974 : 745-751.

DAY, K. E. - MAGUIRE, R. J.: Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide Deltamethrin and its major degradation products of *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem., *9*, 1990 : 1297-1300.
ELENDT, B. P.: Influence of water composition on the chronic toxicity of 3,4-dichloraniline to *Daphnia magna*. Water Res., *24*, 1990 : 1169-1172.
INGERSOLL, C. G. - DWYER, F. J. - MAY, T. W.: Toxicity of inorganic and organic selenium to *Daphnia magna* and *Chironomus riparius*. Environ. Toxicol. Chem., *9*, 1990 : 1171-1181.
KENAGA, E. E.: Test organismus and methods useful for early assessement of acute toxicity of chemicals. Environ. Sci. Technol., *12*, 1978 : 1322-1329.
KYZLINK, V.: Základy konzervace potravin. Praha, SNTL 1980.
SANDERS, H. O.: Toxicities of some herbicides to six species of freshwater crustances. J. Water Poll. Contr. Feder., *42*, 1970 : 1544-1550.
SPARGAREN, H.: A method for continuous monitoring of active and passive ion transport in aquatic animals. Oceanol. Acta, *13*, 1990 : 389-396.
WALKER T.: Toxicology of sorbic acid and sorbates. Food Addit. Contam., *7*, 1990 : 671-676.
ZANELLA, E.: Effect of pH acute toxicity of DHA and chloratinated DHA to fish and daphnia. Bull. Environ. Contam. Tosicol., *30*, 1983 : 133-140.
ČSN 46 6807. Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočiších. 1989.
KOLEKTIV: Zdravotní hodnocení nových poživatin a výrobních postupů - etapa 03 Biologické testovací metody pro cizorodé látky. [Závěrečná zpráva.] Praha, Ústav hygieny výživy LFH UK 1990.
Metodika hodnocení toxicity a biodegradability látek významných ve vodním hospodářství. In: Sbor. Před. I., Hradec Králové, ČSVTS 1985.
Metodický návod pro hodnocení rizikovosti tuhého průmyslového odpadu. Min. zdravot. a soc. věcí ČSR, Č. j.: HEM-324-14.11.88.

Došlo dne 16. 3. 1993

K. Popadičová, I. Bohačenko (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Biological test for sorbic acid and some material components of soft drinks using the organisms *Lebistes reticulatus* and *Daphnia magna*

With respects to generally increasing trend of minimization of the content of foreign substances in foods, there is much effort to prepare simple screening methods for their detection, where except chemical and physico-chemical methods, biological methods are in the centre of concern. The study was aimed at testing the possibility of practical application of biological tests with *Daphnia magna* and *Lebistes reticulatus* to identity the presence of chemical preservatives in soft drinks, that is either sorbic acid or their salts, respectively.

It follows from the evaluation of the sensitivity of organisms to pH of environment (Table I) that *Lebistes reticulatus* mortality is practivally zero from pH values above 5.0 to 5.5 and 6.5 to 7.0 in daphnia, this determining also the lower limit of pH for

screening tests of which one can predict that the mortality of organisms here will not be affected by pH of environment.

Based on the determination of the toxicity of sorbic acid (Table II and III) or the LC-50 values (Table IV) it was fixed that:

a) sensitivity of testing organisms, corresponding to minimum provable mortality of 10 %, in case of *Lebistes reticulates* amounts to 50 mg/l at pH 5.2 and in *Daphnia magna* 10 mg/l for pH 6.00;

b) 50 % mortality in case of the concentration 200 mg/l (i.e. the highest admissible concentration of sorbic acid in soft drinks as stated by Regulation No. 50) was gained with *Lebistes reticulatus* at pH 5.5 and with *Daphnia magna* at 6.5 pH value.

Concerning saccharose and colouring agents, other important components of soft drinks, they have no effect (in actually existing amounts, Table VIII) on mortality (Table VI). The completely different is the situation regarding the effects of citric acid, as the natural preservative. It is evident from the results of dependence of its toxicity on the concentration and LC-50 (Table IV and V) that the pH value of 5.2 is corresponding to the value LC-50 for concentration 3000 mg/kg, i.e. average amount of citric acid added to soft drinks (Table VIII).

As pH value in LC-50 for the concentration 200 mg/kg of sorbic acid is very close to that for LC-50 concentration 3000 mg/kg of citric acid, it was necessary to solve the issue of potential cumulation of toxic effect of both the acids which could affect significantly screening tests. This was later confirmed in model trials (Table VII). In model samples containing the above-mentioned concentrations of acids, at the pH value of 6.0 and 6.4 after 24 hours, all tested organisms died, though as based on the previous results, their mortality due to independent effect of individual acids ashould not be practically affected. Furthermore, the resulting cumulative effect was more influenced by sorbic acid (trials 3 to 7 presented in Table VII).

It followes from the above-mentioned data that the mechanism of the effect of chemical and natural preservatives of the type of organic acids or salts, based on the penetration of undissociated molecules through cellular membrane in microorganisms, with the highest probability is similar to the effect of these substances on water organisms at the penetration through their gills.

Regarding the test of soft drinks samples, there is an indication of the fast mortality of organisms (after an hour). It means that there are evident other, not verified by us, effects on mortality of tested organisms, in particular the effect of other potential minority components of organic or inorganic origins present in soft drinks. These factors were not further checked up on, that is with respect to the decisive influence of cumulation of toxicities of sorbic and citric acid on reproducing capacity of screening tests.

For all these reasons, in particular non-specific sensitivity to chemical preservatives with respect to natural substances, water organisms *Lebistes reticulatus* and *Daphnia magna*, are hardly to be recommended as testing organisms for biological screening tests to determine the presence of sorbic acid, or benzoic, parahydroxybenzoic acids or their salts, in soft drinks or other tinning products based on fruits and vegetables.

biologicl test; sorbic acid; soft drinks; *Lebistes reticulatus; Daphnia magna*

Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha

n a b í z í

informace o novinkách a trendech ve výrobě potravin, inovaci potravinářských výrobků, balení potravin, hodnocení kvality potravin apod.

z potravinářské databáze

ALIMIS - CS

Databáze obsahuje přes
24 000 anotovaných záznamů v českém nebo slovenském jazyce,
zpracovávaných od roku 1985. Je dialogově zpřístupněna v systému GOLEM po celou dobu provozu (pondělí až pátek)
v databázovém centru Národního informačního střediska ČR.

Vyhledané záznamy rovněž obsahují dva pro uživatele důležité údaje: zkratky institucí a signatury originálních dokumentů (knih, separátů, výzkumných a cestovních zpráv apod), podle kterých si je možné ihned vypůjčit originální dokumenty z knihovny ÚZPI.

Informace z databáze **ALIMIS - CS** zajišťujeme
různými formami počítačových výstupů:

- **retrospektivní rešerše na požadovaná témata,** provedná v režimu „on line" za období 1985 až 1993 (včetně rešerší na firmy, výrobce zařízení, různé druhy dokumentů)
- makroprofily k základním 23 tematickým sekcím databáze, např. sekce „Potravinářské vědy", „Balení potravin", „Maso a masné výrobky" a rovněž „Detergenty, mýdla", „Kosmetika" a „Tabákový průmysl"; tento počítačový výstup je reprograficky zpracováván jako referátový časopis „ Přehledy potravinářské literatury", rozšiřovaný uživatelům na základě jejich objednávek.

Rešerše z databáze ALIMIS-CS pomáhají uživatelům při vyhledávání ucelených textových informací (výtahů a zkrácených překladů) z důležitých prací o trendech ve světovém potravinářství, které byly publikovány v časopisu „Potravinářské aktuality" i v odborných informačních zpravodajích.

Vaše dotazy a objednávky zasílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
Londýnská 55, 120 21 Praha 2
tel. 250 051-4, Fax 207 411

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 291-298

CHARAKTERIZACE SORBENTŮ OSTSORB RED A OSTSORB BLUE PRO CHROMATOGRAFICKOU SEPARACI BÍLKOVIN

Milena KMÍNKOVÁ, Alexandra PROŠKOVÁ, Jiří KUČERA

Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař

Vlastnosti derivátů perlové celulosy pro chromatografii na imobilizovaných barvivech (Ostsorb blue a Ostsorb red) byly porovnány s vlastnostmi tradičních sorbentů tohoto typu (Sepharose blue a Sepharose red) pokud jde o velikost částic, optimální rychlost toku, výšku teoretického patra a redukovanou výšku teoretického patra, koncentraci barviva a kapacitu pro sorpci typických modelových bílkovin. Bylo prokázáno, že oba typy afinitních sorbentů jsou si velmi podobné, ne však zcela shodné.

afinitní chromatografie; enzymy; imobilizovaná barviva; kapacita; výška teoretického patra; optimální podmínky

Chromatografie bílkovin na imobilizovaných triazinových a vinylových barvivech dosáhla v posledních letech širokého uplatnění. Byla publikována řada podrobných referátů o vlastnostech těchto sorbentů a izolaci jednotlivých bílkovin (Dean, Watson, 1979; Bouriotis, Dean, 1981; Lowe, Pearson, 1981; Stellwagen, 1990; Kopperschleger, 1982), a to i v české odborné literatuře (Ploček, 1989). Přesto, že byla pro tento druh chromatografie zkoušena celá řada nosičů, a to jak anorganických, tak i organických, syntetických nebo přirozených (Anderson, Jervis, 1978; Angal, Dean, 1977; Baird et al., 1970), je stále hlavním používaným nosičem agarosa.

Agarosové gely mají při použití v chromatografii bílkovin mnoho výhod, z nichž nejvýznamnější je vysoká porosita, inertnost a snadná příprava derivátů. Mají však i některé nevýhody, z nichž nejvýznamnější je malá mechanická odolnost, velké změny objemu provázející změny iontové síly a pH, a vysoká cena.

Severočeské chemické závody v Ústí n. Labem vyrábějí již delší dobu různé druhy sorbentů na bázi perlové celulosy, které se svými vlastnostmi ve většině případů vyrovnají vlastnostem derivátů agarosy. Další deriváty vyrábí firma Iontosob, rovněž v Ústí n. Labem. V porovnání se sorbenty agarosovými vynikají vyšší mechanickou odolností, větší objemovou stálostí při změnách iontové síly a pH (Pešk a et al., 1976) a nižší cenou (Tokar, 1989). Perlová celulosa má také některé nedostatky, z nichž nejvýznamnější je nižší reaktivita při přípravě derivátů (Larm, Scholander, 1977) a skutečnost, že perlovou celulosu nelze připravit s velikostí částic tak nízkou, jako je tomu u některých typů agarosy. První nedostatek řeší výrobci příslušnou úpravou technologie. Druhý

nedosta-tek, který sorbentům zůstává, se projevuje pouze při FPLC. Při preparativním, makrolaboratorním a zejména provozním použití je větší průměr částic naopak výhodný a také agarosové sorbenty jsou pro tyto účely vyráběny záměrně s větším průměrem částic.

Většímu uplatnění sorbentů na bázi perlové celulosy brání především dosud malé zkušenosti s jejich aplikací pro separace jednotlivých bílkovin a především skutečnost, že jejich vlastnosti jako sorbentů pro specifické sorpce bílkovin nejsou dostatečně známy. Protože jsme přesvědčeni, že výhodné mechanické vlastnosti perlové celulosy mohou nalézt uplatnění především v průmyslové aplikaci chromatografických metod, zabývali jsme se charakterizací sorbentů Ostsorb red a Ostsorb blue. Pro snazší orientaci pracovníků, kteří mají zkušenosti se standardními sorbenty s imobilizovanými barvivy, jsme výsledky charakterizace porovnávali se současnými měřeními charakteristik běžně užívaných sorbentů Sepharose red a Sepharose blue firmy Pharmacia Uppsala, které nalezly i rozsáhlé průmyslové uplatnění (V i j a y a l a k s h m i, B e r t r a n d, 1989).

MATERIÁL a METODY

Použité sorbenty, deriváty perlové celulosy, byly výrobky firmy Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí n. Labem, dodávané pod obchodním názvem Ostsorb red a Ostsorb blue. Jedná se o perlovou celulosu substituovanou Ostazinovou modří a Ostazinovou červení. Obě tato barviva jsou prakticky shodná s barvivy používanými pro výrobu sorbentů Sepharose red (Procion red HE3B) a Sepharose blue (Cibacron blue F3GA).

Sorbenty Sepharose red a Sepharose blue, používané jako srovnávací standart, byly výrobky firmy Pharmacia Uppsala, Švédsko.

Glukosaoxidasa, katalasa, peroxidasa, kyselá fosfatasa a hovězí a lidský serumalbumin byly výrobky firmy Koch-Light. Všechny ostatní chemikalie byly výrobky firmy Lachema Brno, kvality ch. č.

Výšku teoretického patra jsme zjišťovali chromatografií glukosaoxidasy isokraticky v 50mM acetátu pH 5,5. Výpočet výšky teoretického patra jsme prováděli postupem, který popsali A n g a l a D e a n (1977).

Kapacitu sorbentů jsme stanovili tak, že jsme na sloupec sorbentu známého objemu ekvilibrovaný 10 mM Tris-HCl pufrem pH 7,5 čerpali roztok hovězího serumalbuminu (0,1 mg/ml) ve stejném pufru a sledovali průnikovou křivku. Kapacitu jsme pak stanovili podle elučního objemu odpovídajícího inflexnímu bodu vzestupné části průnikové křivky.

Výtěžnost bílkovin jsme stanovili tak, že jsme na sloupec sorbentu nanesli za stejných podmínek roztok hovězího serumalbuminu (20 % kapacity sloupce) v 10 ml Tris-HCl a po promytí počátečním pufrem jsme veškeré bílkoviny eluovali síranem amonným (c = 1,5 mol/l) ve stejném pufru.

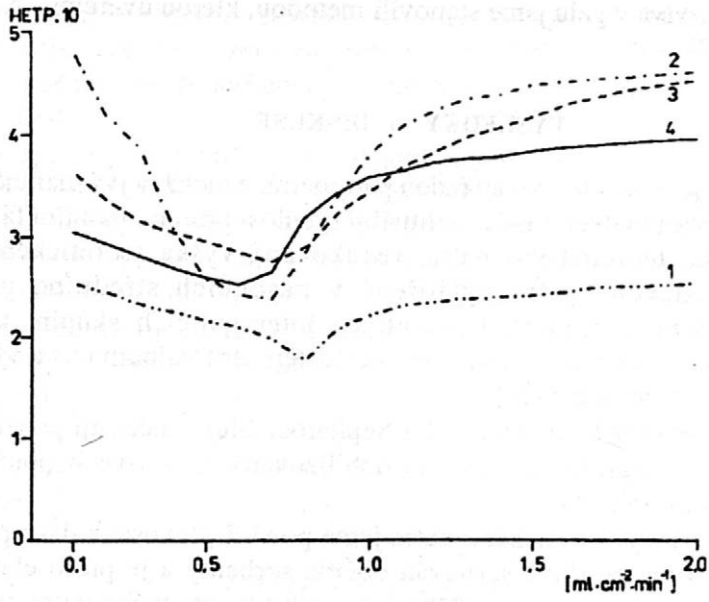
Koncentraci barviva v gelu jsme stanovili metodou, kterou uveřejnili A n g a l a D e a n (1977).

VÝSLEDKY a DISKUSE

Každý sorbent je charakterizován řadou parametrů, z nichž nejvýznamnější jsou střední průměr nabobtnalých částic, optimální rychlost průtoku mobilní fáze a s ní související výška teoretického patra, redukovaná výška teoretického patra (tj. výška teoretického patra vyjádřená v násobcích středního průměru nabobtnalých částic sorbentu), koncentrace interagujících skupin, kapacita sorbentu pro sorpci standardní bílkoviny (nejčastěji serumalbuminu) a výtěžnost separovaných bílkovin (recovery).

Protože jsou sorbenty Sepharose red a Sepharose blue nejčastěji používanými sorbenty pro chromatografii bílkovin na imobilizovaných barvivech, použili jsme je jako srovnávací standardy.

Pro stanovení výšky teoretického patra jsme použili glukosaoxidasu proto, že tento enzym je poměrně slabě sorbován oběma sorbenty a je proto eluován za počátečních podmínek, což je pro stanovení výšky teoretického patra nezbytné. Z elučního profilu jsme pak vypočetli výšku teoretického patra. Výška teoretického patra závisí rovněž na rychlosti průtoku mobilní fáze a proto jsme tato stanovení opakovali při různých průtokových rychlostech. Výsledek měření je pro všechny čtyři použité sorbenty uveden na obr. 1. Z grafického zpracování jsme stanovili minimum křivky závislosti výšky teoretického patra na rychlosti průtoku. Rychlost průtoku odpovídající tomuto minimu je optimální rychlostí. Výpočet optimální rychlosti průtoku mobilní fáze je možný rovněž z charakteristik bílkoviny a sorbentu. Tento výpočet však zahrnuje řadu obtížně stanovitelných veličin a výsledky se zpravidla neliší významně od hodnot zjištěných graficky (A n g a l, D e a n, 1977). Proto jsme volili tuto jednodušší metodu. Jak ukazuje obr. 1, není podstatných rozdílů mezi optimální rychlostí průtoku mobilní fáze pro všechny čtyři sorbenty. Přitom se optimální rychlost liší více mezi různými barvivy než mezi různými matricemi. Redukovaná výška teoretického patra je u sorbentů Ostsorb red a Sepharose red v podstatě stejná, zatímco mezi Ostsorb blue a Sepharose blue je významný rozdíl. Pro tento rozdíl nemáme teoretické vysvětlení. Výsledky jsou spolu se středním průměrem nabobtnalých částic sorbentu uvedeny přehledně v tab. I. Střední průměr nabobtnalých částic se projevuje zejména tím, že výška teoretického patra (HETP) je u agarosových sorbentů podstatně nižší než u sorbentů Ostsorb, jejichž průměr částic je vyšší. Z těchto výsledků jednoznačně vyplývá, že sorbenty Ostsorb red a Ostsorb blue jsou prakticky shodné se sorbenty Sepharose red a Sepharose blue s tím, že vzhledem k většímu střednímu průměru částic je nutné u sorbentů Ostsorb volit příslušně vyšší sloupec k dosažení stejné kvality dělení. Vzhledem k tomu, že jde o afinitní sorbent, u něhož je k dosažení dobrých výsledků zpravidla postačující jen malý počet teoretických pater, není zvýšení vrstvy sorbentu kritické.



1. Závislost výšky teoretického patra (HETP) na objemové rychlosti toku mobilní fáze pro sorbenty Ostsorb blue (1), Ostsorb red (2), Sepharose blue (3) a Sepharose red (4) – Dependence of the hieght of therotical plate (HETP) on the volume flow rate of mobile phase for the sorbents Ostborn blue (1), Ostsorb red (2), Sepharose blue (3) and Sepharose red (4)

Pro stanovení sorpční kapacity všech čtyř sorbentů jsme použili hovězí serumalbumin jako standard a kapacitu jsme stanovili měřením průnikové křivky (frontální analýzou). Kapacita sorbentů Ostsorb blue a Sepharose blue je velice blízká, zatímco kapacity sorbentů Ostsorb red a Sepharose red se značně liší. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že obsah barviva v sorbentu Ostsorb red je mnohem nižší než v sorbentu Sepharose red. Výsledky jsou shrnuty v tab. II, v níž je uveden i výtěžek hovězího serumalbuminu, koncentrace barviva a kapacita sorbentu vztažená na jednotkové množství barviva. Z tabulky je zřejmé, že Ostsorb red má daleko nižší koncentraci barviva v gelu, což se však na druhé straně logicky projevuje vyšší výtěžností. Až na tuto výjimku lze i zde říci, že barevné sorbenty Ostsorb a Sepharose jsou si vzájemně velmi blízké a pro preparativní aplikace zcela zaměnitelné.

Pro další charakterizaci sorbentů Ostsorb red a Ostsorb blue jsme provedli chromatografii hovězího a lidského serumalbuminu, kyselé fosfatasy, katalasy a peroxidasy. Pro charakterizaci sorbentů jsme považovali za nutné, aby chromatografický postup byl pro všechny tyto bílkoviny jednotný přesto, že pro některé z nich nebude optimální. Kolonu jsme ekvilibrovali počátečním pufrem (0,1M acetát pH 5,0) a vzorky nanášeli ve stejném pufru. Po promytí kolony počátečním pufrem (pětinásobkem celkového objemu) jsme aplikovali gradient

I. Porovnání HETP a μ_{opt} sorbentů Ostsorb a odpovídajících sorbentů Sepharose – Comparison of HETP and μ_{opt} characteristics in Ostsorb sorbents and in corresponding Sepharose sorbents

Sorbent	HETP [mm]	RHETP	μ_{opt} [cm . min^{-1}]	d_p [mm]
Ostsorb blue	0,265	2,68	0,95	0,0987
Sepharose blue	0,213	1,77	1,02	0,1205
Ostsorb red	0,510	2,48	0,86	0,205
Sepahrose red	0,176	2,44	0,89	0,072

HETP = výška teoretického patra – height of theoretical plate

RHETP = redukovaná výška teoretického patra – reduced height of theoretical plate

μ_{opt} = optimální lineární rychlost toku mobilní fáze – optimum linear flow rate of mobile phase

d_p = střední průměr nabobtnalých částic – average swollen particle diameter

KCl (0 až 1 M) v objemu rovném desetinásobku celkového objemu sloupce. Konečně byl pak sloupec eluován 1M KCl v počátečním pufru (pětinásobkem celkového objemu). Koncentrace KCl nutná pro eluci jednotlivých bílkovin charakterizuje možnosti separace. Některé bílkoviny nebyly za těchto podmínek eluovány z účinějšího sorbentu (Ostsorb blue a Sepharose blue) - tab III.

Z porovnání hodnot v tab. III vyplývá jednoznačný závěr, že všechny sledované bílkoviny jsou ze sorbentů Ostsorb eluovány při nižší koncentraci KCl než z odpovídajících sorbentů Sepharose. Rozdíly dosahují v některých případech až 20 %. Znamená to tedy, že interakce bílkovin se sorbenty Ostsorb jsou slabší než interakce týchž bílkovin s odpovídajícími sorbenty Sepharose. Při praktickém provádění chromatografie na sorbentech Ostsorb je třeba brát tuto skutečnost

II. Porovnání kapacit sorbentů Ostsorb red a Ostsorb blue s analogickými sorbenty Sepahrose red a Sepahrose blue – Comparison of the capacities of Ostsorb red and Ostsorb blue sorbents with analogical Sepharose red and Sepharose blue sorbents

Sorbent[1]	Koncentrace barviva[2] [μM . ml^{-1}]	Kapacita sorbentu[3] [mg BSA . ml^{-1}]	Kapacita sorbentu[4]	Výtěžek[5] (BSA) [%]
Ostsorb blue	3,05	24,2	7,93	73,2
Sepharose blue	2,1	19,6	9,33	75,2
Ostsorb red	0,725	4,18	5,76	84,3
Sepahrose red	2,4	32,3	13,46	41,7

BSA = hovězí serumalbumin –bovine serum albumin

[1]sorbent;[2]dye concentration; [3]sorbent capacity; [4]sorbent dye capacity; [5]recovery

III. Koncentrace KCl nutná k eluci jednotlivých modelových bílkovin ze sorbentů Ostsorb blue a Ostsorb red ve porovnání s odpovídajícími sorbenty Sepharose blue a Sepahrose red (Podmínky jsou uvedeny v textu) – KCl concentrations needed for elution of model proteins form Ostsorb blue and Ostsorb red sorbents in comparison with coresponding Sepharose blue and Sepharose red sorbents (The conditions are described in the text)

Sorbent[1]	Koncentrace KCl [mol . l^{-1}] nutná k eluci[2]				
	BSA	HSA	kyselé fosfatasy[3]	katalasy[4]	peroxidasy[5]
Ostsorb blue	ne[6]	ne	0,76	0,74	ne
Sepharose blue	ne	ne	0,75	0,74	ne
Ostsorb red	0,82	0,71	0,31	0,85	0,91
Sepharose red	1,00	1,00	0,38	1,00	1,00

BSA = hovězí serumalbumin – bovine serum albumin

HSA = lidský serumalbumin – human serum albumin

[1]sorbent; [2]KCl concentration needed for elution; [3]acid phosphatases; [4]catalases; [5]peoxidases; [6]none

v úvahu, avšak neznamená to, že by sorbenty Ostsorb byly méně vhodné či vhodnější než sorbenty Sepharose. V řadě případů činí eluce bílkovin ze sorbentů s imobilizovanými barvivy potíže právě pro příliš silnou sorpci. Tam je použití sorbentů Ostsorb výhodnější než použití sorbentů Sepharose. V některých, méně častých, případech je však interalce imobilizovaného barviva s bílkovinou slabá (příkladem může být trypsininhibitor sóji) a pak je výhodnější použití sorbentu Sepharose. Z tab. III je rovněž vidět, že pro některé bílkoviny může být sorpce na sorbentech Ostsorb blue či Sepharose blue příliš pevná. V tom případě dobře poslouží sorbenty Sepharose red nebo Ostsorb red, jejichž interakce jsou slabší vlivem odlišné struktury barviva (nižší počet aromatických cyklů).

Závěrem je možné konstatovat, že sorbenty Ostsorb jsou pro většinu preparativních prací zcela zaměnitelné se sorbenty Sepharose. V okrajových oblastech specificity jsou však charakteristické rozdíly. Zatímco sorbenty Ostsorb jsou vhodnější než sorbenty Sepharose všude tam, kde jsou interakce barvivo - bílkovina příliš silné, jsou sorbenty Sepharose vhodnější tam, kde by intenzita interakcí byla u sorbentů Ostsorb nízká. V obou případech však jde o mezní případy, při nichž je právě na místě uvažovat o jiných metodách separace.

Literatura

ANDERSON, P. A. - JERVIS, L.: High-capacity adsorbents for affinity chromatography. Biochem. Soc. Transact., *6*, 1978 : 263-272.

ANGAL, S. - DEAN, P. D. G.: The effect of matrix on the binding of albumin to immobilized Cibacron Blue. Biochem. J., *167*, 1977 : 301-303.

BAIRD, J. K. - SHERWOOD, R. F. - CARR, R. J. G. - ATKINSON, A.: Enzyme purification by substrate elution from procion dye-polysaccharide matrices.FEBS Lett., *70*, 1970 : 61-66.
BOURIOTIS, V. - DEAN, P. D. G.: Use of triazine dyes in the affinity chromatographic purification of alkaline phosphatase from calf intestine. J. Chromatogr., *206*, 1981 : 521-530.
DEAN, P. D. G. - WATSON, D. H.: Protein purification using triazine dyes. J. Chromatogr., *165*, 1979 : 301-319.
KOPPERSCHLEGER, G.: Adv. Biochem. Eng., *25*, 1982 : 101-138.
LARM, O. - SCHOLANDER, E.: Coupling of proteins and other amines to carbohydrate polymers via bromine oxidation and reductive amination. Carbohyd. Res., *58*, 1977 : 249-251.
LOWE, C. R. - PEARSON, J. C.: Affinity chromatography on immobilized dyes. Methods Enzymol., *104*, 1981 : 97-113.
PEŠKA, J.- ŠTAMBERG, J.- HRADIL, J.: Chemical transformations of polymers. XIX. Ion exchange derivatives of bead cellulose. Angew. Makromol. Chem., *53*, 1976 : 73-81.
PLOCEK, J.: Reaktivní barviva - teoretické a praktické aspekty jejich interakcí s bílkovinami. Chem. Listy, *83*, 1989 : 155-173.
STELLWAGEN E.: Methods Enzymol., *182*, 1990 : 343-357.
TOKAR, O.: Technická zpráva. Ústí n.Labem, Spolchemie 1989.
VIJAYALAKSHMI, M. A. - BERTRAND, O. (Eds.): Protein-Dye Interaction. Elsevier Appl.Sci. 1989.

Došlo dne 17. 6. 1991

M. Kmínková, A. Prošková, J. Kučera (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Characterization of Ostsorb red and Ostsorb blue sorbents for protein chromatographic separation

Characteristics of sorbents for bead-cellulose-based dye-ligand chromatography (Ostsorb blue and Ostsorb red) are compared with traditional sorbents of this kind (Sepharose blue and Sepharose red). These characteristics were determined: particle mean radius (Ostsorb blue 0.0987 mm, Ostsorb red 0.205 mm), optimum linear flow rate (Ostsorb blue 0.95 cm/min, Ostsorb red 0.86cm/min), height of theoretical plate (Ostsorb blue 0.265 mm, Ostsorb red 0.510 mm) and reduced height of theoretical plate, that means height of theoretical plate as particle mean multiples (Ostsorb blue 2.68, Ostsorb red 2.48). All these characteristics were compared with the same parameters of Sepharose blue and Sepharose red sorbents. Both types of sorbents were demonstrated to be congruent with each other in these characteristics. Dye concentrations in both types of sorbents were also similar, but there are certain differences between both types in this parameter. The highest dye concentration was determined in the Ostsorb blue sorbent (3.5 μM/ml), the lowest in the Ostsorb red sorbent (0.725 μM/ml). Hence the dye concentrations in Sepharose sorbents are much more even (Sepharose blue 2.1 μM/ml, Sepharose red 2.4 μM/ml). The dye concentration is also manifested in the sorption capacity, which was determined for bovine serum albumin as a model protein. The highest capacity was observed in the Sepharose red sorbent (13.46 mg/ml), the lowest in the Ostsorb red (5.76 mg/ml). The sorbents Sepharose blue

(9.33 mg/ml) and Ostsorb blue (7.93 mg/ml) have similar sorption capacities. On the other hand, the lower capacity results in the higher recovery of bovine serum albumin in the elution process. The highest recovery was determined for Ostsorb red (84.3 %), while the recovery of the highest substituted sorbent Sepharose red was only 41.7 %. The recovery values of the Ostsorb blue sorbent (73.2 %) and of the Sepharose blue sorbent (75.2 %) were actually the same. Model proteins, such as bovine serum albumin, human serum albumin, acid phosphatase, catalase and peroxidase, were sorbed on all four sorbents and they were eluted with an ionic strength gradient applying the standard procedure. This comparison shows that there are not in fact any differences in elution volumes when the Ostsorb sorbent and the Sepharose sorbent with the same dye are used. In both case the sorbents with triazine dye are more efficient, and this is a well-know and practically utilized property of the Sepharose sorbent. The results of this comparison document that bead-cellulose-based sorbent (Ostsorb) are equivalent to agarose-based sorbents (Sepharose); this finding is of practical importance because bead cellulose is more resistant mechanically and it can resist to pressures up to 0.3 MPa while agarose is resistant to pressures of only 40 cm water column. In addition, unlike agarose, bead cellulose is easy to be sterilized and it changes its volume very little if ionic strength and pH value are changed. All these qualities illustrate the fact that bead-cellulose sorbents are more feasible to industrial applications of sorption techniques, particularly in the food and pharmaceutic industries. The detection of identical properties suggests an opportunity for the industrial employment of sorptions on immobilized dyes.

sorbents; Ostsorb; trazine dyes; protein separation

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 299-310

KORELACE SENZORICKÉ A PŘÍSTROJOVÉ VISKOZITY TEKUTÝCH POTRAVIN*

Milan HOUŠKA, Jana RYSOVÁ, Alena KUBEŠOVÁ, Pavel ŠRÁMEK

Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař

Na modelovém případě byl ověřen způsob hodnocení senzorické viskozity tekutých potravin (jako jeden z alternativních znaků textury) na základě objektivního měření viskozity provozním přístrojem. Jako modelové materiály byly použity zahuštěná mléka, sirupy, nápoje apod. Těžištěm práce bylo zjištění vztahů mezi senzorickou a přístrojovou viskozitou. Byly testovány dvě metody stanovení senzorické viskozity (podle návrhu normy ISO a námi volený způsob hodnocení doby stékání ze lžičky) a výsledky korelovány s údaji naměřenými provozními viskozimetry (přesně kalibrovaný výtokový pohárek a rotační viskozimetr RN211). Bylo zjištěno, že existuje velmi úzká korelace mezi senzorickou viskozitou a logaritmem viskozity naměřené přístroji. Abychom naznačili způsob využití získané obecně platné korelace, provedli jsme modelový preferenční test pro mandarinkový nápoj z hlediska senzorické viskozity a určili její meze přijatelnosti. Z těchto mezí jsme s využitím známé korelace stanovili meze přijatelnosti přístrojové viskozity pro daný výrobek. Současně byla určena optimální dávka zahušťovadla z hlediska dosažení optimální senzorické viskozity. Tento postup lze zobecnit pro další případy a je použitelný pro rychlou kontrolu viskozity tekutých výrobků.

viskozita; senzorické hodnocení; textura; tekuté potraviny

Objektivní senzorické hodnocení konzistence a textury potravin je velmi pracné. Vyžaduje sestavení zkušeného týmu hodnotitelů a jejich sjednocení na způsobech hodnocení textury a konzistence daných výrobků. Jinak se hodnotí potraviny tuhé, jinak pastovité a jinak tekuté. Ve výrobě potravin však není zpravidla možné takový tým sestavit a hodnotit texturu v době, kdy je možné provést její nápravu. Proto se zabýváme hledáním fyzikálních metod měření konzistence a textury, které umožní toto senzorické stanovení nahradit. Je-li taková náhrada možná, stanoví se zjištěním vzájemné korelace výsledků kvantifikovaného senzorického hodnocení

* Práce byla dělána jako součást projektu Ministerstva hospodářství ČR „Textura a jakost potravin".

konzistence s výsledky měření vhodně zvolené fyzikální veličiny. Volí se taková fyzikální veličina, jejíž stanovení se provádí za geometrických i dynamických podmínek podobných deformačnímu působení při senzorickém hodnocení textury dané potraviny člověkem. Vzájemné korelace mezi senzoricky stanovenými parametry textury a fyzikálními vlastnostmi potravin existují například mezi senzorickou pevností při lámání a pevností v lomu stanovenou na přístroji Instron pro křehký chléb (P o k o r n ý et al., 1991) nebo mezi senzorickou konzistencí a reologickým koeficientem konzistence (H o u š k a et al., 1988) pro rajčatové protlaky, případně mezi mechanickou pevností a senzoricky hodnocenou tvrdostí sýra Niva (H o u š k a et al., 1991).

Existuje-li tedy vzájemná nahraditelnost metod, je možné ke stanovení konzistence používat fyzikální metodu měření vhodným přístrojem. To však pro praxi samo o sobě není dostačující. Zde je totiž nutné stanovit mezní hodnoty dané fyzikální veličiny a tedy i senzorické konzistence, v jejichž rámci je daný výrobek ještě přijatelný z hlediska charakteru daného výrobku hodnoceného jak odborníky, tak zejména spotřebitelskou veřejností. Při znalosti těchto mezí je pak možné vyřazovat z expedice takové výrobky, jejichž konzistence leží mimo tyto meze. Tak lze zajistit, že konzumenti obdrží vždy výrobek dané charakteristické kvality. Výše zmíněné metody je pak možné využít při vývoji nových výrobků, při změně technologie výroby apod. k rychlému testování správnosti daného zásahu a vyloučení zcela nepřijatelných postupů výroby.

MATERIÁL a METODY

Pro modelovou aplikaci výše zmíněného postupu jsme zvolili příklad stanovení viskozity tekutých potravin. Pro stanovení senzorické textury existuje velmi podrobný popis metodik zahrnutý do návrhu ISO normy 11036. Zde se popisuje metoda stanovení viskozity a vzory potravin sloužící jako standardy. Viskozita se stanovuje jako úsilí potřebné k nasátí vzorku ze lžičky do úst (jakési srkání) a jako vzorek řídký se uvádí voda, jako standard hustý se uvádí slazené zahuštěné mléko.

Tuto metodu jsme zvolili jako základní a doplnili ji metodou stanovení doby stékání vzorku ze lžičky do počátku odkapávání. Formuláře a návody k senzorickému hodnocení jsou uvedeny dále. Stanovení senzorické viskozity se provádělo v laboratoři se šesti oddělenými kójemi, vyhovující požadavkům normy ISO 8589.

Formuláře, sběr dat a jejich vyhodnocení se provádělo na síti počítačů programem Senzor (E c k, Ž á r s k ý, 1991). Pro kvantifikaci hodnocení byla zvolena sedmibodová číselná stupnice s vyznačením krajních bodů a dvou vnitřních hodnot (3 a 5) tak, aby délka úseků byla shodná. K hranicím úseků byly přiřazeny typické standardy, jejichž viskozitu jsme předem stanovili přístrojově. Jejich viskozita se měnila za teploty laboratoře 23 °C přibližně o řád: voda cca 1 mPa.s, smetana ke šlehání 33 % tuku cca 10 mPa.s, sirup cca 100 mPa.s a slazené zahuštěné mléko cca 1700 mPa.s. Rovněž jsme zvolili slovní popis intenzity

viskozity pro tyto standardy: voda vodová, smetana řídká, sirup sirupovitý a slazené zahuštěné mléko husté.

Kromě strukturované sedmibodové stupnice jsme použili nestrukturovanou úsečku s označením krajních mezí s tím, že si hodnotitel mohl volit plynule mezi těmito krajními mezemi v rozsahu čísel (jde o počítačově vyhodnocovanou úsečku) 1 až 70 s krokem 1.

Hodnotitelé byli školeni opakovaným podáváním standardů a hodnocením viskozity pořadovým testem. Dále byly podávány vzorky neznámé viskozity s tím, že hodnotitelé měli k disposici standardy u sebe. Zde již bylo úkolem zhodnotit intenzitu viskozity pomocí sedmibodové stupnice nebo úsečkou. Po zaškolení bylo hodnocení prováděno bez podání standardů, standardy byly k disposici pouze na vyžádání.

Vyškolený soubor hodnotitelů jsme dále využili ke stanovení optimální viskozity modelového ovocného nápoje připraveného z deseti dílů různě koncentrovaných roztoků mandarinkového koncentrátu Bonita. Tak bylo zajištěno, že byly vzorky stejně sladké a lišily se pouze viskozitou. Ke změně viskozity se použily vodné roztoky Hamulsionu o koncentraci 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 a 0,5 % hmotnostních. K hodnocení přijatelnosti daného vzorku nápoje jsme použili tříbodovou stupnici a formulář uvedený dále v textu. Hodnotitelé mohli udávat stupně optimality viskozity s přesností na jedno desetinné místo (nebylo tedy nutné se jednoznačně rozhodnout zda je daný vzorek vyhovující či nikoli).

Výsledky všech senzorických hodnocení byly statisticky vyhodnoceny (stanoven aritmetický průměr a střední kvadratická odchylka) s využitím vyřazování odlehlých stanovení na základě Studentova testu na hladině významnosti 0,05. Celkový počet hodnotitelů byl nejméně 10.

K měření dynamické viskozity přístrojově jsme použili provozní rotační reometr Rheotest RN 211 a dále přesně kalibrovaný výtokový pohárek vlastní konstrukce s třemi výměnnými tryskami. Podrobnosti o způsobu měření výtokovým pohárkem uvádí H o u š k a (1986). Stanovuje se doba výtoku 100 ml kapaliny a pomocí kalibračních vztahů se vypočte z doby výtoku kinematická viskozita. Dále se stanoví hustota (vážením objemu kapaliny 100 ml) a z kinematické viskozity a hustoty se stanoví dynamická viskozita. Měření byla provedena opakovaně a ze získaných výsledků byl stanoven aritmetický průměr a střední kvadratická odchylka.

Rotačním reometrem se měří odpor mezikruhového prstence kapaliny proti rotaci konstantními otáčkami. Odpor se odečítá na stupnici přístroje v dílcích a přepočítává na smykové napětí. Pro zvolené otáčky se z tabulky určí smyková rychlost a z podílu smykového napětí a smykové rychlosti se určí dynamická viskozita.

Viskozita vzorků se měřila pokud možno při všech čtyřech stupních otáček a byl stanoven aritmetický průměr hodnot a střední kvadratická odchylka.

Formuláře hodnocení

1. Hodnocení viskozity stupnicovou metodou

Metoda stékání ze lžičky

Popis úkolu: Nalijte si plnou lžičku vzorku a nechte jej stékat ze lžičky. Hodnoťte dobu plynulého stékání vzorku ze lžičky až do chvíle, kdy začne vzorek odkapávat. Hodnocení zapište podle následující stupnice (výsledky udávejte např. ve tvaru 1,5 apod.)

1 ...	potravina vodová	příklad voda
2 ...		
3 ...	potravina řídká	příklad smetana ke šlehání 33%
4 ...		
5 ...	potravina sirupovitá	příklad sirup
6 ...		
7 ...	potravina hustá	příklad slazené zahuštěné mléko

Metoda sání ústy podle ISO

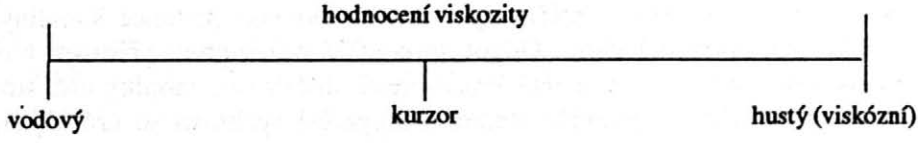
Popis úkolu: Plnou lžičku vzorku umístěte ke rtům. Jazykem se dotkněte lžičky a vzorek nasávejte konstantní rychlostí přes jazyk do úst. Hodnoťte sílu potřebnou k nasátí vzorku. Hodnocení zapište podle následující stupnice (výsledky udávejte např. ve tvaru 1,5 apod.):

1 ...	potravina vodová	příklad voda
2 ...		
3 ...	potravina řídká	příklad smetana ke šlehání 33%
4 ...		
5 ...	potravina sirupovitá	příklad sirup
6 ...		
7 ...	potravina hustá	příklad slazené zahuštěné mléko

2. Hodnocení viskozity grafickou metodou

Metoda stékání ze lžičky

Popis úkolu: Nalijte si plnou lžičku vzorku a nechte jej stékat ze lžičky. Hodnoťte dobu plynulého stékání vzorku ze lžičky až do chvíle, kdy začne vzorek odkapávat. Hodnocení vyznačte pomocí kurzoru na následující úsečku:



Senzorická analýza

vzorek číslo:

vyberte prosím číslo nádobky

Metoda sání ústy podle ISO

Popis úkolu: Plnou lžičku vzorku umístěte ke rtům. Jazykem se dotkněte lžičky a vzorek nasávejte konstantní rychlostí přes jazyk do úst. Hodnoťte sílu potřebnou k nasátí vzorku. Hodnocení vyznačte pomocí kurzoru na následující úsečku:



Senzorická analýza
vzorek číslo:
vyberte prosím číslo nádobky

3. Hodnocení optimality viskozity ovocného nápoje

Hodnocení stupnicovou metodou

Hodnoťte prosím následující vzorky na základě zkušeností získaných při senzorickém stanovení viskozity. Vyjádřete pomocí stupnice nakolik se vzorky odlišují od vaší představy optimální viskozity ovocného nápoje.

Stupnice hodnocení: 1 - příliš vodový
2 - optimální
3 - příliš hustý
Hodnocení budete provádět u šesti vzorků a jedné vlastnosti.

VÝSLEDKY a DISKUSE

Výsledky stanovení senzorické a přístrojové viskozity různých kapalných potravin jsou uvedeny v tab. I, v níž jsou uvedeny i parametry použitých standardů. Uvedené výsledky kinematické a dynamické viskozity byly naměřeny výtokovým pohárkem. Dynamická viskozita byla kontrolována rotačním reometrem RN211. Rozdíly mezi dynamickou viskozitou stanovenou pomocí pohárku a rotačním reometrem byly menší než 5 %. V řádcích pod údaji viskozit jsou uvedeny střední kvadratické odchylky jednotlivých stanovení. Je zřejmé, že přístrojově stanovené veličiny mají podstatně menší relativní odchylky než veličiny stanovené senzoricky (cca 1 % a 6 %).

Uvedené soubory dat byly podrobeny korelační analýze. Nejprve jsme použili lineární korelace mezi veličinami. Získané hodnoty korelačních koeficientů jsou uvedeny v tab. II. Tyto korelační koeficienty jsou poměrně nízké. Vzhledem k tomu, že pro senzorické veličiny jsme zvolili lineární stupnice a přitom se přístrojové viskozity měnily řádově, zvolili jsme jako další způsob korelace výsledků transformaci přístrojových viskozit logaritmováním. Získané korelační koeficienty jsou uvedeny v tab. II. Ukazuje se, že se stupeň korelace výrazně zvýšil. To vede k závěru, že senzoricky stanovené veličiny velmi dobře korelují s logaritmem viskozity stanovené přístrojově. Tento závěr platí pro námi zkoumaný široký rozsah viskozit. Při zkoumání užšího rozsahu viskozit lze předpokládat existenci lokálně lineární korelace.

I. Hodnoty senzorických a přístrojových viskozit a hustot pro modelové tekuté potraviny – Values of sensoric and instrumental viscosities and densities for model liquid foods

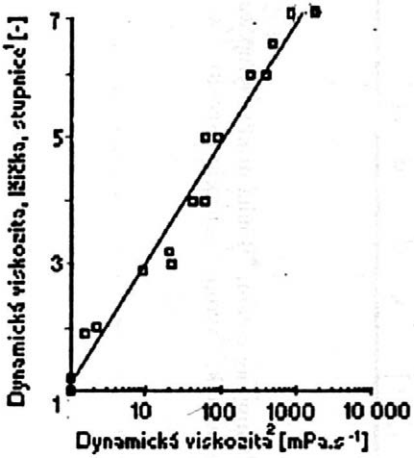
Vzorek[1]	T [°C]	Senzorická viskozita[15]				$10^6.\nu$ [$m^2.s^{-1}$]	μ [mPa.s]	ρ [$kg.m^{-3}$]
		stupnicí[16]		graficky[17]				
		lžička[18]	sání ISO[19]	lžička	sání ISO			
Mléko[2]	23,5	2 0,1	2 0,1	10,9 1,7	10,4 2,1	2,1 0,02	2,2 0,02	1023 -
Šlehačka trvanlivá[3]	23,5	4 0,3	3,9 0,2	38,3 4,6	36,3 3,2	61,4 0,2	60,0 0,2	997
Salko/Tatra (80 %/20 %)	23,5	6 0,1	6 0,1	60,1 2,8	60,2 2,8	313 5	387 5	1237
Voda[4]	20	1*)	1*)	1*)	1*)	1	1	1000
Salko (slazené zahuštěné mléko)[5]	20	7*)	7*)	70*)	70*)	1317 15	1723 20	1308
Sirup ovocný[6]	24,5	5**)	5**)	-	-	76 1,2	100 1,3	1315
Smetana ke šlehání[7]	24,3	3**)	3**)	-	-	10 0,1	9,7 0,1	965
Bonita nápoj[8]	23,5	1,9 0,23	1,9 0,2	6,7 2,2	6,3 2,3	1,5 0,01	1,53 0,01	1019
Sirup/voda[9] (90 %/10 %)	23,8	4,0 0,1 0,1	3,9 0,2 0,1	32 4,6 2,5	31,8 2,8 2,5	32,6 0,3 1,9	41,7 0,3 2,0	1278

Šípkový čaj neslazený[11]	24	1,2 0,1	1,2 0,1	3,0 1,2	3,3 1,2	1	1	1000
Tatra (zahuštěné neslazené mléko)[12]	24	3,0 0,1	3,4 0,2	18,5 1,9	22,8 2,3	20,6 0,2	22,0 0,2	1071
Salko/Tatra (50 %/50 %)	24	5,0 0,08	5,0 0,1	42,2 2,8	45,2 2,2	52,4 0,6	61,3 0,6	1171
Salko/Tatra (90 %/10 %)	24	6,5 0,07	6,5 0,04	65,0 1,8	64,7 1,5	376 2	47,4 2	1260
Tatra /mléko[13] (60 %/40 %)	24,4	2,9 0,2	2,9 0,2	17,7 3,7	15,0 2,2	8,7 0,1	9,1 0,1	1051
Sirup/voda (80 %/20 %)	24,3	3,2 0,2	3,4 0,1	16,6 1,3	19,8 3,1	16,7 0,1	20,6 0,1	1237
Sirup*) [14]	24,2	5,0 0,1	5,0 0,1	47,6 1,8	47,2 3,1	67,4 1	89,0 1	1321
Salko/Tatra (95 %/5 %)	24,4	7,0 0,1	7,0 0,07	68,2 1,3	67,0 1,7	605 8	770 9	1274

*) standardy zahrnuté do korelace – standards included in correlations
**) standardy nezahrnuté do korelace – standards not included in correlations

[1]sample; [2]milk; [3]UHT cream; [4]water; [5]Salko (sweetened concentrated milk); [6]fruity syrup; [7]whipping cream; [8]Bonita drink; [9]syrup/water; [10]Bonita concentrate; [11]unsweetened hip tea; [12]Tatra (concentrated non-sweetened milk); [13]Tatra/milk; [14]syrup; [15]sensoric viscosity; [16]scale; [17]graphically; [18]spoon; [19]slurping as stated by ISO

Potrav. Vědy, 11, 1993 (4) : 299-310

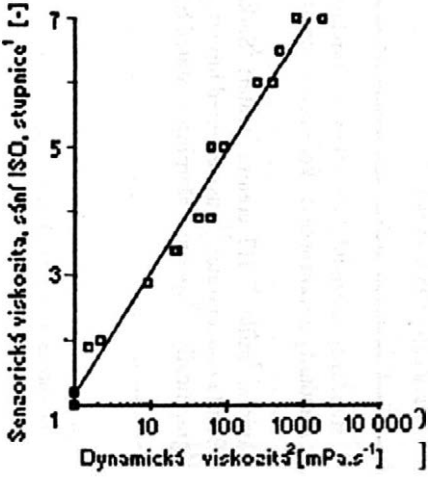


[1]sensoric viscosity, spoon scale; [2]dynamic viscosity

1. Vzájemná korelace senzorické viskozity stanová stékáním ze lžičky hodnocené sedmibodovou stupnicí a logaritmem dynamické viskozity – Mutual correlation of sensoric viscosity determined by running down from the spoon evaluated by seven-point scale and logarithm of dynamic viscosity determined

Výsledné korelační vztahy mezi senzorickými a přístrojově stanovenými viskozitami jsou uvedeny v tab. III.

Z údajů tab. II a III plyne, že rozdíly v korelačních koeficientech a korelačních vztazích jsou (jak mezi jednotlivými metodami stanovení senzorické viskozity, tak mezi kinematickou a dynamickou viskozitou) zanedbatelné a statisticky nevýznamné. Dokonce se neprojevil ani vliv plynulosti grafické stupnice, často uváděné v literatuře jako výhodnější proti pevné stupnici, neboť při počítačovém způsobu vyhodnocení i při používání pevné stupnice je možné udávat mezihodnoty plynule s přesností na jedno desetinné místo. Z výsledků uvedených v tab. II plyne, že jsou korelace při použití stupnice mírně (ač statisticky nevýznamně) těsnější.



[1]sensoric viscosity, slurping ISO, scale; [2]dynamic viscosity

2. Vzájemná korelace senzorické viskozity stanovené metodou sání podle ISO hodnocené sedmibodovou stupnicí a logaritmu dynamické viskozity stanovené výtokovým pohárkem – Mutual correlation of sensoric viscosity by the method of slurping as stated by ISO evaluated by seven-point scale and logarithm of dynamic viscosity determined by cup

II. Korelační koeficienty mezi viskozitami senzorickými a přístrojovými (do korelace zahrnuto vždy 16 dvojic dat) – Correlation coefficients between sensoric and instrumental viscosities (correlation includes always 16 pairs of data)

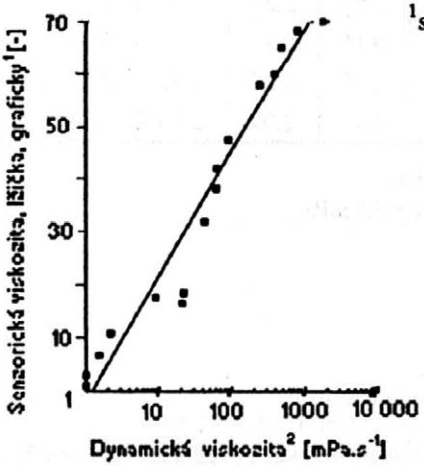
Senzorická viskozita stanovená metodou[1]:	Přístrojová viskozita[2]			
	$10^6.\nu$ [$m^2.s^{-1}$]	μ [mPa.s]	log ($10^6.\nu$) [$m^2.s^{-1}$]	log (μ) [mPa.s]
Stékání ze lžičky[3] - stupnice[5]	0,703	0,696	0,983	0,985
Sání podle ISO[4] - stupnice	0,701	0,69	0,986	0,988
Stékání ze lžičky - graficky[6]	0,709	0,702	0,975	0,975
Sání podle ISO - graficky	0,705	0,697	0,980	0,981

[1]sensoric viscosity determined by the method; [2]instrumental viscosity; [3]pouring down from spoon; [4]slurping as stated by ISO; [5]scale; [6]graphically

III. Tabulka korelačních vztahů – Table of correlation relationships

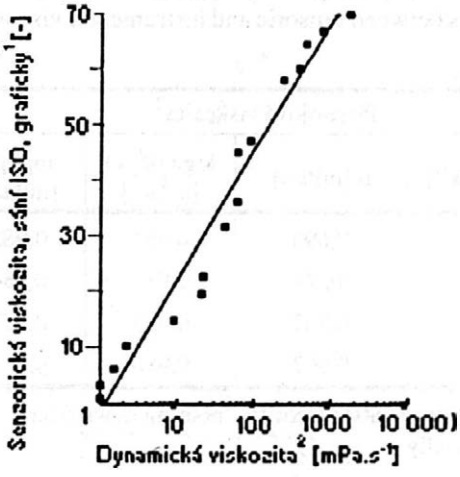
Stupnice[1]		Graficky[2]	
Lžička[3]	= 1,13 + 1,98.log($10^6.\nu$) = 1,11 + 1,91.log(μ)	Lžička[3]	= -0,98 + 23,76.log($10^6.\nu$) = -1,08 + 22,89.log(μ)
Sání[4]	= 1,17 + 1,97.log($10^6.\nu$) = 1,15 + 1,90.log(μ)	Sání[4]	= -0,65 + 23,67.log($10^6.\nu$) = -0,77 + 22,82.log(μ)

[1]scale; [2]graphically; [3]spoon; [4]slurping



[1]sensoric viscosity, spoon, graphical; [2]dynamic viscocity

3. Vzájemná korelace senzorické viskozity stanovené z doby stékání ze lžičky hodnocené grafickou úsečkou a a logaritmem dynamické viskozity stanovené výtokovým pohárkem – Mutual correlation of sencoric viscosity determined from the time of running down from the spoon evaluated by the graphic line segment and logarithm of dynamic viscosity determined by cup



[1]sensoric viscosity, slurping ISO, graphical; [2]dynamic viscocity

4. Vzájemná korelace senzorické viskozity stanovené metodou sání podle ISO při hodnocení grafickou úsečkou a logaritmem dynamické viskozity stanovené výtokovým pohárkem – Mutual correlation of sencoric viscosity determined by the method of slurping as stated by ISO in evaluation by graphic line segment and logatithm of dynamic viscosity determined by cup

Možným důvodem mírně horších výsledků grafického způsobu hodnocení senzorické viskozity může být fakt, že na rozdíl od pevné stupnice nebyly na grafické stupnici přiřazeny standardy o středních viskozitách (smetana ke šlehání a sirup).

Těsnost korelací mezi senzoricky stanovenými viskozitami a dynamickou viskozitou je možné posoudit z obr. 1 až 4. Pro kinematickou viskozitu jsou

IV. Senzorické hodnocení optimální viskozity mandarinkového nápoje stupnicovou metodou – Sensoric evaluation of optimum viscosity of mandarin orange by scale method

Ukazatel[1]	Vzorek č.[6]					
	1	2	3	4	5	6
Průměr[2]	1,6	2,0*)	2,2*)	2,6	2,9	3,0
Směrodatná odchylka[3]	0,16	0,11	0,15	0,15	0,03	0,01
Horní mez intervalu spolehlivosti[4]	1,83	2,25	2,47	2,81	2,97	3,02
Dolní mez intervalu spolehlivosti[5]	1,36	1,76	2,09	2,36	2,73	2,92

1 - bez zahušťovadla – without thickener $\mu = 1{,}5$ mPa.s
2 - s 0,1 % zahušťovadla – with 0.1% of thickener $\mu = 5{,}1$ mPa.s
3 - s 0,2 % zahušťovadla – $\mu = 9{,}0$ mPa.s
4 - s 0,3 % zahušťovadla – $\mu = 12$ mPa.s
5 - s 0,4 % zahušťovadla – $\mu = 20$ mPa.s
6 - s 0,5 % zahušťovadla – $\mu = 33$ mPa.s

*) vzorek s optimální viskozitou – sample with optimum viscosity

[1]indicator; [2]average; [3]standard deviation; [4]upper limit of interval of reliability; [5]lower limit of interval of reliability; [6]sample No.

průběhy obdobné. Uvedenými daty jsou proloženy přímky odpovídající korelačním vztahům z tab. III

Tyto korelace potvrzují, že je možné nahradit senzorické stanovení viskozity přístrojovým, s menší citlivostí k chybám v senzorické viskozitě než při opačném postupu (stupnice přístrojové viskozity je logaritmická).

Výsledky stanovení optimální viskozity ovocného (v našem případě mandarinkového) nápoje jsou uvedeny v tab. IV. Hodnocení provádělo 15 hodnotitelů, čtyři z nich nebyli vyškoleni na hodnocení viskozity. Byli přizváni jako laici k tomuto preferenčnímu testu. V tab IV jsou rovněž uvedeny viskozity nápojů stanovené výtokovým pohárkem. Z výsledků je možné vyvodit, že optima je dosaženo u vzorku č.2 a vzorek č.3 se statisticky neliší od vzorku č.2. Jde o vzorky s viskozitou 5,1 a 9 mPa.s (senzorická viskozita je mezi 2,5 až 2,9 stupně stupnice nebo cca 15 až 20 dílky grafické úsečky).

V tomto rozmezí je tedy nutné při výrobě udržovat viskozitu nápoje přídavkem vhodného zahušťovadla, aby byla zajištěna optimální viskozita nápoje z hlediska konzumentů. Viskozita totiž hraje roli při hodnocení, zda je nápoj bohatý na sušinu či nikoli a i s menší dávkou koncentrátu lze udržet dojem plné chuti.

ZÁVĚRY

Byla prokázána úzká korelace mezi senzorickou viskozitou a logaritmem přístrojové viskozity. Obě metody hodnocení senzorické viskozity (stékání ze lžičky i metoda sání podle ISO) i oba způsoby stanovení (stupnicí nebo graficky) se ukázaly jako rovnocenné. Senzorická viskozita koreluje stejně dobře s kinematickou i dynamickou viskozitou.

Na příkladu ovocného nápoje byl ukázán způsob využití výsledků korelace ke stanovení optimální přístrojové i senzorické viskozity a nepřímo i ke stanovení optimální dávky zahušťovadla.

Metody a přístroje zde aplikované lze použít k hodnocení viskozity (Newtonských) tekutých potravinářských výrobků jak v laboratorních, tak provozních podmínkách.

Seznam symbolů

μ	dynamická viskozita (Pa.s, mPa.s)
ν	kinematická viskozita ($m^2.s^{-1}$)
T	teplota (°C)
ρ	hustota ($kg.m^{-3}$)

Literatura

ECK, E. - ŽÁRSKÝ, R.: Popis programu Senzor. Praha 1991.
HOUŠKA, M.: Cejchování výtokového viskozimetru. Potr. Vědy, *4*, 1986 : 143-146.

HOUŠKA, M. - CELBA, J. - HAVLÍČEK, Z. - JESCHKE, J.: Fyzikální vlastnosti potravin. [Zpráva úkolu.] Praha, VÚPP 1988.
HOUŠKA, M. - JESCHKE, J. - ŠABATA, D. - POKORNÝ, J.: Vztah mechanické pevnosti a textury sýra Niva. Potr. Vědy, *9*, 1991 : 187-195.
POKORNÝ, J. - STREJČEK, F. - KMÍNEK, M. et al.: Effect of the water content on textural characteristics and mechanical properties of flat crisp bread. Sbor. VŠCHT Praha, 1991 : 51-78.
Návod a popis měření s viskozimetrem RN211. Prüfgerätewerk, Medingen DDR.
ISO 8589: Sensory analysis - Methodology - General guidance for the design of test room. Geneve, 1988.
ISO norma návrh č. 11036: Sensory analysis - Methodology - Texture profile analysis. Geneva, 1991.

Došlo dne 21. 12. 1992

M. Houška, J. Rysová, A. Kubešová, P. Šrámek (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

The correlation between sensoric and instrumental viscosity of fluid food

The correlation between sensoric and instrumental viscosity was found. The sensoric viscosity was determined by the method described in ISO standard (slurping the fluid from the spoon over the tongue and sensing the necessary drag) and by observing the time of pouring the fluid from the spoon (until first drop breaks the continuous flow). Newtonian food products were used and their viscosity was measured by the simple plant laboratory viscometers, rotational viscometer RN 211 (Germany) and of domestic production carefully calibrated cup viscometer. Results of the experiments are given in Table I. Two types of correlation were tested, resulting correlation coefficients are given in Table II. The best correlation were received between sensoric viscosity and logarithm of the instrumental viscosity. Resulting equations are given in Table III and Figs 1 - 4.

Generally valid correlation found was used for the model demonstration example. The model fruit drink was prepared with the same taste but different viscosity (using the different concentration of thickener). The preferation test was conducted for samples of the drink to determine the customer optimum viscosity of the drink. The results of this test are given in Table IV. The samples nos. 2 and 3 exhibit the optimum viscosity. The correlation enables to transform the sensoric viscosity into the instrumental viscosity. The optimum instrumental viscosity is between 5 and 9 mPa.s. The optimum concentration of the thickener is therefore between the concentration used for the preparation of the samples nos. 2 and 3.

These results enable to simplify the process control of the drink viscosity. If the viscosity of the product is in the range determined as an optimum one can be sure that the sensoric assessment of the product viscosity is also in the optimum range.

viscosity; sensoric evaluation; texture; fluid food

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 311-322

CITLIVOST KVASINKOVÝCH KMENŮ SBÍRKY RIFIS * K NYSTATINU

Vladimír ERBAN, Marija GOTTVALDOVÁ, Jindřich ŠPICNER, Ivan BOHAČENKO

Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař

Bylo otestováno 127 kmenů kvasinek sbírky RIFIS, na citlivost k nystatinu. Z nich bylo šest druhů, které zahrnovaly minimálně osm kmenů, statisticky vyhodnoceno Tukeyho metodou jednorozměrné analýzy rozptylu. Na hladině významnosti 0,1 je možné rozlišit pomocí citlivosti k nystatinu dvě homogení skupiny kvasinkových druhů. Statisticky významně se navzájem odlišují: *Candida lipolytika* od *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* od *Candida tropicalis*, *Candida utilis* od *Saccharomyes cerevisiae* a *Saccharomyces cerevisiae* od *Torulopsis etanolitolerans*.

nystatin; antimykotika; kvasinky; citlivost; Tukey test

Rezidua farmak a z nich zejména antibiotik patří k nejdůležitějším inhibičním látkám v potravinách. S požadavky na co nejnižší kontaminaci potravin antibiotiky používanými buď ve veterinární praxi, nebo jako součást probiotik, je spojen požadavek jak na co nejnižší aplikační dávky, tak i na maximální účinnost při aplikaci. S tím souvisí účinná rutinní kontrola výskytu antibiotik jak v zemědělské prvovýrobě, tak i v potravinářských technologiích.

Mezi antibiotiky tvoří specifickou skupinu antimykotika, z nichž jedním z nejpoužívanějších je nystatin (syn. fungicidin, mykostatin), patřící do řady polyenových antibiotik. Hydrofobnost části molekuly způsobuje jeho afinitu k buněčným membránám, kde interferuje s ergosteroly, čímž je dána jeho antimykotická specificita (G o t t l i e b et al., 1958; W e i s s m a n n, S e g a, 1967). Rizika polyenových antibiotik spočívají v jejich stabilitě. Ve vodných roztocích jsou stálé i za varu. V alkalických oblastech pH jsou stálejší než v kyselých roztocích. Významným rizikem je i vysoká frekvence rezistencí k antimykotikům vzniklá mutacemi v některých genech pro erg, SG1, ole, hem, které jsou respiračně deficientní a zároveň nystatin rezistentní (H e n r y, 1982).

* Původní sbírka Výzkumného ústavu krmivářského průmyslu a služeb (Research Institute of Feed Industry and Service) od roku 1983 u Výzkumného ústavu potravinářského Praha (Food Research Institute).

V souvislosti s výběrem vhodného citlivého kmene pro screeningové testy byla otestována na citlivost k nystatinu sbírka kvasinkových kmenů RIFIS Výzkumného ústavu potravinářského Praha (K o c k o v á - K r a t o c h v í l o v á, 1977).

Cílem této práce je statistické zhodnocení působení nystatinu na sbírkové kmeny kvasinek pro účely minimálních aplikačních dávek nutných pro použití v praxi.

Pro statistické vyhodnocení citlivosti jednotlivých kvasinkových druhů k nystatinu byla použita Tukeyho metoda analýzy rozptylu s jednoduchým tříděním, za použití počítačového statistického systému STATGRAPHIC (K o s h i n et al., 1992). Vzhledem ke zvolené metodě byl učiněn předpoklad, že se rozptyly uvnitř jednotlivých druhů výrazně neliší vzhledem k citlivosti k antibiotiku. To znamená, že citlivost k antibiotiku je dána vlastními genetickými (chromozomálními) vlastnostmi druhu. Rezistentní kmeny vzniklé mutacemi, které se odchylují svojí rezistencí od přirozeného rozptylu jednotlivých druhů, je možné tímto statistickým přístupem vytipovat, jak bude uvedeno dále.

MATERIÁL a METODY

Kultury – *Candida azyma* (*Torulopsis azyma*$^+$) (*Can. az.*) kmeny^o: 115, 261, 265; *Candida boidinii* (*Can. bo.*) kmeny: 316, 317; *Candida ethanolica* (*Can. et.*) kmeny: 233 a 234; *Candida famata* (*Torulopsis candida*$^+$) (*Can. fa.*) kmen: 250; *Candida kefyr* (*Candida pseudotropicalis*$^+$) (*Can. ke.*) kmeny: 37, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 314, 315; *Candida lactiscondensi* (*Torulopsis lactis*$^+$) (*Can. la.*) kmen: 127; *Candida lipolytica* (*Can. li.*) (*Saccharomycopsis lipolitika*) kmeny: 186, 286, 288, 289, 290, 291, 293, 294, 295, 296; *Candida mogii* (*Can. mo.*) kmen: 260; *Candida parapsilosis* (*Can. pa.*) kmen: 287; *Candida species* (*Can.* sp.) kmen: 209, *Candida tropicalis* (*Can. tr.*) kmeny: 116, 143, 216, 245, 254, 257, 259, 263; *Candida utilis* (*Can. ut.*) kmeny: 36, 49, 49.5, 50, 136, 207, 208, 218, 219, 220, 231, 232, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 248, 251, 256, 264, 266, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 297, 298, 299, 300, 301; *Clavispora lusitaniae* (*Candida obtusa*$^+$) (*Cla. lu.*) kmen: 246; *Debaryomyces polymorphus* (*Pichia polymorfa*$^+$) (*Dem. po.*) kmen: 227; *Geotrichum candidum** (*Geo. ca.*) kmen: 262; *Hansenula anomala* (*Han. an.*) kmeny: 229, 230; *Kluyveromyces marxianus* var. lactis (*Kluyveromyces lactis*$^+$) (*Klm. la.*) kmeny: 302, 303, 312, 313; *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* (*Fabospora fragilis*$^+$) (*Klm. ma.*) kmen: 228; Kvasinka sp.^{x} (KVS sp.) kmeny: 99, 269, 283, 284; *Pichia membranaefaciens* (*Pic. me.*) kmen: 226; *Rhodotorula glutinis* (*Rho. gl.*) kmen: 325; *Rhodotorula rubra* (*Rho. ru.*) kmen: 38; *Saccharomyces cerevisiae* (*Sac. ce.*) kmeny: 3, 4, 5, 20, 21, 22, 23, 43, 44, 48, 60, 62, 66, 221, 222, 223, 318, 319, (*Saccharomyces carsbergensis*$^+$) kmeny: 196, 199, (*Saccharomyces bayanus*$^+$) kmen: 320; *Saccharomycopsis fibuliger* (*Endomycopsis fibuliger*$^+$) (*Sap. fi.*) kmen: 323; *Torulopsis etanolitolerans* (*Tor. et.*) kmeny: 235, 236, 237, 247, 252, 255, 275, 277, 280, 324; *Torulopsis sphaerica* (*Tor. sh.*) kmeny 310, 311.

Názvy jsou aktualizované podle publikace Kerger-van Rij (1984):

+ druhy jsou vedeny ve sbírce pod tímto původním názvem
- tyto druhy Kerger-van Rij neuvádí
° číslo kmene udává číslo kmene ve sbírce RIFIS
x neurčené kmeny

Media – Sladinový agar: V 1 l vyčeřené sladiny upravené na 8 °Bg a pH 5,5 se rozpustí 23 g agaru. Sterilizace při 121 °C 20 minut. Kaseinový agar: Kaseinový hydrolyzát 10 g, masový extrakt 4,3 g, glukosa 10 g, NaCl 10 g, agar 15 g doplněný na 1 l destilovanou vodou po rozvaření upravený na pH 6,1 ± 0,1. Sterilizace 20 minut při 121 °C (Čs. lékopis, 1987).

Stanovení inhibičních zón difuzní metodou – Byla použita standardní difuzní plotnová metoda stanovením růstu mikroorganismů na povrchu v koncentraci 10^4 až 10^5 na misku v kaseinovém agaru 4 mm vysokém na Petriho miskách o průměru 16 cm s otvory vyříznutými korkovrtem o průměru 6 mm. Důlky obsahovaly standardní množství roztoku 100 µl s koncentracemi 80 až 0,63 µg nyastinu (5590 m. j./ml) na ml ve dvojkovém ředění. Misky se kultivovaly 16 až 24 hodin.

Odečet – Odečet byl prováděn pomocí posuvného měřítka s přesností na 0,1 mm. V případě, že zóny nebyly ostré, byl vyhodnocován střed difuzního mezikruží.

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) – MIC byla stanovena odlogaritmováním hodnoty průsečíku linearizovaného vztahu nezávisle proměnné, logaritmu koncentrace antibiotika, a závisle proměnné, velikosti zóny, s přímkou rovnoběžnou s osou x ve vzdálenosti velikosti důlku (tzn. 6 mm), na základě rovnice velikosti difuzní zony(Milk and Milk Products, 1987):

$$(R - r)\,2 = (2{,}3 + 4D)\,t\,\log(M_0 / MIC)$$

kde: R - poloměr zóny
r - poloměr důlku
D - koeficient difuze
t - čas difuze
M_0 - výchozí koncentrace inhibiční látky

VÝSLEDKY a DISKUSE

Výsledky (minimální inhibiční koncentrace, parametry linearizované rovnice a koeficient korelace) testování kmenů jsou uvedeny v tab. I. Z výsledků je patrné rozpětí citlivosti kmenů k nystatinu v intervalu 0,04 až 5,8 µg nystatinu na 1 ml. Van der Walt (1992) však uvádí rozsahy pro citlivost kvasinek k aktidionu od 0,06 až k vyšším než 1000 mg/ml. Průměrná citlivost k nystatinu u hub se uvádí 1,5 až 6,25 mg/ml (Martindale, 1989).

I. Seznam kmenů a jejich citlivostí – List of strains and threir sensitivity

Kmen[1]	Č.[2]	MIC[3]	y-úsek[4]	Směrnice[5]	Koeficient korelace[6]
Can. az.	115	0,0776	13,07	5,47	0,9836
Can. az.	261	1,5804	4,74	8,84	0 ,9961
Can. az.	265	1,6333	4,70	8,44	0,9944
Can. bo.	316	1,8136	4,19	8,54	0,9798
Can. bo.	317	3,9836	0,32	10,13	0,9986
Can. et.	223	1,8511	3,34	11,46	0,9919
Can. et.	234	1,3466	5,23	9,07	0,9983
Can. fa.	250	5,5467	-1,86	11,100	0,9909
Can. ke.	37	1,4467	6,02	6,090	0,9917
Can. ke.	304	1,2625	5,47	9,230	0,9936
Can. ke.	305	0,6593	8,08	9,260	0,9872
Can. ke.	306	0,6987	7,78	8,890	0,9956
Can. ke.	307	3,6581	1,83	8,110	0,9935
Can. ke.	308	5,8006	-0,70	9,300	0,9850
Can. ke.	309	0,7922	7,45	10,400	0,9924
Can. ke.	314	1,7974	4,11	9,000	0,9987
Can. ke.	315	2,9971	1,98	9,270	0,9956
Can. la.	127	0,0764	13,49	5,820	0,9836
Can. li.	186	0,0874	13,82	6,44	0,9923
Can. li.	286	1,3779	4,72	12,06	0,9950
Can. li.	288	1,3929	4,89	10,50	0,9857
Can. li.	289	0,6561	7,88	8,07	0 ,9819
Can. li.	290	1,1158	5,92	10,00	0,9959
Can. li.	291	1,0219	6,30	10,52	0,9832
Can. li.	293	5,5502	-1,81	11,03	0,9871
Can. li.	294	0,7245	7,71	9,35	0,9967
Can. li.	295	1,1719	5,71	10,00	0,9862
Can. li.	296	2,3597	2,54	10,36	0,9943
Can. mo.	260	1,5360	4,16	12,00	0,9930
Can. pa.	287	1,0647	6,10	10,91	0,9728
Can. sp.	209	0,3347	11,67	11,09	0,9987
Can. tr.	116	0,6531	8,55	8,37	0,9845

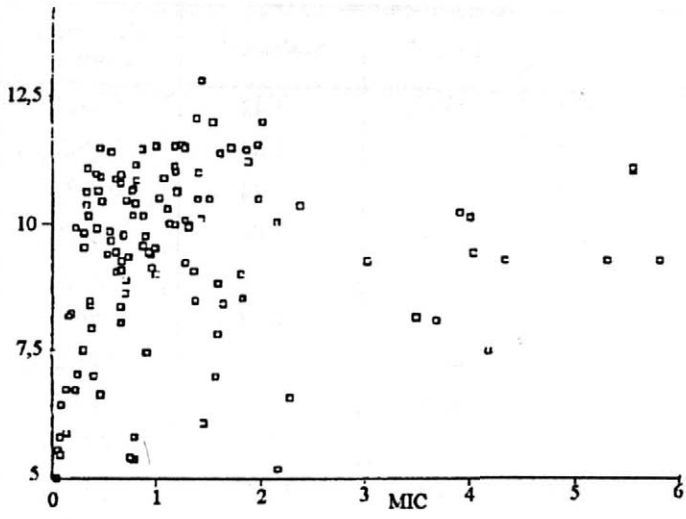
Kmen[1]	Č.[2]	MIC[3]	y-úsek[4]	Směrnice[5]	Koeficient korelace[6]
Can. tr.	143	0,2964	10,98	7,53	0,9875
Can. tr.	216	0,3423	11,13	10,17	0,9911
Can. tr.	245	1,4202	4,86	10,10	0,9988
Can. tr.	254	1,2653	5,37	10,08	0,9979
Can. tr.	257	0,6138	8,32	9,06	0,9653
Can. tr.	259	0,1797	12,54	8,23	0,9810
Can. tr.	263	1,1937	5,58	10,65	0,9891
Can. ut.	36	1,5631	5,64	7,00	0,9968
Can. ut.	49	0,2196	13,03	9,91	0,9886
Can. ut.	49,5	0,6597	8,48	10,96	0,9869
Can. ut.	50	5,2973	-0,23	9,30	0,9992
Can. ut.	136	1,9607	3,12	11,56	0,9554
Can. ut.	207	0,6057	8,46	9,44	0,9842
Can. ut.	208	0,6546	8,39	10,80	0,9937
Can. ut.	218	3,8860	0,37	10,23	0,9946
Can. ut.	219	0,4574	10,30	11,48	0,9953
Can. ut.	220	0,4677	9,85	10,44	0,9921
Can. ut.	231	0,6844	8,01	9,78	0,9917
Can. ut.	232	0,4639	10,04	10,93	0,9935
Can. ut.	239	0,8697	7,02	10,16	0,9893
Can. ut.	240	0,8906	7,85	9,75	0,9956
Can. ut.	241	0,7110	7,95	10,46	0,9916
Can. ut.	242	1,3975	4,80	11,01	0,9898
Can. ut.	243	0,8670	6,99	9,57	0,9676
Can. ut.	244	1,2972	5,28	9,93	0,9886
Can. ut.	248	0,3232	11,49	10,37	0,9888
Can. ut.	251	1,1867	5,61	10,63	0,9743
Can. ut.	256	0,4135	10,61	10,99	0,9902
Can. ut.	264	1,0660	6,10	10,90	0,9951
Can. ut.	266	0,7752	7,58	10,69	0,9968
Can. ut.	267	1,7086	3,73	11,49	0,9933
Can. ut.	268	0,7620	7,66	10,67	0,9885
Can. ut.	270	0,8615	7,14	11,47	0,9843

Kmen[1]	Č.[2]	MIC[3]	y-úsek[4]	Směrnice[5]	Koeficient korelace[6]
Can. ut.	271	1,4261	4,42	12,81	0,9879
Can. ut.	272	0,9914	6,44	11,52	0,9886
Can ut.	273	1,2702	5,20	11,51	0,9881
Can. ut.	297	1,0980	5,98	10,30	0,9957
Can. ut.	298	0,9879	6,45	9,00	0,9913
Can. ut.	299	4,3099	0,50	9,30	0,9899
Can. ut.	300	0,6953	7,76	8,64	0,9963
Can. ut.	301	0,9473	6,61	9,14	0,9708
Cla. lu.	246	1,3031	5,25	9,97	0,9964
Dem. po.	227	0,9771	6,50	9,53	0,9962
Geo. ca.	262	0,9191	6,75	9,43	0,9695
HCan. Can.	229	0,5230	9,05	9,40	0,9953
HCan. Can.	230	0,8013	7,44	10,86	0,9938
Klm. la.	302	1,9640	3,32	10,50	0,9965
Klm. la.	303	0,3729	9,81	7,96	0,9903
Klm. la.	312	1,3631	5,26	8,50	0,9706
Klm. la.	313	4,0140	0,71	9,43	0,9932
Klm. ma.	228	0,9381	6,66	9,40	0,9899
KVS sp.	99	0,2406	11,36	7,05	0,9845
KVS sp.	269	0,6028	8,79	10,89	0,9944
KVS sp.	283	1,1790	5,61	11,03	0,9939
KVS. sp.	284	1,2651	5,23	11,49	0,9900
Pic. me.	226	0,3240	11,61	10,64	0,9953
Rho. gl.	325	1,2286	5,37	11,56	0,9975
Rho. ru.	38	2,2699	4,65	6,59	0,9725
Sac. ce.	3	0,1537	13,15	8,18	0,9804
Sac. ce.	4	0,3589	10,24	8,40	0,9801
Sac. ce.	5	0,3562	10,30	8,48	0,9948
Sac. ce.	20	0,3012	11,62	9,82	0,9745
Sac. ce.	21	0,1356	12,11	5,89	0,9884
Sac. ce.	22	0,1327	12,92	6,75	0,9885
Sac. ce.	23	0,3953	9,83	7,02	0,9638
Sac. ce.	43	0,7787	7,59	5,39	0,9971

Kmen[1]	Č.[2]	MIC[3]	y-úsek[4]	Směrnice[5]	Koeficient korelace[6]
Sac. ce.	44	0,7498	7,68	5,42	0,9921
Sac. ce.	48	0,7815	7,62	5,82	0,9929
Sac. ce.	60	0,2205	11,42	6,74	0,9937
Sac. ce.	62	0,0459	13,70	5,00	0,9930
Sac. ce.	66	0,0443	13,66	4,92	0,9917
Sac. ce.	196	0,4598	9,24	6,64	0,9864
Sac. ce.	199	0,0523	14,12	5,55	0,9827
Sac. ce.	221	0,5667	9,22	11,41	0,9928
Sac. ce.	222	0,2987	11,41	9,55	0,9953
Sac. ce.	223	0,4396	10,20	10,65	0,9992
Sac. ce.	318	1,5811	4,84	7,84	0,9963
Sac. ce.	319	0,4208	10,12	9,89	0,9982
Sac. ce.	320	0,5433	9,01	9,86	0,9970
Sap. fi.	323	0,7711	7,55	10,18	0,9927
Tor. et.	235	0,6603	8,04	9,09	0,9988
Tor. et.	236	1,5029	4,54	10,50	0,9616
Tor. et.	237	1,8684	3,35	11,23	0,9733
Tor. et.	247	0,5573	8,86	9,67	0,9786
Tor. et.	252	2,1495	4,78	5,18	0,9912
Tor. et.	255	4,1596	1,85	7,51	0,9951
Tor. et.	275	1,1699	5,64	11,13	0,9834
Tor. et.	277	2,0047	2,78	11,99	0,9873
Tor. et.	280	1,1710	5,61	11,52	0,9882
Tor. et.	324	0,9038	6,73	7,48	0,9997
Tor. sh.	310	3,4665	1,99	8,17	0,9968
Tor. sh.	311	2,1387	3,09	10,03	0,9957

[1]strain; [2]No.; [3]minimal inhibited concentration; [4]y-section; [5]slope; [6]correlation coeficient

Přímé stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) difuzní metodou v agaru je u roztoků s koncentrací antibiotika kolem MIC obtížné, neboť antibiotikum difundující do agaru je nařeďováno, takže jeho koncentrace během lag fáze klesne pod hodnotu MIC a zóny se neobjeví. Signifikantnost stanovení MIC difuzní metodou bilancované z velikosti zón řady různých koncentrací je dána



1. Korelace mezi MIC a směrnicí přímky citlivosti – Correlation beetwen minial inhibited concentation

vyhodnocením více naměřených veličin a je přesnější než stanovení pouze logatitmického intervalu při použití stanovení MIC zřeďovací metodou.

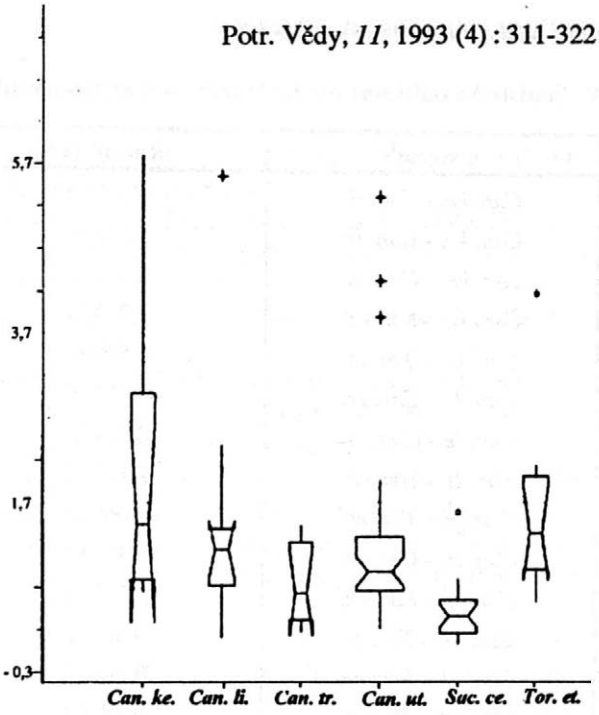
Mimo vypočtené hodnoty MIC jsou uváděny také parametry linearizované přímky citlivosti. Směrnice přímky citlivosti je mírou charakterizace intervalu koncentrace antibiotik způsobující částečnou a úplnou inhibici. Vzhledem k tomu, že není korelace mezi hodnotou MIC a směrnicí semilogaritmického vynesení, jak je patrné z obr. 1, je směrnice další charakteristikou odezvy organismu k působení antibiotika.

Šest kvasinkových druhů (*Candida lipolytica, Candida pseudotropicalis, Candida tropicalis, Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae, Torulopsis etanolitolerans*), které obsahovaly alespoň osm kmenů, bylo statisticky zpracováno vzhledem ke vzájemné odlišnosti. Celkový přehled je na krabicovém grafu se zářezy a fousy (K o s h i n et al., 1992) (obr. 2). Výška mezi horní a dolní hranou krabičky představuje kvartilové rozpětí a její příčka označuje medián.

II. Analýza rozptylu jednoduchého třídění (Hladina významnosti: 90 %, Typ testu: Tukey) – One-way analysis of variance (Confidence level 90 %, Range test: Turkey)

Zdroj měnlivosti[1]	Součet čtverců[5]	d.. f.	Průměrný čtverec[6]	*F*-poměr[7]	Hladina významnosti[8]
Mezi kmeny[2]	24,94947	5	4,9898948	4,280	0,0016
Reziduální[3]	100,25593	86	1,1657666		
Celkový[4]	125,20540	91			

[1]source of variation; [2]between groupe; [3]within groupe [4]total (corrected); [5]mean square; [6]sum of squeres; [7]*F*-ratio; [8]significant level



2. Charakteristika kvasinkových kmenů krabicovým diagramem se zářezy a fousy – Notched box and whisker plots for factor level data

Paprsky (fousy) spojují minimální a maximální hodnotu, jestliže se neliší o více než 1,5násobek kvartilového rozpětí. Extrémní hodnoty jsou označeny individuálně. Kmeny s těmito extrémními hodnotami mohou nést mutaci v oblastech genů erg, SG1, ole, hem. Výška zářezu do krabičky znamená rozpětí 95% spolehlivosti mediánu, jak je patrné u *Can. kefyr, Can. lipolytika, Can. tropikalis* a *Tor. etanolitolerans*. Z obr. 2 je také zřejmé, že kvartilové rozpětí může být menší než spolehlivost stanovení mediánu. Šířka krabičky indikuje odmocninu četnosti jednotlivých kmenů v souboru. Dále je z obr. 2 je patrné, že citlivosti jednotlivých kmenů k nystatinu mají natolik odlišný charakter (zejména kvartilové rozpětí), že spíš než o náhodný rozptyl se jedná o různé způsoby

III. Analýza homogenity skupin (Metoda: 90 % Tukey HSD) - The analuse of homogeneity group (Method: 90 % Tukey of HSD

Kmen[1]	Počet[2]	Průměr[3]	Homogení skupiny[4]	
Sac. ce.	21	0,4198381	X	
Can. tr.	8	0,7455625	X	X
Can. ut.	34	1,2287029		X
Can. li.	10	1,5458300		X
Tor. et.	10	1,6147400		X
Can. ke.	9	2,1236222		X

[1]strain; [2]number; [3]average; [4]homogeneity groups

V. Statistická odlišnost dvojic kmenů – Statistically difference of strain pair

Dvojice[1]	Rozdíl[2] (+/-)	Limity[3]
Can. ke. - Can. li.	0,57779	1,30708
Can. ke. - Can. tr.	1,37806	1,38231
Can. ke. - Can. ut.	0,89492	1,06640
Can. ke. - Sac. ce.	1,70378	1,13338*
Can. ke. - Tor. et.	0,50888	1,30708
Can. li. - Can. tr.	0,80027	1,34939
Can. li. - Can. ut.	0,31713	1,02337
Can. li. - Sac. ce.	1,12599	1,09299*
Can. li. - Tor. et.	-0,06891	1,27222
Can. tr. - Can. ut.	-0,48314	1,11786
Can. tr. - Sac. ce.	0,32572	1,18193
Can. tr. - Tor. et.	-0,86918	1,34939
Can. ut. - Sac. ce.	0,80886	0,78955*
Can. ut. - Tor. et.	-0,38604	1,02337
Sac. ce. - Tor. et.	-1,19490	1,09299*

* statisticky významné rozdíly – statistically significant difference
[1]couple; [2]difference; [3]limits

(zásahová místa) biologického působení nystatinu na jednotlivé druhy, zřejmě nejde jen o interferenci se steroly, jak naznačuje srovnání kmenů *Can. kefyr* a *Tor. etanolitolerans* vzhledem ke *Can. utilis* a *Sac. cerevisiae*. Z obr. 2 vyplývá, že pouze šest kmenů (50, 218, 293, 299, 318, 255) se statisticky liší od mediánu svého druhu. Tento přístup může pomoci při vytipování kmenů, které by mohly nést faktory rezistence. Tab. II uvádí statistické hodnocení analýzy rozptylu, ze které je patrné, že jednotlivé druhy se od sebe statisticky liší na hladině významnosti 0,1. Na tomto základě byla provedena analýza homogenity skupin (tab. III). Soubor je možné rozdělit do dvou uvnitř homogenních skupin.

Na stejné hladině významnosti se podle citlivosti (tab. IV) k nystatinu statisticky významně odlišují tyto dvojice druhů: *Candida lipolytika* od *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr* od *Candida tropicalis*, *Candida utilis* od *Saccharomyes cerevisiae* a *Saccharomyces cerevisiae* od *Torulopsis etanolitolerans*.

V případě vyloučení extrémních hodnot je možné některé dvojice kmenů odlišit i na úrovni 0,95 a některé i na úrovni 0,99 (výsledky nejsou uvedeny).

Navíc tyto testy v kombinaci s podobnými testy dalších antibiotik mohou dát podklady pro optimální kombinaci takových antimykotik, aby použité koncentrace mohly být při aplikaci co nejnižší, a tím by mohly být dosaženy efekty jak ekonomické, tak ekologické.

Literatura

GOTTLIEB, D. - CARTER, H. E. - SLONEKER, J. H. - AMMANN, A.: Protection of fungi against polyene antibiotics by sterole. Science, 128, 1958 : 361-365.
HENRY, S. A.: V: Metabolism and gene expession of saccharomycetes. In: STRATELN, J. N. - JONES, E. W. - BROACH, J. R. (Eds.): Membrane Lipids of Yeast: Biochemical and Genetic Studie. Cold Spring Harbor 1982
KERGER-Van RIJ, N. J. W. (Ed.): The Yeast a Taxonomic Study. Amsterodam, Elsevier Sci. Publ B. V. 1984.
KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Catalogue of Yeast Cultures. Bratislava, Veda 1977 : 29.
KOSHIN, F. - KÁRNÍK, I. - MAREK, L. - PRŮŠA, M. - ŘEZANKOVÁ, H. - SVOBODA - L. - VRABEC, M.: Stratgraphics aneb statistika pro každého. Praha, GRADA a. s. 1992.
MARTINDALE, X: The Extra Pharmacopoeia. 29. Ed., London, The Pharmaceutical Press 1989.
Van der WALT, J. P.: Criteria and Methods Used in Klasification. In: LOODER, J. (Ed.): V. The Yeast. A Taxonomic Study. Amsterodam, North-Holland Publ. Com 1974 : 34-107.
WEISSMANN, G. - SEGA, G.: The action of polyene antibiotics on phospholipid-choresterol structures. J. Biol. Chem., 242, 1967 : 616-620.
Československý lékopis. Sv. 1. Praha, Avicenum 1987 : 131.
Milk and Milk Products - Detection of Inhibitors. Bull Int. Dairy Fed. No. 220, 1987 : 58.

Došlo dne 29. 3. 1993

V. Erban, M. Gottwaldová, J. Špicner, I. Bohačenko
(Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Sensitivity of yeast strains of the RIFIS collection to nystatin

Residues of drugs are ones of the most important inhibitory substances in foods. The requirement for the lowest application dose as possible and maximum efficiency is connected with requirement for the lowest possible contamination of foods by antibiotics used either in veterinary practice or as growth stimulators, eventually as protective substances against microorganism contamination. The successful control consists also in screening of antimycotics.

In connection with the selection of suitable strain for screening, the set of yeast 120 strains RIFISS (Food Research Institute Praha) was tested for sensitivity to nystatin.

For statistical appraisal of sensitivity of individual yeast species to nystatin the Tukey method of dispersion analysis with simple classification was applieds uing the computer statistical STATGRAPHIC system.

The sensitivity was established by standard diffusive plate method from nystatin sample in volume 100 µl and concentration 80 to 0.63 µg of nystatin (5,590 i.u./mg) per ml in double dilution with cultivation of dishes 16 to 24 hours.

MIC was determined by semilogarithmic laying out of logarithm of antibiotic concentration and size of zone. MIC value, parameters of the equation of sensitivity and correlation coefficient are presented in Table I, the relationship of strain sensitivity and MIC is in Fig. 1. Regarding that there is no correlation between MIC value and

gradient of semilogarithmic laying out, the gradient means another characteristics of the response of an organism to antibiotic action.

Six yeast species (*Candida lipolytics*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis etanolitolerans*) which contained eight strains at least were statistically processed regarding the mutual differences. The total outline is in box diagram with notched box-and-whisker plots (Fig. 2). The height between upper and lower edge of the box means quartile span and its diagonal designates median. Rays (whiskers) connect minimum and maximum values, provided that they are not differing by more than 1.5 fold of quartile span. Extreme values are designated individually. The height of notch into box means the span of 95 % reliability of median.

This approach can be used to mark the strains which will bear the factors of resistance.

Table II presents statistical evaluation of dispersion analysis from which is evident that individual species are statistically different on the level of significance - 0.90. An analysis of homogeneity of groups (Table III) to determine which species are differing from each other was carried out on this basis.

These tests in combination with the similar tests of another antibiotics may give bases for optimum combination of such antimycoctics in order to use the concentrations as flowest as possible in application, with minimum ecological risks and maximum economical effects.

nystatin; antimycoctics; yeast; sensitivity; Tukey test

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 323-333

MIKROVLNNÝ OHŘEV: POROVNÁNÍ ROVNOMĚRNOSTI MIKROVLNNÉHO POLE VE TŘECH TYPECH MIKROVLNÝCH ZAŘÍZENÍ PRO DOMÁCNOSTI

Jiřina HOUŠOVÁ, Šárka KRISTOVÁ, Petr TOPINKA

Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař

Nerovnoměrnost ohřevu je známým problémem praktické aplikace mikrovlnného ohřevu materiálů. Zejména v případě potravin přináší potenciální riziko poklesu kvality a hygienické bezpečnosti potraviny po ohřevu. Jsou stručně uvedeny specifické projevy nerovnoměrného ohřevu mikrovlnami a jejich příčiny, zmíněna problematika zjišťování rovnoměrnosti ohřevu. Jsou uvedeny výsledky první části experimentální studie, jejíž účelem bylo ověřit a porovnat rovnoměrnost rozložení mikrovlnného pole ve třech běžných typech mikrovlnných zařízení pro domácnosti. Studie vycházela z metodiky mezinárodní normy IEC 705 (1988). Z výsledků vyplynula rozdílnost rozložení mikrovlnného pole v jednotlivých zařízeních, pozitivní vliv otáčení materiálu během ohřevu a významný vliv zátěže (množství ohřívané látky, tvar a velikost nádoby a její umístění v dutině zařízení) na mikrovlnné pole a jeho rozložení.

mikrovlnný ohřev; rovnoměrnost ohřevu; testování MV zařízení

Co nejrovnoměrnější rozložení lokálních teplot v potravině při tepelné úpravě je požadavek související se snahou o co nejmenší poškození nutriční i senzorické hodnoty potraviny během tepelného zpracování při zabezpečení její hygienické bezpečnosti.

Příliš vysoké lokální teploty v průběhu tepelné úpravy představují reálnou možnost poklesu nutriční hodnoty potraviny např. degradací termolabilních výživových látek, snížení senzorické kvality i určité zdravotní riziko v důsledku možné tvorby zdravotně nežádoucích látek. Naopak nízké teploty představují potenciální hygienické riziko v důsledku nedostatečné inaktivace nežádoucích mikroorganismů v potravině, ale i snížení senzorické hodnoty nevyvinutím adekvátních senzorických znaků.

Problém nerovnoměrného ohřevu je problémem praktické aplikace všech metod ohřevu a všech reálných zařízení pro tepelnou úpravu potraviny. Pro případ mikrovlnného (MV) ohřevu je však natolik významný, že jeho kontrola je označována za klíč úspěchu aplikace mikrovln pro zpracování potravin

(O h l s s o n, 1990). Jako taková je proto předmětem výzkumu jak v oblasti vývoje mikrovlnných zařízení, tak v oblasti vývoje výrobků pro mikrovlnný ohřev.

Zvýšená pozornost, která se problematice rovnoměrnosti ohřevu potravinářských výrobků mikrovlnami věnuje, má několik důvodů. Hlavním důvodem je nejběžnější použití MV zařízení v současné době, a to pro ohřev hotových, určitou dobu skladovaných jídel. Nedostatečný ohřev některé části takového pokrmu může představovat, zejména v případě chlazených pokrmů, vážné hygienické riziko (O h l s s o n, 1990; D e a l l e r et al., 1992; I n s u l l i, D e n t o n, 1992). Dalším důvodem je vysoká rychlost ohřevu a především zcela specifická závislost rozložení lokálních teplot v ohřívaném materiálu na použitém zařízení a jeho výkonu, na samotné ohřívané potravině a použitém obalu či nádobě, v porovnání s klasickými způsoby ohřevu, což výrazně zvyšuje možnost nerovnoměrného ohřevu potraviny a následných kvalitativních problémů.

Nerovnoměrný ohřev negativně ovlivňuje i ekonomii provozu MV zařízení. Při velkém rozdílu teplot v opracovávané potravině se prodlužuje doba její tepelné úpravy pro zabezpečení potřebné hygienické kvality, a tím i spotřeba energie.

Existují určité specifické projevy nerovnoměrného ohřevu materiálu mikrovlnami. Mezi ně patří (O h l s s o n, 1983):

- Výskyt horkých a studených míst („hot and cold spots") v ohřívaných materiálech homogenního složení. Tato nerovnoměrnost souvisí ve velké míře s konstrukcí použitého zařízení.
- Přehřívání materiálů v blízkosti rohů a hran plochých hranatých obalů a nádob oproti místům ve středu obalu a tendence k přehřívání materiálu ve středu výrobků zakřivených tvarů. Oba jevy souvisí s tvarem (geometrií) materiálu, resp. použitého obalu či nádoby, v níž probíhá MV ohřev a se zákonitostmi MV ohřevu.
- Vysoká míra nerovnoměrnosti při MV ohřevu několikasložkových jídel, jako extrémních příkladů nehomogenních substrátů souvisí s rozdílnými dielektrickými a tepelnými vlastnostmi i hmotností a výškou vrstvy jednotlivých složek
- Nerovnoměrnost MV ohřevu zmrazených potravin souvisí s dramaticky rozdílnými dielektrickými vlastnostmi vody v kapalné a tuhé fázi (led), a tedy i zcela odlišnou penetrační hloubkou (absorpcí mikrovln).

Snaha po zrovnoměrnění ohřevu materiálů mikrovlnami je oprávněná. Je patrná ve vývoji mikrovlnných zařízení, kdy se výrobci snaží různými technickými prostředky zrovnoměrnit mikrovlnné pole v dutině zařízení, i v současném výzkumu a vývoji vhodných potravinářských výrobků pro MV ohřev a jejich obalů. Je však třeba předeslat, že nejde o úlohu jednoduchou; např. proto, že samotný ohřívaný materiál výrazně ovlivní rozložení intenzity MV pole v dutině zařízení.

V následujícím textu uvádíme výsledky testování rovnoměrnosti MV pole ve třech výkonově a konstrukčně odlišných typech MV zařízení pro domácnost. Dvě z testovaných zařízení byla nakoupena v běžné obchodní síti, třetí - Philips - bylo pro zkoušky zapůjčeno s.p. Elektro Praga Hlinsko. Rozložení intenzity energie

v poli mikrovln v dutině zařízení má prvotní vliv na rozložení teplot v ohřívaném materiálu. Studie byla součástí řešení výzkumného projektu „Optimalizace tepelných zpracovatelských procesů z pohledu kvality a prospěšnosti výživy lidskému zdraví" – program „Zdravá výživa" (Ministerstvo hospodářství ČR).

I. Použitá zařízení a jejich parametry – MV ovens used for experimental study and their specification

Parametr[1]	PHILIPS AVM 610	MOULINEX FM 2915Q MICRO-CHEEF	SAMSUNG RE - 576D Electronics
Užitečný objem dutiny[2] [l]	19,5	24	17
Max. štítkový výkon[3] [W]	650	850	650
Regulační rozsah[4]	10 volitelných rozsahů[5]	5 základních stupňů, 4 mezistupně, stupeň Quick[6]	5 volitelných stupňů[7]
Pracovní deska[8]	pevná police (keramická)[9]	pevná police[10]	otočný talíř (skleněný)[11]

[1]indicator; [2]useful volume of cavity; [3]maximum power output rating; [4]regulating range; [5]10 optional scales; [6]five basic stages, four ntermediate stages, Quick stage; [7]five optimal stages; [8]working table; [9] shelf (ceramic); [10]shelf; [11](glass) turntable

MATERIÁL a METODY

Technické parametry použitých typů mikrovlnných zařízení jsou uvedeny v tab. I.

Měřicí technika – Pro měření teplot byl používán digitální teploměr TESTOTERM 4510 s termistorovým čidlem a digitální teploměr THERM 3201 s termočlánkovým čidlem Fe-Ko. Vážení bylo prováděno na laboratorní váze OWA Labor s váživostí do 5 kg. Čas byl měřen digitálními stopkami DS 35.

Metodika zkoušek, použité materiály

Rekalibrace výkonových stupňů – Burfoot et al. (1991), Bows (1989) a Selman (1991) poukázali na odlišnost skutečného MV výkonu při provozu zařízení od štítkových hodnot, udávaných výrobci i na závislost skutečného výkonu na konkrétní zátěži. Proto byla pro každé zařízení úvodem provedena rekalibrace výstupního výkonu podle mezinárodní normy IEC 705 (1988). U zařízení MOULINEX a SAMSUNG byla kalibrace provedena pro všechny výkonnové stupně, u zařízení PHILIPS pro pět z deseti nastavitelných stupňů.

Podle uvedené normy byla kalibrace prováděna při ohřevu 1000 g pitné vody.

Mapování rovnoměrnosti MV pole – Byly aplikovány dvě metody, obě při použití vody jako ohřívaného materiálu.

První metoda spočívala v ohřevu pěti vzorků (100 ± 1 g) pitné vody o určité teplotě ve skleněných kádinkách (Simax, objem 150 ml, průměr 60 mm, výška 80 mm). Kádinky byly vytemperovány na teplotu vody, která se poté použila pro ohřev a byly rozmístěny na polici (otočném talíři) v určitém schématu (obr. 2 a 3). Ohřev probíhal při nastavení plného výkonu po dobu, odpovídající 50 kJ dodané energie. Pro výpočet doby byla použita průměrná hodnota výkonu, zjištěná kalibrací. Po ukončení ohřevu byla v určitém pořadí změřena teplota jednotlivých vzorků vody. Postup se opakoval při měření teploty vzorků vody v opačném pořadí. Vyhodnocen byl vzrůst teploty v jednotlivých vzorcích, dále střední hodnota vzrůstu teploty individuálních vzorků obou opakování, maximální a minimální hodnota středního vzrůstu teploty, poloha těchto míst a rozpětí těchto hodnot v absolutní i relativní podobě (vztaženo k průměrné hodnotě vzrůstu teploty v pěti kádinkách). Poslední hodnota je v normě označována jako číslo rovnoměrnosti. Celý test byl proveden dvakrát. Výsledné hodnoty byl zpracovány tabelárně a graficky.

Při **druhé metodě** byly pro ohřev vody použity speciální nádoby (tanky). Šlo o čtvercové nádoby, zhotovené ze sklotextitu, rozdělené přepážkami na 5 x 5 stejných čtvercových polí (obr. 1). Měření bylo prováděno s tanky dvou rozměrů - větší měl stranu 228 mm, menší 168 mm. Oba tanky měly výšku 30 mm a tloušťka obvodových stěn i přepážek 3 mm.

10	11	12	13	14
25	1	12	3	15
24	6	5	4	16
23	7	8	9	17
22	21	20	19	18

1. Testovací tank a označení 25 vnitřních polí – Square tank used for testing and its 25 inner compartments

U zařízení MOULINEX a PHILIPS byly provedeny testy s oběma tanky, u zařízení SAMSUNG byl, vzhledem k rozměrům talíře, použit pouze tank menší.

Tanky byly naplněny určitým množstvím pitné vody - velký (1000 ± 10 g), malý (50 ± 5 g) a byly umístěny se do středu MV trouby tak, aby jejich strany byly rovnoběžné se stěnami zařízení. Ohřev se prováděl při plném výkonu po dobu, odpovídající 100 kWs (velký tank), resp. 50 kWs (malý tank) dodané energie. (Opět byly použity hodnoty z kalibrace výkonu.) Po ukončení ohřevu se změřila teplota v jednotlivých polích v pořadí 1 až 25 a při opakované zkoušce v pořadí 25 až 1. Vyhodnocen byl vzrůst lokálních teplot v jednotlivých polích 1 až 25, průměrná hodnota lokálního vzrůstu teploty z obou opakování, stanovena maximální a minimální hodnota vzrůstu teploty a její místo, průměrný vzrůst teploty v celém tanku a rozpětí vzrůstu lokálních teplot v obou tancích v absolutní i relativní hodnotě. Tato poslední hodnota sloužila jako měřítko rovnoměrnosti ohřevu. Celý test byl proveden dvakrát, výsledné hodnoty byly zpracovány tabulárně i graficky.

VÝSLEDKY a DISKUSE

Výstupní MV výkon – Průměrné hodnoty MV výkonu, zpracované z výsledků série zkoušek podle normy IEC 705 jsou včetně hodnot směrodatné odchylky shrnuty do tab II. Jsou uvedeny i štítkové hodnoty udávané výrobcem.

II. Kalibrace výstupního MV výkonu (podle normy IEC 705 - zátěž 1000 g ve skleněné nádobě) – Results microwave power output measurements (as stated by IEC 705, 1988)

PHILIPS štítkový výkon[1] 650 W		MOULINEX štítkový výkon 850 W		SAMSUNG štítkový výkon 650 W	
Výkonový stupeň[2]	výkon[3] [W]	výkonový stupeň	výkon [W]	výkonový stupeň	výkon [W]
10 (max)	626,3 ± 12,5	1 (max)	930,1 ± 21,3	1 (max)	723,3 ± 10,5
8	544,6 ± 9,9	2	767,9 ± 15,7	2	567,5 ± 8,3
6	422,8 ± 9,1	3	617,8 ± 7,4	3	410,9 ± 7,0
4	304,8 ± 11,0	4	283,2 ± 2,5	4	214,6 ± 5,0
2	140,7 ± 7,6	5	156,2 ± 2,7	5	102,7 ± 1,9

[1]power output rating; [2]power output stage; [3]power output

Měření potvrdilo poznatky anglických autorů (B u r f o o t et al., 1991) a především nutnost provádět rekalibraci výkonu podle uvedeného standardního postupu IEC pro srovnatelnost všech dalších informací.

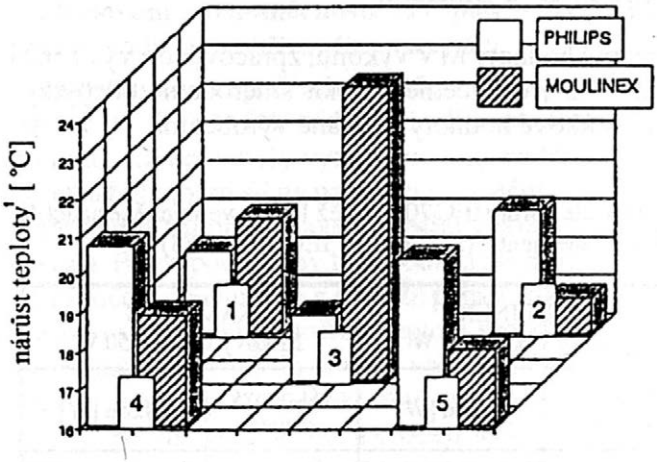
Všechny dále v články uvedené hodnoty je třeba vztáhnout k výkonovým parametrům uvedeným v tab. II.

Rovnoměrnost MV pole v testovaných zařízeních

Pětikádinkový test – Test poskytuje informaci o intezitě MV pole v místě individuálních vzorků vody. Naměřené hodnoty pro všechna tři zařízení ilustrativně znázorňují obr. 2 a 3. z nichž jsou zřejmé rozdíly ve vzrůstu teploty jednotlivých vzorků vody podle jejich umístění, které lze pravděpodobně přisoudit rozdílům v intenzitě MV pole v příslušných místech. Tyto rozdíly i poloha míst s maximálním a minimálním vzrůstem teploty vody se měnily podle zařízení.

Nejmenší rozdíly v lokálním vzrůstu teploty vzorků vody byly zjištěny u zařízení PHILIPS, a to 2,9 °C, což představuje 15,1 % střední hodnoty teplotního vzrůstu všech pěti vzorků vody.

O něco vyšší rozdíl v lokální intenzitě ohřevu byl zjištěn u zařízení SAMSUNG - rozdíl ve vzrůstu teploty 3,8 °C, resp. 19,6 % průměrného vzrůstu teploty v pěti vzorcích.



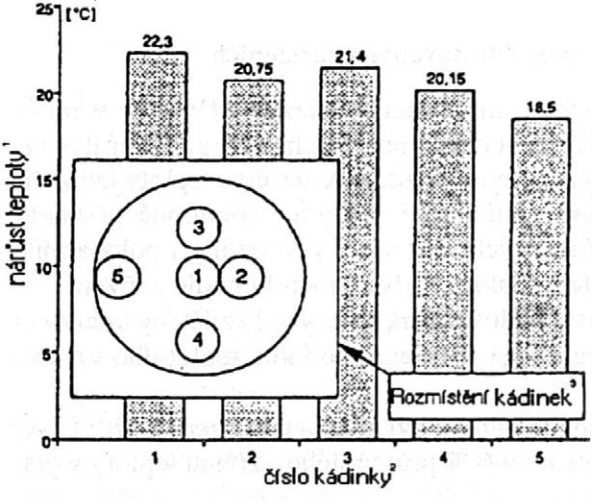
2. Rovnoměrnost ohřevu - výsledky testu s pěti nádobami (MV zařízení Philips a Moulinex) – MV heating uniformity - results of five cups test (MV ovens Philips and Moulinex)

Výrazné rozdíly v místní intenzitě ohřevu byly zaznamenány při testování zařízení MOULINEX. Porovnávaný rozdíl ve vzrůstu teploty jednotlivých vzorků vody činil 7 °C, resp. 34,8 % průměrného vzrůstu teploty všech pěti vzorků vody.

Testovaná zařízení se lišila nejen uvedenou mírou rovnoměrnosti ohřevu pěti vzorků vody, ale i polohou lokálních extrémů (míst s nejrychlejším a naopak nejpomalejším ohřevem).

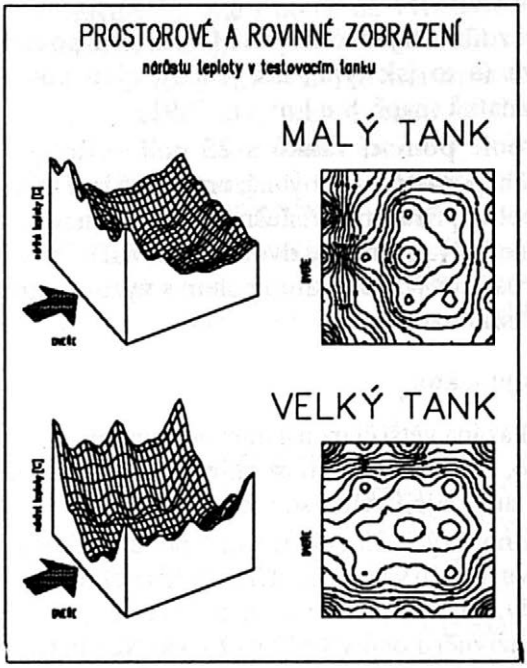
V zařízení SAMSUNG, kde byly vzorky vody uloženy na otáčejícím se talíři v různé vzdálenosti od jeho středu, klesal mírně sledovaný zaznamenaný vzrůst teploty vzorku vody (intenzita ohřevu) směrem od středu talíře k jeho okraji.

V dalších dvou zařízení s pevnou policí (neměnná poloha vzroků během ohřevu) byla poloha míst s maximální a minimální intenzitou ohřevu rozdílná. V zařízení MOULINEX byl např. nejintenzivněji ohříván vzorek vody ve středu seskupení

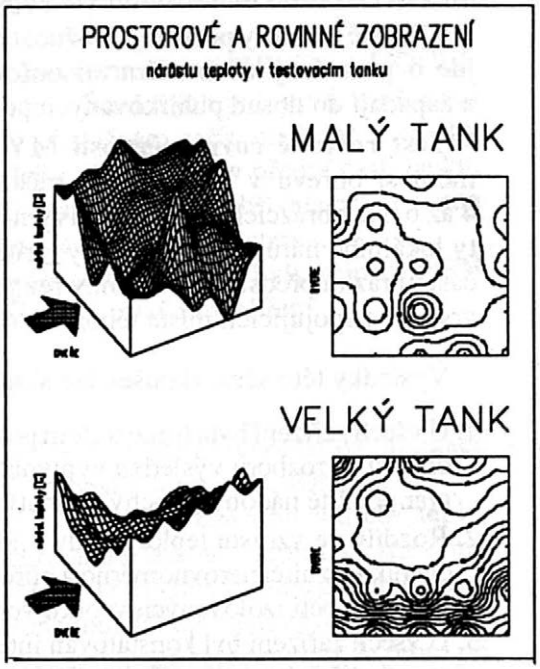


1 - temperature increase
2 - distribution of beakers
3 - beaker No.

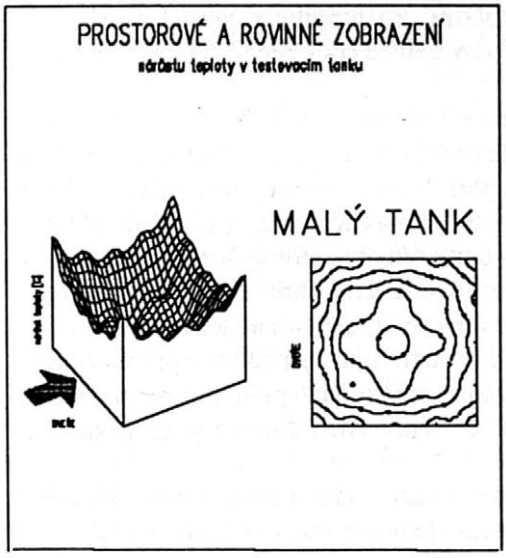
3. Rovnoměrnost ohřevu - výsledky testu s pěti nádobami (MV zařízení Samsung) – MV heating uniformity - results of five cups test (MV ovens Samsung)



4. Výsledky testu se čtvercovými tanky dvou velikostí (MV zařízení Philips) – Results of two-size square tanks (MV oven Philips)



5. Výsledky testu se čtvercovými tanky dvou velikostí (MV zařízení Moulinex) – Results of two-size square tanks (MV oven Moulinex)



6. Výsledky testu se čtvercovým tankem menší velikosti (MV zařízení Samsung) – Results of smaller-size square tank (MV oven Samsung)

kádinek, zatímco u zařízení PHILIPS odpovídala tomuto místu minimální intenzita ohřevu (vzorek s minimálním vzestupem teploty).

Zjištěné hodnoty potvrzují možnost rozdílnosti jednotlivých MV zařízení pokud jde o podmínky rovnoměrnosti ohřevu (a to jak typů, tak jednotlivých kusů) a zapadají do dosud publikovaných poznatků (např. S e l m a n, 1991).

Test rovinné rovnoměrnosti MV pole pomocí tanků s 25 poli – Rovnoměrnost ohřevu v jednotlivých místech použité nádoby názorně ilustrují obr. 4 až 6. Na obrázcích jsou jednotlivým polím přiřazeny příslušné naměřené hodnoty lokálního nárůstu teploty vody (aritmetický průměr ze dvou opakování). Pravá část obrázku představuje rovinný řez prostorovým teplotním polem s vyznačením vrstevnic spojujících místa téhož teplotního vzrůstu.

Výsledky této série zkoušek lze shrnout takto:

1. U všech zařízení byla tímto testem prokázána větší či menší míra nerovnoměrnosti ohřevu. Z rozboru výsledků vyplynulo, že nerovnoměrnost ohřevu ovlivňuje jak tvar použité nádoby (plochý, hranatý tank) a její velikost, tak MV zařízení.
2. Rozdíly ve vzrůstu teploty vody v jednotlivých 25 polích tanků obou velikostí, charakterizující nerovnoměrnost ohřevu, byly u všech tří zařízení větší než rozdíly v ohřevu pěti izolovaných vzorků vody, zjištěné předcházejícím testem.
3. U všech zařízení byl konstatován intenzivnější ohřev vody v obvodových polích oproti vnitřním polím. Toto zjištění platí pro obě velikosti tanků. Nejpomaleji ohřívané místo bylo u zařízení SAMSUNG a PHILIPS ve středu tanků. V zařízení MOULINEX bylo toto místo posunuto mimo střed. Nejintenzivněji ohřívané místo bylo u všech zařízení mezi obvodovými poli - buď v některém z rohů (PHILIPS - malý tank, MOULINEX - velký tank, SAMSUNG - malý tank), nebo v sousedním poli.
   Z porovnání těchto výsledků s hodnotami, zjištěnými z předchozího pětikádinkového testu vyplývá dominantní vliv zátěže (použitého tanku) na rovnoměrnost ohřevu.
4. U zařízení SAMSUNG, v němž docházelo při ohřevu k otáčení talíře s testovacím tankem, vykazuje rozložení intenzity ohřevu v jednotlivých místech tanku určitou symetrii (vzhledem ke středu či osám tanku). Např. vzrůst teploty vody ve všech čtyřech rohových polích čtvercového tanku byl prakticky stejný (20,3 až 20,6 °C, rozdíl 1,5 %), obdobně malé rozdíly byly naměřeny pro středová pole v obvodové části (18,4 až 19,1 °C) atd. Projevil se vzrůst intenzity ohřevu směrem od středu k obvodu (podobně jako při pěti kádinkovém testu, ale v opačném směru).
   Takovéto rozložení teploty zcela odpovídá použitému typu nádoby při uvažování zákonitostí MV ohřevu a není patrné žádné místo MV pole v prostoru tanku s výrazně odlišnou intenzitou - lokální extrémy tvoří rohová pole (maxima) a střední pole (minimum).
   Tato symetrie ohřevu se i přes stejný typ testovacího tanku neprojevila u žádného dalšího zařízení. Lze ji proto přisoudit pravidelnému otáčení tanku s vodou při

ohřevu, které na určitém poloměru vyrovnává lokální hodnoty intenzity ohřevu a pravděpodobně i poměrně vyrovnaném MV poli v daném zařízení (viz pěti kádinkový test).

5. Na výsledcích sledované rovnoměrnosti ohřevu v zařízení PHILIPS a MOULINEX je vedle vlivu tvaru nádoby (přehřívání obvodových polí proti vnitřnímu) patrný i vliv nerovnoměrnosti MV pole v příslušném zařízení. Např. u trouby PHILIPS se v případě malého tanku rychleji ohřívala pole v přední části tanku, v zařízení MOULINEX se v případě většího tanku rychleji ohřívala pravá strana obvodových polí, v případě menšího tanku přední obvodová strana.
6. Z hlediska rovnoměrnosti ohřevu, testované touto metodou, byly nejpříznivější výsledky zjištěny pro MV zařízení SAMSUNG s rotačním talířem.

ZÁVĚR

Možnost nerovnoměrného ohřevu je jedním z problémů uspokojivé aplikace MV ohřevu pro tepelnou úpravu potravin. Souvisí s teplotním účinkem MV na materiál, s mechanismem MV ohřevu i klasických způsobů sdílení tepla, s konstrukčním řešením MV zařízení, s ohřívanou látkou - jejími vlastnostmi, množstvím, tvarem, teplotou i použitým obalem. Tyto vlivy mohou působit izolovaně nebo častěji komplexně s různou intenzitou. Předpověď vývoje lokálních teplot v ohřívané potravině, důležitá pro řízení a optimalizaci procesu, je proto při MV ohřevu velmi obtížná.

Dosavadní práce, věnované tomuto problému, prokázaly, že i při ohřevu jedné porce homogenního materiálu z teploty kolem 5 °C na 80 až 90 °C lze očekávat rozdíly v lokálních teplotách v desítkách stupňů (B u r f o o t et al., 1991). Při takovéto nerovnoměrnosti ohřevu je míra rizika poklesu kvality a hygienické bezpečnosti potravin po ohřevu vysoká.

Výsledky první části vlastních experimentů, kterými byla ověřována a porovnávána rovnoměrnost ohřevu ve třech typech náhodně vybraných MV zařízení pro domácnosti, možnost problémů s nerovnoměrným ohřevem potvrdily.

Byly zjištěny rozdíly mezi testovanými zařízeními, pokud jde o sledované rozložení intenzity energie v MV poli jednotlivých zařízení a výrazný vliv zátěže, její velikosti a geometrického tvaru. Z obou aplikovaných metod vyplynul pozitivní vliv pravidelného otáčení ohřívaného materiálu na rovnoměrnost ohřevu (příznivější výsledky z testování zařízení SAMSUNG).

Rekalibrace výstupního výkonu prokázala u všech zařízení rozdíly mezi štítkovou hodnotou výkonu, deklarovanou výrobcem, a hodnotou, určenou postupem podle mezinárodní normy IEC 705. Pro srovnatelnost výsledků výzkumných a vývojových prací v oblasti aplikace MV technologie je proto např. v Anglii postup podle IEC doporučován jako výchozí testovací procedura.

Literatura

BOWS, J. R.: The Influence of Thermal, Electrical and Physical Properties on the Quality of Food Heated by Microwaves. CFDRA - Technical Memorandum No. 527. 1989.
BOWS, J. R. - RICHARDSON, P. S.: Effect of Component Geometry and Packaging Material on Microwave Reheating of a Frozen Three-Component Meals. CFDRA. Technical Memorandum No. 552, 1989.
BURFOOT, D. - JAMES, S. J. - FOSTER, A. M. et al: Temperature uniformity after reheating in domestic microwave ovens. In: FIELD, R. W. - HOWEL, J. A. (Eds.): Process Engineering in the Food Industry. England, Elsevier Apl. Sci. 1991.
DEALLER, S. - ROTOWA, N. - LACEY, R.: Microwave reheating of convenience meals. Brit. Food J., 1992, č. 3 : 19-21.
INSULI, P. - DENTON, D.: Southwark microwave temperature surway. Brit. Food J., 1992, č. 6 : 18-21.
HOUŠOVÁ, J. - KRISTOVÁ, Š. - TOPINKA, P.: Rovnoměrnost ohřevu při tepelné úpravě potravin mikrovlnami. [Výzkumná zpráva.] Praha, VÚPP 1993.
OHLSSON, T: Fundamental of microwave cooking. Microwave World, 1983, č. 3-4 : 5-9
OHLSSON, T.: Controlling Heating Uniformity - the Key to Succesfull Microwave Products. SIK - Publication 520, Summer 1990.
SELMAN, J. D.: Microwave Technology. In: Catering for Tomorrow. HORTON Publ. Ltd. 1991 : 8.1-8.19.
CEI IEC 705: Methods for measuring the performance of microwave ovens for household and similar purposes. 2nd ed., 1988, Genéve.
The new microwave labels, Food sense. MAFF - Food Safety Directorate, U.K., 1992.

Došlo dne 3. 3. 1993

J. Houšová, Š. Kristová, P. Topinka (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Microwave heating: A comparison of microwave field uniformity in three household microwave ovens

The problems with temperature uniformity in microwave heating are known from practical of microwave ovens and development in microwave technology application. Recent studies dealing with heating performance of household microwave oven in U. K. showed that different models from actual market offer vary in their ability to heat food evenly. Controlled heating uniformity is important to ensure microbiological safety and high quality of microwave heated foods. Many undesirable consequences of non-uniform temperature distribution in microwave heated foods are possible: hot and cold spots, hot edges and cold centres in flat slabs, hot centres in food with round surfaces, raw taste and aroma, insufficient inactivation of microorganisms, overheating, vulcano effects, etc. There are different factors influencing the heating uniformity, including microwave field patterns, food and package geometry, food and package composition. The development of microwave heated food product with good heating uniformity presents a serious problem.

The results of oven energy distribution tests in three models of microwave household oven are presented in this article. The oven field uniformity tests were provided as the first part of investigation on uniformity of microwave heating of food products.

Three household ovens originating, from actual market offer were selected for experiments with power output 650 and 850 W and volume from 17 to 24 l. Only one from the ovens had a glass turntable, the other two had a stable shelves. The actual power output was determined as stated by IEC Standard 705 (1988), before performance tests. The differences between measured and calculated power output values were found out for all three ovens and all power stages.

Two methods for oven energy distribution test were used. The first one consisted of five glass cups filled with potable water (100 g) and installed in certain position on turn-
table or shelf. The square tanks of two sizes with 25 inner compartments were used in the second method. They were filled with 1,000 g or 500 g (smaller tank) water. Testing procedure and evaluation of results (water temperature raising in individual places during heating) was cariried out according IEC Standard.

The results of both tests are presented graphically for each oven. The differences in oven energy distribution between three tested ovens were found in all tests and significant influence of load (volume, geometry) on oven heating performance and uniformity was confirmed. The better ability for even heating was evaluated for the oven with turntable.

microwave heating; heating uniformity; testing of microwave ovens

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION
Slezská 7, CS-120 56 Praha 2, Czech Republic
Fax.: (00422) 257 090

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences and Slovac Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with summaries in English or in English with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals be sent to the above-mentioned address.

Periodical	Number of issues per year	pages
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	96
Veterinární medicína (Veterinary Medicine - Czech)	12	64
Živočišná výroba (Animal Production)	12	96
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	96
Lesnictví (Forestry)	12	96
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	80
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4	80
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4	80
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	80
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6	80

Potrav. Vědy, *11*, 1993 (4) : 335-340

STABILITA NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN ŘADY n-3 PŘI KULINÁRNÍ ÚPRAVĚ MAKRELY

Marie HOLASOVÁ, Helena PAŘÍZKOVÁ, Antonín KOPECKÝ, Jarmila BLATTNÁ, Ludmila WINTEROVÁ [1], Martin MRÁZEK

Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař;
[1]Výzkum - Technologie - Extrakce, U plynárny 30, 145 10 Praha 4

Stabilita nenasycených mastných kyselin řady n-3 je vzhledem k jejich struktuře relativně nízká. Jsou však významným nutričním faktorem při prevenci kardiovaskulárních chorob. Proto byly zkoumány jejich ztráty při kulinární úpravě makrely. Při vaření dosáhly tyto ztráty přibližně 10 %. Srovnatelné ztráty mastných kyselin řady n-3 jsou i ve svalovině smažené ryby, chráněné při úpravě obalem. Při pečení je ryba vystavena přímo vlivu teploty a atmosférického kyslíku a ztráty jsou vyšší, přibližně 30 %. V tomto případě je výsledek ovlivněn absorpcí rostlinného oleje užitého k pečení. Tato skutečnost se projeví ve značné míře i při analýze smažené makrely včetně obalu. Makrela, která je u nás na trhu běžnou konzumní rybou, je bohatým zdrojem nenasycených kyselin řady n-3 a běžné způsoby kulinární úpravy nepůsobí podstatný pokles jejich obsahu.

nenasycené mastné kyseliny řady n-3; kyselina eikosapentaenová - EPA; kyselina dokosahexaenová - DHA; obsah nenasycených kyselin řady n-3 v makrele; ztráty kulinární úpravou

Vysoce nenasycené mastné kyseliny řady n-3 jsou v současné době považovány za významný nutriční faktor pro prevenci vzniku cévních chorob, příp. i karcenogeneze (D y e r b e r g et al., 1978; D y e r b e r g, B a n g, 1979; H e r o l d, K i n s e l l a, 1986; S i n g e r et al., 1983). Jejich hlavními představiteli jsou kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA). Tyto kyseliny se vyskytují v mořských řasách a jsou kumulovány v organismech vodních živočichů, kteří tyto řasy konzumují. Pro lidský organismus jsou pak právě ryby hlavním zdrojem nenasycených mastných kyselin řady n-3 (P i g o t t, T u c k e r, 1987).

Vysoce nenasycené mastné kyseliny jsou vzhledem ke své chemické struktuře málo stabilní, zvláště snadno podléhají oxidačním procesům. Rychlost těchto procesů je ovlivněna řadou faktorů jako je teplota, přístup kyslíku a přítomnost přirozených stabilizujících složek. Při běžných způsobech kulinární úpravy ryb se tyto faktory mohou uplatňovat a ovlivnit tak výslednou nutriční hodnotu rybího pokrmu.

V této práci se proto věnujeme vlivu běžných kulinárních postupů, tj. vaření, pečení a smažení na obsah nenasycených mastných kyselin řady n-3 v makrele.

MATERIÁL a METODY

Jako pokusný materiál byla zvolena zmrazená makrela - filet (Frionor). Vzorky zmrazené ryby byly odebrány ze tří oddělených porcí a užity jako jeden vzorek k analýze, který byl pak zpracován vařením, pečením a smažením

Vaření: Ryba (70 g vzorek) byla vařena 20 minut v 500 ml osolené vody. Po vyjmutí z vody a vychladnutí byl ze tří míst odebrán vzorek a použit k analýze.

Pečení: Ryba byla pečena po dobu 40 minut v elektrické pečicí troubě při teplotě 180 °C ve smaltované nádobě. K pečení bylo použito minimální množství slunečnicového oleje (na 150g porci ryby cca 30 ml). Po vychladnutí byl ze tří míst odebrán vzorek k analýze.

Smažení: Ryba byla obalena klasickým způsobem v hladké mouce, vejci a strouhané housce a smažena na slunečnicovém oleji při 190 °C. K analýzám byl použit jednak vzorek svaloviny po odstranění obalu a dále vzorek ryby včetně obalu.

Z průměrného vzorku ryby byl směsí chloroform-methanol extrahován tuk, který byl přečištěn reextrakcí do chloroformu. Ve všech fázích manipulace byl tuk chráněn přídavkem 0,05 % propylgalátu do rozpouštědla (F o l c h et al., 1957).

Mastné kyseliny byly stanoveny ve VTX Praha (dříve VÚTP) podle podnikové normy PN 14-498-86 změna a) 10. 12. 1986 pro dietetický olej Epavit. Methylestery byly získány transesterifikací oleje v methanolickém roztoku KOH. Stanovení bylo provedeno metodou plynové chromatografie na přístroji Chrom 4 za použití skleněné kolony o délce 250 cm a průměru 3 mm se stacionární fází 15 % OV 275 na Chromosorbu P-AW-DMCS o zrnění 100 až 200 mesh. Teplota byla programovaná v rozmezí 160 až 230 °C. Pro detekci byl užit plamenně ionizační detektor.

Ve všech vzorcích byla paralelně stanovena sušina vzorku rozetřeného s mořským pískem (čtyřhodinový záhřev při 105 °C).

VÝSLEDKY a DISKUSE

Výsledky provedených analýz jsou shrnuty v tab. I a představují průměr tří sérií vzorků. Tabulka uvádí bilance mastných kyselin řady n-3 - eikosapentaenové (20 : 5) a dokosahexaenové (22 : 6) - v závislosti na různých způsobech kulinární úpravy makrely. Výsledky obsahu mastných kyselin řady n-3 jsou vyjádřeny jednak v g na 1 kg tuku, dále v g na 1 kg ryby a konečně v g na 1 kg sušiny. Hodnoty byly vypočteny z procentuálního zastoupení mastných kyselin v tuku a obsahu tuku a sušiny.

I. Obsahy mastných kyselin řady n-3 při kulinární úpravě makrely -- Content of 3n-fatty acids during culinary processing of mackerel

Vzorek[1]	Tuk[7]	Sušina[8]	Mastné kyseliny[9] [g/kg]				
			v tuku			v rybě	v sušině
	[g . kg^{-1}]		EPA	DHA	Σ	Σ	Σ
Makrela mrazená[2]	302	441	72	128	200	60	137
Makrela vařená[3]	346	541	72	123	195	68	125
Makrela pečená[4]	365	540	57	86	143	52	97
Makrela smažená obal odstraněn[5]	349	548	65	127	192	67	122
Makrela smažená s obalem[6]	398	617	46	84	130	52	84

[1]sample; [2]frozen mackerel; [3]cooked mackerel; [4]roasted mackerel; [5]battered mackerel - batter removed; [6]battered mackerel with batter; [7]fat; [8]dry matter; [9]fatty acid; [10]for fat; [11]for fish; [12]for dry matter

Z tabulky vyplývá, že při vaření dochází k uvolnění vody z tkáně, a tím k mírnému nárůstu sušiny a obsahu tuku. Zastoupení mastných kyselin EPA a DHA v tuku se prakticky nemění ve srovnání se zmrazenou syrovou rybou. Při přepočtu na 1 kg ryby dochází z důvodu změny sušiny k mírnému nárůstu obsahu těchto kyselin.

Při pečení, při němž teplota, a tím i ztráta vody je vyšší než při vaření, dochází k poklesu obsahu vody, ale současně analyzovaný vzorek přijímá část tuku, který byl použit k pečení, jak je patrné z nárůstu obsahu tuku. Při porovnání zastoupení kyselin řady n-3 v tukové frakci je patrný pokles daný pravděpodobně i přítomností absorbovaného rostlinného oleje v tukové frakci.

Při sledování vlivu smažení byl separátně analyzován vzorek smažené ryby po odstranění obalu. U tohoto vzorku byl opět nalezen nárůst sušiny, nárůst tuku je malý, protože obal s absorbovaným rostlinným olejem byl odstraněn. U údajů o procentuálním zastoupení kyselin řady n-3 v tuku je patrný mírný pokles. Při analýze ryby včetně obalu je pokles EPA a DHA v tuku výrazný vzhledem k vyššímu podílu rostlinného oleje na celkovém tuku. I vyjádření na sušinu vykazuje pokles vzhledem k nárůstu sušiny i tuku vlivem obalu a absorpce rostlinného oleje.

Změny obsahu kyseliny EPA a DHA při různých druzích kulinární úpravy jsou patrné z údajů o jejich obsahu v sušině. Je zřejmé, že vařením se ztrácí přibližně 10 % kyselin řady n-3. Srovnatelné ztráty mastných kyselin řady n-3 jsou i ve svalovině smažené ryby, chráněné při úpravě obalem. Při pečení je ryba vystavena přímo vlivu teploty a atmosférického kyslíku a ztráty jsou vyšší, přibližně 30 %. V tomto případě je výsledek ovlivněn absorpcí rostlinného oleje užitého k pečení,

jak je patrné z nárůstu obsahu tuku. Tato skutečnost se projeví ve značné míře i při analýze smažené makrely včetně obalu.

Z výsledků vyplývá, že ztráty mastných kyselin EPA a DHA jsou při kulinární úpravě relativně nízké a že makrela je cenným zdrojem kyselin řady n-3.

H e a r n et al. (1987a, b), kteří sledovali ztráty polynenasycených mastných kyselin u ryb při úpravě mikrovlnným ohřevem, zjistili, že složení mastných kyselin se nemění. Podobně P i g o t t a T u c k e r (1987) stanovili změny mastných kyselin v tresce za podmínek smažení obalených ryb s užitím tuků různého stupně nasycenosti. Nalezli, že dochází ke změně v zastoupení kyselin řady n-3 v závislosti na absorpci smažicího tuku, ztráty jsou nízké především při použití ztuženého rostlinného tuku. M a i et al. (1978) při zpracování pstruha a některých mořských ryb rovněž nenašli změny ve složení mastných kyselin. Jako šetrnou technologii při zpracování ryb z hlediska uchování obsahu těchto kyselin doporučují japonští autoři S u z u k i et al. (1988) extruzi.

Obecně jsou mořské ryby lepším zdrojem mastných kyselin řady n-3 než ryby sladkovodní, existují však podstatné rozdíly dané druhem ryby (H e a r n et al., 1987a, b; E v a n s, W e s s e l s, 1984), vliv má i lokalita, krmení (V a l e n t o v á et al., 1986; S u z u k i et al., 1986) a podmínky zpracování.

Je třeba si však uvědomit, že příjem těchto kyselin je vždy spojen s příjmem tuku. Chce-li spotřebitel dosáhnout dostatečného příjmu kyselin řady n-3, což, jak uvádějí B a r l o w et al. (1990), představuje 1 g na osobu a den, musel by konzumovat nereálné množství sladkovodních ryb nebo přibližně 100 g velmi bohatého zdroje ze skupiny mořských ryb za týden. Tím by současně uhradil asi 4 až 5 % denní doporučené dávky tuku. Čs. stravovací zvyklosti a možnosti nevyužívají ryby v tak velkém rozsahu. Podíl ryb na spotřebě masa činí přibližně 6 % (Š m r h a, 1990). Proto je vhodné spotřebu rybího masa zvýšit a zvláště u rizikových skupin populace doplnit příjem mastných kyselin řady n-3 dietetickými přípravky.

Literatura

BARLOW, S. M. - YOUNG, F. V. K. - DUTHIE, I. F.: Nutritional recommendations for n-3 polyunsaturated fatty acids and the chalenge to the food industry. Proc. Nutr. Soc., *49*, 1990 : 3-21.

DYERBERG, J. - BANG, H. O.: Haemostatic function and plateled polyunsaturated fatty acids in Eskimos. Lancet, *2*, 1979 : 433.

DYERBERG, J. - BANG, H. O. - STOFFERSEN, E. - MONCADA, S. - VANE, J. R.: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. Lancet, *2*, 1978 : 117.

EVANS, A. A. - WESSELS, J. P. H.: Fatty acid composition of various fresh and canned products and one smoked fish products. Ann. Rep., Fishing Ind. Res. Inst., Cape Town , No. 38, 1984 : 115-117.

FOLCH, J. - LEES, M. - STANLEY, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem., *226*, 1957 : 497-509.
HEARN, T. L. - SGOUTAS, S. A. - HEARN, J. A. - SGOUTAS, D. S.: Polyunsaturated fatty acids and fat in fish flesh for selecting species for health benefits. J. Food Sci., *52*, 1987a : 1209.
HEARN, T. L. - SGOUTAS, S. A. - SGOUTAS, D. S. - HEARN, J. A.: Stability of polyunsaturated fatty acids after microwawe cooking of fish. J. Food Sci., *52*, 1987b : 1430.
HEROLD, P. M. - KINSELLA, J. E.: Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: A comparison of findings from animal and human feeding trials. Am. J. Clin. Nutr., *43*, 1986 : 566.
MAI, J. - SHIMP, J. - WEICHRAUCH, J. - KINSELLA, J. E.: Lipids of fish fillets. Changes following cooking by different methods. J. Food Sci., *43*, 1978 : 1669.
PIGOTT, G. M. - TUCKER, B. W.: Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. Food Rev. Int., *3*, 1987 : 105.
SINGER, P. - JAEGER, W. - WIRTH, M. - VOIGT, S. - NEUMANN, E. - ZIMONTKOWSKI, E. - HAJDN, S. - GOEDICKE, W.: Lipid and blood pressure-lowering effect of mackerel diet in man. Atherosclerosis, *49*, 1983 : 99.
SUZUKI, H. - OKAZAKI, K. - HAYAKAWA, S. - WADA, S. - TAMURA, S.: Influence of commercial dietary fatty acids on polyunsaturated fatty acids of cultured freshwater fish and comparison with those of wild fish of the same species. J. Agr. Food Chem., *34*, 1986 : 58.
SUZUKI, A. - CHUNG, B. S. - ISOBE, S. - HAYAKAWA, S. - WADA, S.: Changes in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the chum salmon muscle during spawning migration and extrusion cooking. J. Food Sci., *53*, 1988 : 1659.
ŠMRHA, O.: Maso a ryby mezinárodně. Receptář správné výživy, *1*, 1990 : 39.
VALENTOVÁ, H. - DAVÍDEK, J. - POKORNÝ, J.: Stanovení polárních oxidovaných mastných kyselin tukového podílu potravin kapalinovou chromatografií s vysokou účinností. Potrav. Vědy, *4*, 1986 : 1-8.

Došlo dne 7. 1. 1991

M. Holasová, H. Paříková, A. Kopecký, J. Blattná, L. Winterová, M. Mrázek
(Food Research Institute; Research-Technology-Extraction, Praha, Czech Republic)

Stability of 3n-polyunsaturated fatty acids during culinary processing of mackerel

Stability of 3n-long chain polyunsaturated fatty acids (3n-PUFA) is owing to their structure relatively low. They readily interact with atmospheric oxygen and the processes are affected by a series of factors, e. g. temperature, access of oxygen, presence of natural stabilizers. These factors play a significant role during culinary processing of fish. Losses of 3n-PUFA cause a reduction of the nutritional value of the fish meals because the acids represent a significant component with preventive effects

against cardiovascular diseases. The paper is aimed at the assessment of the levels of 3n-PUFA during cooking, frying and roasting of mackerel.

Samples were taken from three frozen fish fillets and used as one sample. The conditions of culinary treatment were as follows:

(a) the fish was cooked in salt water for 20 minuts

(b) the fish was roasted for 40 minuts at 180 °C in an enamel vessel with 30 ml sunflower oil/150g fish

(c) the fish was battered in flour, eggs and bread crumbs and fried in sunflower oil (190 °C). Samples with batter and after its removal were analyzed.

Fat was determined by the Folch procedure, 0.05 % propyl gallate was added into all solvents as antioxidant. Fatty acids were determined by temperature programmed GLC (160 - 230 °C) with flame-ionization detection (Czech Fat Industry Standard PN 14-498- 86). Dry matter was determined by drying with sand at 104 °C. The results of fatty acids concentration - eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - are given for fat, fish tissue and fish dry matter (Table I).

During cooking water is released from the tissue and the levels of 3n-PUFA are only slightly changed. Their losses reach 10 %, calculated for the dry matter. The same applies for frying in batter during which the tissue is protected against air. During roasting the joint effects of high temperature and direct access of oxygen cause higher losses of 3n-PUFA, i. e. approximately 30 %. In the latter case the results are affected by absorption of the vegetable oil used for roasting (as seen from the increase of fat concentration). The same occurs during frying as obvious from the analyses of fish including the batter.

The consumer must bear in mind that the 3n-PUFA intake is connected with fat intake. The eating habits in Czechoslovakia do not ensure the meeting of the recommended intake of 3n-PUFA by fish consumption. The consumption of fish meat should therefore be enhanced and application of fish oil concentrates containing high levels of 3n-PUFA is therefore recommended especially for population groups with risk of cardiovascular diseases.

3n-polyunsaturated fatty acids; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; content of 3n-polyunsaturated fatty acids in mackerel; losses in culinary processing

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 341-348

PŘEHLEDY

OBRAZOVÁ ANALÝZA - PERSPEKTIVNÍ METODA POMÁHAJÍCÍ PŘI KLASIFIKACI KVALITY V POTRAVINÁŘSTVÍ

Vladimír NÝVLT

Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10 - Hostivař

V potravinářské výrobě současnosti vystupuje do popředí stále důrazněji potřeba objektivní klasifikace kvality produkce. Stanovení kvality v rozmanitých oblastech výroby je možné různými způsoby. V komplexním pohledu pojem kvality potravin v sobě zahrnuje hledisko nutriční, senzorické, hygienické nebo technologické. Z optických vlastností určujících vzhled vychází metoda obrazové analýzy, tj. zpracovávání vstupní informace v optické podobě. Sféra využití snímané scény ve formě takového vstupu je neobyčejně široká. V nejjednodušším případě systém pouze monitoruje daný předmět, složitější aplikace předpokládají integraci systému do technologického procesu, který je na základě jejich výstupního signálu zpětně ovlivňován. Realizuje se tím jistá optimalizace za podmínky dostatečně rychlého algoritmu, což podmiňuje soulad s požadovanou kapacitou technologického zařízení.

Problematikou dosažení objektivní klasifikace kvality, odstranění subjektivních vlivů a zvýšení přesnosti stanovení pomocí metod zpracování obrazové informace se zabývá též Výzkumný ústav potravinářský Praha. Činnost tohoto pracoviště je zaměřena zejména do oblasti potravinářských mikrostruktur a makroskopické klasifikace potravinářských materiálů.

Princip metody

Ve své podstatě se systém elektronického vidění skládá ze vstupního snímače optického signálu (kamera) a počítače s programovým vybavením pro zpracování obrazu. Systém s optimalizací je pak dále vybaven akčními členy pro zpětnovazební působení. Funkce systému spočívá v nasnímání kontrolovaného objektu nebo oblasti a zpracování získaného snímku. Rozhodovací algoritmus pak zajistí příslušnou odezvu soustavy. To může být pouhá signalizace odchylky, aktivace nějakého výkonového členu zajišťujícího vyřazení příslušného objektu z proudu objektů nezávadných a nebo opravný zpětnovazební signál pro korekci technologického procesu žádoucím způsobem.

Systémy pracují též v nespojitém režimu jako laboratorní analyzátory. V takovém případě umožňují detailní vyhodnocení, proměření a dodatečné úpravy vstupního obrázku, kterým je například mikroskopický preparát. Na základě známých souvislostí vybraných ukazatelů s kritérii kvality je možno provádět klasifikaci. Aplikace v technologii zpravidla předpokládá vyhodnocení jednoho snímku pro každý výrobek v reálném

čase, a to klade značné nároky na výpočetní systém, zejména z hlediska instrukčního cyklu a paměťového prostoru.

Historie metody

Obrazová analýza je metoda s krátkou historií, kterou lze datovat od počátku šedesátých let. Prototyp prvního obrazového analyzátoru, který používal televizní kamery pro snímání obrazové informace za účelem její analýzy, se totiž objevil teprve v roce 1963. Byl to Quantitative Television Microscope, model A, od firmy Metals Research Ltd. Digitální analyzátor, schopný uložit celý (byť pouze černobílý) obrázek do paměti, představila o šest let později americká společnost Bausch and Lomb. Éra softwarově řízených analyzátorů začala teprve v roce 1977. Prvním představitelem této generace byl systém Magiscan I firmy Joyce Loebl. Jako čtvrtou generaci analyzátorů lze označit systémy založené na bázi transputerů. Spektrum výrobců i specialistů na aplikace se velmi rozšířilo. Do oblasti zájmu dnes již nepatří pouze kosmická a vojenská technika nebo metalurgie, ale i různé oblasti zdravotnictví a ve stále větší míře běžné průmyslové aplikace. Zvolna tak proniká metoda zpracování obrazu i do potravinářství.

Klasifikace jakosti pomocí obrazové informace

Při výrobě potravin je třeba sledovat nejen kvalitativní ukazatele výsledného produktu, ale pro dosažení vyšší efektivnosti produkce je to nutné také v celém výrobním procesu včetně surovin. V současnosti se bohužel v našem hospodářství stále ještě využívá spíše empirického hodnocení s velkým podílem subjektivního rozhodování. Ve výrobních procesech je nezřídka velký podíl manuální práce a v takových výrobách se zpravidla kvalitativní ukazatele sledují jen náhodně nebo vůbec ne. Pokud se průběžné testy přece jen provádějí, jsou typickým příkladem laboratorní rozbory vzorků. Jejich výsledky jsou však pouze globálním ukazatelem, neboť nezřídka jsou k dispozici až v době, kdy výrobek je již zabalen nebo dokonce expedován. Pro moderní efektivní výrobu garantující standartní jakost výrobku je tato situace naprosto neúnosná. Potřeba rychlého, objektivního vyhodnocování na všech stupních výrobního procesu je proto vysoce aktuální, a to i v procesech s vysokým podílem mechanizace a automatizované manipulace. Různorodost potravinářského oboru neumožňuje ve stručnosti postihnout celé spektrum potřebných kritérií. Omezme se tedy na vymezení jednotlivých trendů, které umožňuje využívání obrazové analýzy.

Zdokonalování technologie výrobního procesu v potravinářství je do jisté míry zajištěno rostoucí mechanizací v důsledku vývoje specializovaných potravinářských strojů a linek. Optimalizace technologického procesu je umožněna počítačovým řízením výroby, dnes již výhradně na bázi decentralizovaných systémů. Intenzivní tlak je směrován k objektivizaci zjišťování všech dat nezbytných k řízení celého systému. Jednoduchá je situace u běžných provozních veličin (tlak, teplota, hladina, průtok aj.), složitější v takových případech jako např. průběžné zjišťování pH.

Nejkomplikovanější je ovšem zjišťování takových kategorií jako např. jakost. Stanovení je pak závislé na vhodné volbě kritéria a jeho účinnosti na jedné straně a jeho

technické realizovatelnosti na straně druhé. Zde je poměrně velký prostor pro uplatnění metod obrazové analýzy. Zpracování rozsáhlých informačních souborů získaných prostřednictvím kamery umožňuje uplatnění robotických prvků, realizaci nejrůznějších třídicích a inspekčních systémů účelově specializovaných. Pro orientaci lze problematiku rozčlenit zhruba do tří směrů, resp. oblastí: mikroskopická, makroskopická a technologická.

Mikroskopické analýzy

Zpracování obrazové informace na úrovni mikroskopického obrazu postihuje zejména mikrostrukturální charakteristiky materiálů. Typické využití je pro analýzu a nespojitou klasifikaci. Napojení na řídicí systém je možné zpravidla pouze off-line (korekce s velkou časovou prodlevou). Měření tohoto druhu vyhovují pro hodnocení mikrostrukturálních parametrů látek, pro kvantifikaci velmi drobných objektů jako např. mikroorganismů apod.

Makroskopické analýzy

Poněkud univerzálnější jsou analýzy makroskopických obrazů, které umožňují nejen klasifikaci, kvantifikaci a diferenciaci makrostrukturálních parametrů, ale i rozlišení předmětů podle objektově orientovaných parametrů a identifikaci defektů (praskliny, úlomky, odchylky od stanoveného vzoru). Lze tedy běžně rozeznávat podobné nevelké objekty (např. různé druhy zrní ve směsi) nebo klasifikovat složení podle podílu ploch předepsaných vlastností (např. zemědělských porostů při dálkovém průzkumu Země).

Řízení procesů

Pokud má analýza makroskopického obrazu přímou vazbu na nějaký řídicí systém, např. tím že v reálném čase vytváří podle vhodného algoritmu zpracování akční signál s jasně vymezenou funkcí v rámci tohoto systému, dostáváme se již do oblasti technologické aplikace. Typickým příkladem jsou inspekční a třídicí systémy, jejichž úkolem je kontrolovat a rozdělovat podle určitých kritérií tok materiálu, surovin nebo výrobků. Úspěšnost takových zařízení je podmíněna skloubením následujících podmínek:

- volba vhodného algoritmu,
- rychlost zpracování, daná použitým druhem hardware,
- preciznost realizace odezvy systému, daná použitým strojním zařízením.

Přínos metody pro potravinářství

Zejména ve sféře technologických aplikací je zřejmý posun úrovně řešení problematiky, který sebou nese obrazová analýza. Výraznými přednostmi z potravinářského hlediska jsou hygiena snímání a šetrnost ke kontrolovanému produktu, neboť se jedná o bezkontaktní způsob získávání informace. Dále je to naprostá objektivnost stanovení, vycházející z měřených parametrů snímku (densitometrické nebo geometrické veličiny),

popřípadě z jejich statistického zpracování (např. distribuce drobných objektů apod.). Kvalitativní kritéria mohou tedy zahrnovat též veličiny jiným způsobem nepřístupné, event. zjistitelné jen velmi obtížně a zdlouhavě. Navíc je možno využít i záření mimo viditelné spektrum (UV, RTG aj.), což ještě dále rozšiřuje oblast využitelnosti.

Zpracování obrazu z kamery je možné kromě toho využít nejen pro vlastní řízení technologie, ale též pro navádění manipulátorů jimž toto tzv. strojní vidění umožňuje orientaci v prostoru. Bez zajímavosti není ani stacionární aplikace, při níž je přínosem mimo objektivnosti a vyšší přesnosti stanovení zejména odstranění nějaké monotonní činnosti. Příkladem je např. automatické vyhodnocování velkého množství podobných vzorků, u nichž je třeba pouze stanovit počet specifikovaných objektů (např. částice dané velikosti).

Naproti uvedeným přednostem stojí nevýhody metody, které spočívají především v cenové náročnosti technického vybavení. I ty nejjednodušší aplikace vyžadují sestavu kamera plus rozšířené PC. Ještě nákladnější je však programové vybavení, neboť se jedná o složitou aplikaci mnoha náročných algoritmů a ani pouhá modifikace standardního analyzátoru není jednoduchou záležitostí. Kromě toho je třeba uvažovat zvláště při technologických aplikacích s omezujícími faktory jako prach, usazeniny, opticky podobné příměsi apod.

Oblasti využití metody obrazové analýzy v potravinářství

Hodnocení a třídění jatečného masa – Hodnocení jatečného masa jako základ pro jeho třídění a ocenění se snaží řešit mnoho výrobců tzv. objektivních měřičů. Využívají přitom různé metody (ultrazvuk, infračervené záření aj.), které mají svá specifická omezení. Za definovaných podmínek však vykazují lepší výsledky než subjektivní hodnocení lidskou obsluhou. Zpracování obrazové informace počítačem má předpoklady vzájemně spojit výhody vizuálního hodnocení hovězího nebo vepřového masa s objektivitou instrumentálních technik. Úloha při hodnocení masa spočívá v identifikaci a kvantifikaci ploch libového masa a tukové tkáně. Problémy způsobují kosti, vazivová tkáň a vnitrosvalový (intramusculární) tuk. Pokud by se využívalo černobílé soustavy tak také barva tkáně (N e w m a n n, 1987), která je proměnlivá sama o sobě a s časem se mění (při osychání na vzduchu). Identifikace kostí uvnitř tkáně lze dosáhnout v kombinaci s Rtg snímkem, rozlišitelnost vaziva je lepší v UV oblasti spektra, vnitrosvalový tuk lze korigovat příslušným faktorem podle chemické analýzy.

Také při zpracování jiných druhů masa lze najít uplatnění zpracování obrazové informace pro klasifikaci. Kvalitativní hodnocení jednotlivých kusů na drůbežích porážkových linkách je dosud prováděno subjektivním způsobem, i když se jedná o základní parametr pro řízení celé balírny. Existují pokusy o automatické stanovení na základě snímku z kamery (B a b i t t, 1988), ale dosud nebyly plně dořešeny k provoznímu nasazení.

Zajímavý problém, stále naléhavější zejména pro zásobování trhu mořskými i sladkovodními rybami je třídění ryb podle druhu a velikosti. Program řešící tuto úlohu musí bezpečně identifikovat jednotlivé druhy ve směsi a změřit jejich rozměry. Zároveň je

třeba, aby nebylo hodnocení závislé na pružných deformacích rybího těla (S t r a c h a n, 1990).

Hodnocení mléčných výrobků – Průběh zpracování mléka na sýry poskytuje prostor pro aplikace analýzy obrazu již při kontrole polotovaru, tzv. sýrového zrna. U hotového sýra se jedná zejména o analýzu mikrostruktury (tj. např. velikosti a rozložení tukových částic ve hmotě) a změn struktury při zrání a skladování.

Kontrola práškových materiálů – Stanovení množství, velikosti a rozložení částic v potravinářských materiálech práškového charakteru je účelné pro laboratorní analýzu okamžitého stavu (např. v určitém stadiu výroby) nebo jeho změn v závislosti na vnějších podmínkách (teplota, vlhkost, doba skladování). Možné je však i touto cestou kontrolovat průběh technologického procesu. Např. vyhodnocením jednotlivých frakcí mouky při mletí obilí lze usuzovat na průběh mletí (S o s u l s k i et al., 1988), případně porovnávat účinnost různých způsobů mletí navzájem apod.

Z jiných práškových hmot lze považovat za potřebné zejména analýzy škrobu, různých přísad (např. stabilizované vitaminy) aj.

Klasifikace a třídění zrnitých materiálů – Podobnou úlohou v makroskopickém měřítku je zjišťování geometrických parametrů zrn u různých druhů obilovin, hrášku, oříšků, sójových bobů atd. Využitelnost takto zjištěných veličin je především při klasifikaci, třídění, ale i v přímém hodnocení kvality (E v e r s, W h i t h e y, 1989). Identifikace anomálií morfologických parametrů dané třídy zrn umožňuje detekci nejen nestandardních elementů, nýbrž také různých defektů (úlomky, pukliny). Zpravidla nelze tvrdit, že se jedná o úlohu jednoznačnou a cílového řešení lze dosáhnout využitím několika algoritmů. Jejich vzájemné srovnání pak osvětlí výhodnost jednotlivých řešení a vede k optimálnějšímu výsledku. Takové srovnávácí studie (např. Z a y a s et al., 1989) nutně předcházejí návrhu koncepčních řešení účelových zařízení. Některé druhy zrn (kávová zrna, pistácie) je výhodnější analyzovat mimo viditelnou oblast spektra (v pásmu UV). Použitím Rtg záření lze dobře odlišit nežádoucí příměsi (např. kaménky, střepy nebo kovové části).

Řízení třídiček kusových materiálů – U těchto strojů se zpravidla jedná o zjišťování vzhledových charakteristických rysů, zpravidla velikost, tvar, barva, skvrny signalizující poškození a podobně. Tyto charakteristiky zjištěné analýzou snímku mohou být základem při rozhodování v třídicích procesech u bramborových hlíz, různých druhů ovoce a zeleniny (např. jablka, rajčata, okurky). Příklad možného přístupu k řešení pro tržní rajčata lze již nalézt v literatuře (S a r k a r, W o l f e, 1985).

Kontrola konečných výrobků a jejich balení – Zde uveďme jako příklad nápojářský průmysl, kde lze použít zpracování obrazu pro kontrolu čistoty nebo poškození lahví, správného uzavření plechovek, identifikace správného typu etikety, její nepoškozenost a správnou pozici po nalepení na obal. U výrobků balených do folie kontrola dokonalosti svárů. Inspekční kontrola hotové produkce např. v pekárenství umožňuje vyřazení kazových výrobků (G a g l i a r d i, S u l l i v a n, 1983), přičemž rozhodujícím ukazatelem je právě jejich vzhled.

Z tohoto stručného výčtu je zřejmá šíře možných aplikací v potravinářské technologii. Protože analýza obrazové informace vstupující do systému prostřednictvím kamery poskytuje možnosti přesného stanovení na základě měření, odstraňuje se tím

subjektivní faktor rozhodování. To je základní podmínkou objektivnosti řízení u automatizovaných procesů.

Obrazová analýza a potravinářský výzkum

Obrazová analýza a zpracování obrazu vůbec je obor, který teprve v současnosti má podmínky pro dynamický rozvoj vzhledem k silné závislosti na možnostech technického vybavení. I na území bývalého Československa již dnes existuje řada pracovišť, která se určitým způsobem touto problematikou zabývají, i když pro zcela nepotravinářské aplikace. Začínají se objevovat i ryze uživatelská pracoviště, což je typické zejména pro zdravotnictví. Závažnost problematiky klasifikace kvality v potravinářské produkci spoluvytvářející konečnou efektivnost výroby je nepominutelná oblast pro potravinářský výzkum. Je tedy zřejmé, že se přirozeně musí zabývat také progresivními metodami klasifikace, kam obrazová analýza bezesporu patří. Orientace na optické systémy je nesmírně perspektivní a napovídá tomu i vývoj u světových výrobců.

Výzkum a vývoj aplikací v potravinářské oblasti zahrnuje zpravidla kontrolní operace a řízení specializovaných strojů. Jako příklad lze uvést sledování počtu kusů u skupinových balení (počet sáčků čaje v kartonu, úplnost osazení krabičky rybích prstů nebo sušenek apod.) nebo rozpoznávání kvalitních produktů od nekvalitních. Zde se nemusí jednat pouze o přímé poškození (odlomená oplatka, zahnívající otlaky na jablku), ale též o takové odchylky, které signalizují nějaký druh závadnosti (zelenající hlízy brambor). Odtud je již blízko k třídicím systémům, které odlišnost od předepsaného standardu nejen vyhodnotí, ale podle toho přímo reagují zařazením objektu do příslušné jakostní skupiny a nebo jeho vyřazením z proudu postupujících předmětů. Přitom je v principu lhostejné zda se jedná o pomeranče, oříšky či smažené bramborové hranolky. Podstatný rozdíl je však v použitých algoritmech pro programové vybavení. Samostatnou skupinu pak tvoří aplikace vizuální navigace strojů (např. robotů pro sklizeň žampionů, inteligentních sklízečů zralých rajčat aj.), což jsou aplikace nejsložitější.

Technika zpracování obrazového signálu je dnes realizovatelná již na úrovni personálních počítačů s patřičně přizpůsobenou konfigurací. Tím se stala relativně velmi přístupnou pro nejširší okruh aplikací, tedy i pro potravinářství. Do této kategorie spadá též analyzátor obrazových dat (VIDAS) používaný ve Výzkumném ústavu potravinářském Praha. Uplatnění výpočetní techniky při automatizaci technologie přináší zpravidla úspory ruční práce a zvýšení objemu produkce. Řízení výrobního procesu však samo o sobě ještě nezaručuje výskyt pouze perfektních výrobků standardní úrovně. Pouze ty řídicí systémy, zahrnující vliv průběžné výstupní kontroly na tok výsledných produktů (přetřídění) a zpětně na průběh technologických procesů (optimalizace), mají předpoklady k zajištění standardně vysoké kvality výroby. V potravinářství, kde vzhled výrobku hraje důležitou roli, je možné při klasifikaci kvality z této skutečnosti vycházet. Získání objektivních údajů o strukturálních parametrech je rovněž velmi přínosné a pro kvalitní rozhodování během výrobního procesu nenahraditelné.

U konkrétních aplikací je třeba zvažovat výběr vhodných kritérií kvality, jejich naléhavost, ekonomickou náročnost realizace a návratnost investice. Nespornou výho-

du pak přináší jistota kontroly a zaručený standard produkce. Každopádně se optické systémy využívající obrazovou analýzu řadí ke špičkovým technologiím, jejichž implementace přináší z hlediska výroby posun na kvalitativně vyšší úroveň. V současné době přeměn našeho hospodářství a hledání cest zlepšení efektivnosti a kvality produkce je využití optických systémů jednou z možných oblastí i pro potravinářství.

Příspěvkem ke zlepšení situace je vybudování pracoviště obrazové analýzy ve Výzkumném ústavu potravinářském Praha. Konfigurace vychází ze systému VIDAS a je doplněna tak, aby poskytovala možnost práce s makrosnímky i snímky mikroskopickými. Úspěšnost práce v tomto oboru předpokládá zvládnutí nejen programového vybavení vlastního analyzátoru, ale i metod a přístupů ke zpracování obrazu obecně. Proto byla značná aktivita věnována kontaktům s pracovišti, která již určitou zkušenost s tímto novým oborem mají a nebo se touto problematikou v jakékoli formě zabývají.

Experimentální práce byly např. zaměřeny na identifikaci mikroorganismů v nápojářství. Pro pivovarskou technologii byly testovány možnosti vyhledávání a počítání kvasinek ve vzorcích mladiny. Vzhledem k charakteristickému tvaru těchto objektů je možné a dostatečné použít pro jejich identifikaci objektově specifických parametrů. Složitější je situace s přímým získáním reprezentativního snímku odpovídajícího situaci v celém objemu. Pro kontrolu filtrovaného nápoje byly dále hledány možnosti určování výskytu a množství nežádoucích mikroorganismů. Na modelových tekutinách (mladina, infikované pivo) se odzkoušely postupy identifikace a stanovení množství bakterií typu *Lactobacillus*. Byl sestaven program pro automatické vyhodnocení počtu těchto bakterií ve snímku.

Série experimentů byla dále věnována hodnocení velikostí sýrových zrn a jejich rozdělení ve vzorcích polotovarů pro výrobu naturálně zrajících sýrů (Moravský bochník). Byla vymezena metodika přípravy vzorku a postup zpracování snímku včetně statistického vyhodnocení nasegmentovaného obrazu. Pro řešení vybraných problémů potravinářské technologie byla dohodnuta úzká spolupráce s několika tuzemskými organizacemi a prostřednictvím kontaktů v zahraničí též spolupráce formou začlenění do mezinárodních programů.

Mezinárodní spolupráce je rozpracována v několika větvích. Společně s ČVUT Praha je připravováno začlenění do programu TEMPUS (Transeuropean Mobility Scheme for University Studies). Zahrnuta je zde Velká Británie (Queens University of Belfast) a Spolková republika Německo (Technische Universität Erlangen). Velký zájem o spolupráci na využití obrazové analýzy formou společného výzkumného projektu má rovněž dlouholetý partner VÚPP ve Skotsku, Torry Research Station. Pro tento účel byla vypracována technicko-ekonomická studie a návrh projektu je ve schvalovacím řízení v Bruselu. Jeho přijetí zabepečí zejména technickou podporu na špičkové úrovni.

Závěr

Cílem příspěvku bylo upozornit na perspektivní metodu klasifikace kvality zpracováním obrazové informace. Jsou diskutovány výhody jejího využití v potravinářství a uvedeny potenciální oblasti uplatnění. Naznačeny jsou také aktivity potravinářského výzkumu v této oblasti.

Metoda zpracování obrazu a jeho analýzy je progresivní způsob získávání informace, který vychází z optických vlastností předmětu. Přes svoji náročnost na technické vybavení a vytvoření uživatelských programů se rozšiřuje do mnoha oborů a nalézá své místo i v potravinářství.

Literatura

BABITT, S.: Machine vision: Poultry quality control by computer. Poultry Int., *27*, 1988 : 27-32.

EVERS, A. D. - WHITHEY, R. P.: Use of image analysis to predict milling extraction rates of wheats. Food Microstr., *8*, 1989 : 191-199.

GAGLIARDI, G. - SULLIVAN, D.: Computerized video inspection for quality control. Cereal Foods World, *28*, 1983 : 513-515.

NEWMAN, P. B.: Meat grading by image analysis. In: Proc. "The objective measurement of food quality", U. K., 1987.

SARKAR, N. - WOLFE, R. R.: Computer vision based system for quality separation of fresh market tomatoes. Trans. ASAE, *28*, 1985 : 1714-1718.

SOSULSKI, F. W. et al.: Effects of attrition milling on air classification properties of hard wheat flours. Starch, *40*, 1988 : 100-104.

STRACHAN, N. J. C.: Automatic fish species grading using image processing and pattern recognition techniques. [PhD Thesis.] University of Aberdeen, U. K., 1990.

ZAYAS, I. et al.: Discrimination of wheat and nonwheat components in grain samples by image analysis. Cereal Chem., *66*, 1989 : 233-237.

V. Nývlt (Food Research Institute, Praha, Czech Republic)

Image analysis - prospective method assisting in the quality classification in food production

The method of image processing and its analysis is a progressive way how to obtain information based on optical properties of the subject. In spite of its demandingness for technical equipment and creation of user programs, the method is extending into many fields and it starts to be applied in food production as well. Indisputable advantages of the method, together with a good development of prices, makes it more and more available so for measuring, as for technological applications. The contribution gives potential spheres of the application of image analysis in classification of qualitative indicators in food production.

Potr. Vědy, *11*, 1993 (4) : 349-352

MONITOROVÁNÍ TEPLOTY MATERIÁLU BĚHEM MIKROVLNNÉHO OHŘEVU (problém a možné metody)

Jiřina HOUŠOVÁ, Petr TOPINKA

Výzkumný ústav potravinářský, Radiová 7, 102 03 Praha 10 - Hostivař

Časový vývoj teploty potraviny během jejího tepelného opracování má rozhodující význam pro kvalitu finálního výrobku, jeho hygienickou bezpečnost i ekonomii tepelného procesu. Sledování časového průběhu teploty opracovaného materiálu je proto zásadní problém i úloha v souvislosti s optimalizací a řízením tepelného procesu.

Při mikrovlnném (MV) ohřevu je úloha sledování vývoje teploty materiálu v průběhu jeho tepelné úpravy zejména důležitá vzhledem ke specifice MV ohřevu, především vysoké rychlosti a velké nerovnoměrnosti ohřevu. Je však současně velmi ztížená právě mikrovlnným prostředím. Elektrická složka vysokofrekvenčního elektromagnetického pole (MV pole) znemožňuje, příp. velmi ztěžuje použití klasických měřicích metod s kovovými elektricky vodivými senzory jako jsou termočlánky, odporové teploměry apod. Jejich použití vede k poruše elektromagnetického pole, a tedy k chybným údajům, ale může mít i závažnější důsledek - může vyvolat poruchu základní části MV zařízení, tj. magnetronu.

Problémy s nerovnoměrným ohřevem materiálů v MV zařízeních a v případě potravin následné možné problémy s kvalitou a hygienickou bezpečností výrobků, vedly k vývoji různých přímých či nepřímých metod, kterými se dá buď rovnoměrnost ohřevu v příslušných MV zařízeních ověřit, nebo lze na ni z výsledků testu usuzovat.

Mezi n e p ř í m é z p ů s o b y patří metody **mapující rovnoměrnost elektromagnetického (MV) pole** v dutině MV zařízení. Ta má prvotní vliv na průběh ohřevu a rozložení teplot v ohřívaném materiálu. Řada metod tohoto typu vychází ze změny barvy určitých látek při vzrůstu jejich teploty. Pro tento účel se používají např. tekuté krystaly či krystaly silikagelu, nanesené ve formě tenkého filmu na plochu police či talíře pro ukládání ohřívaných materiálů (O h l s s o n, 1981), lze použít i termografické barvy (K w a n - H o o n g N g, 1991).

Zmíněné nepřímé metody mapují (viziualizují) rozložení intenzity MV pole plošně (dvourozměrně) v prázdném či téměř prázdném zařízení. Jsou schopny v rovině, na kterou se ukládá potravina, detekovat tzv. „horká" či „studená" místa (tj. místa s maximální či minimální intenzitou elektrického pole). Mají však omezenou vypovídající schopnost pro předpověď rovnoměrnosti ohřevu při praktickém použití MV zařízení - tj. při ohřevu potraviny určitého objemu, tvaru a určitých dielektrických a tepelných vlastností. To vše specifickým způsobem distribuci MV pole v prázdném či téměř prázdném zařízení mění.

D a l š í m e t o d y testování **rovnoměrnosti MV ohřevu** jsou proto založeny na používání vzorků určitých materiálů - buď substituentů potravin, nebo přímo

potravin samotných. Z používaných **substituentů potravin** se používají především některé gely (např. agar, želatina - cukr), které mají podobné dielektrické vlastnosti jako potravinářské materiály a které lze snadno tvarovat do geometrických tvarů, podobných tvarům potravin (O h l s s o n, 1981). Např. testovací gel, vyvinutý pro tyto účely v SIK Göteborg, umožňuje sledovat rovnoměrnost jeho prohřívání vizuálně, a to v důsledku změny jeho barvy se vzrůstající teplotou.

Velmi používaným substituentem potravin při testování rovnoměrnosti MV ohřevu je voda. Řada metod doporučuje pro testování MV zařízení z pohledu rovnoměrnosti ohřevu ohřev vody v individuálních nádobách, různým způsobem rozmístěných na ploše pro ukládání ohřívané látky. Tento způsob testování doporučuje i mezinárodní norma pro zkoušení mikrovlnných zařízení (IEC 705, 1988). Voda je praktický, nekomplikovaný a levný materiál, nevyžaduje složitou přípravu vzorků, která může do výsledků vnášet chyby. Teplota v objemu vzorku se v důsledku konvekce rychle vyrovná, což je výhodné z hlediska přesnosti měření, ale je nevýhodou při detekci horkých a studených míst. Nevýhodou těchto metod jsou dosti odlišné dielektrické vlastnosti vody a normální potraviny, zejména nad teplotu 70 °C (O h l s s o n, B e n g t s s o n, 1975; K e n t, 1987).

Skutečné potraviny jako testovací materiály poskytují nejvěrohodnější informace o rovnoměrnosti jejich ohřevu v MV zařízeních. Nevýhodou je jejich cena i způsoby přípravy vzorků, negativně ovlivňující reprodukovatelnost výsledků.

Vzhledem ke zmíněným problémům při měření teploty materiálu během MV ohřevu klasickým způsobem, posuzuje se **distribuce teplot** ve vzorku potraviny či jejího substituentu ve většině případů **po MV ohřevu**, a to buď nepřímo (např. ze změny barvy nebo stupně vysušení apod.), nebo přímým měřením teplot termočlánky, termistory apod., příp. infračervenou termovizní kamerou (B u r f o o t et al., 1990; J a m e s, B u r f o o t, 1989; B a k a n o v s k i, Z o l l e r, 1984; O h l s s o n, 1981).

Jednou z mála možností, jak **sledovat vývoj teploty** v materiálu **během jeho MV ohřevu**, je unikátní **optický termometrický systém**. V současné době jsou k dispozici dva měřicí systémy tohoto druhu amerických firem LUXTRON a METRICOR. V prvním případě je pro měření teploty využito závislosti luminiscence materiálu na jeho teplotě, druhý systém pracuje s odrazem dopadajícího světla.

Klíčovou částí fluorooptického měřicího systému je teploměrné čidlo. U přístroje **LUXTRON 755** tvoří měřicí hrot malé množství teplotně citlivého materiálu, které je umístěno na konci optického vlákna. Světelný signál, vedený optickým vláknem, je pak zpracován optickými, analogovými a elektronickými obvody přístroje.

Citlivá vrstva čidla je vyrobena z manganem aktivovaného magnezitového fluorogermanátu. Pod vlivem modrofialového světla dochází k výraznému červenému fluorescenčnímu záření tohoto materiálu.

Světelný pulz je generován pomocí xenonové zábleskové lampy, která napájí současně čtyři optická čidla. Po odeznění světelného budícího pulzu intenzita fluorescenčního záření postupně klesá. Útlum tohoto poklesu je měřen a korelován se skutečnou teplotou čidla. Převodní tabulka je uložena v paměti přístroje. Údaje o teplotě se objevují jednak na čelní straně přístroje, jednak jsou k dispozici na vstupně-

výstupním portu RS-232-C, eventuálně může být přístroj dovybaven analogovým výstupem.

Oba systémy jsou poměrně drahé, jejich cena je však vyvážena unikátní možností získat aktuální časový průběh lokálních teplot přímo v průběhu jeho mikrovlnného opracování (Wickersheim, Sun, 1975; Cable, Saaski, 1990; George, 1991; Bows, 1990; Richardson, 1989). Z těchto důvodů jsou proto dnes používány většinou pracovišť, zabývajících se výzkumem či vývojem MV technologie, zejména pro zpracování potravin.

Výsledky získané měřicím systémem LUXTRON publikovali např. Bows, Richardson (1989), Bows (1989) a Sawyer (1985).

Fluoroptický měřicí systém LUXTRON 755 byl zakoupen a je v současné době instalován na našem pracovišti, kde lze získat další podrobnější informace i k případné spolupráci při jeho využití.

Možnost použití speciálně konstruovaných termočlánků, jako levnější metody pro přímé měření teplot materiálů během MV ohřevu, ověřovali např. van de Voort et al. (1987) – speciálně stíněné Cu - Ko termočlánky a Ohlson, Molina (cit. Richardson, 1991) – nekovové termočlánky na bázi uhlíku.

Pro tentýž účel byla ověřována i možnost měření teploty materiálu během MV ohřevu pomocí ultrazvuku, a to především pro průmyslové aplikace MV ohřevu. Základní informace o vyvinutém systému popisuje Richardson (1989).

Jak metoda speciálně upravených termočlánků, tak metoda využívající ultrazvuk byly dosud pouze laboratorně ověřovány. Speciální termočlánky v úpravě vyhovující mikrovlnnému prostředí nejsou dosud komerčně dostupné.

Použití termovizní kamery pro průběžné snímání teploty materiálu během MV ohřevu vyžaduje komplikovanou úpravu MV zařízení (průhledítko pro kameru) a metoda poskytuje informaci pouze o povrchové teplotě ohřívaného materiálu.

Literatura

BAKANOWSKI, S. M. - ZOLLER, J. M.: Endpoint temperature distribution in microwave and conventionally cooked pork. Food Technol., 1984 : 45-51.

BOWS, J. R.: Influence of the Thermal, Electrical and Physical Properties on the Quality of Food Heated by Microwaves. CFDRA, Techn. Memorandum No 527, 1989.

BOWS, J. R.: Domestic Oven Characterisation and its Relation to the Reheating Performance of Ready Meals. CFDRA, Techn. Memorandum No 564, 1990.

BOWS, J. R. - RICHARDSON, P. S.: Effect of Component Geometry and Packaging Material on Microwave Rehating of Frozen Three-component Meal. CFDRA, Techn. Memorandum No. 552, 1989.

BURFOOT, D. - JAMES, S. J. - FOSTER, A. M. et al: Temperature uniformity after reheating in domestic microwave ovens. In: FIELD, R. W. - HOWEL, J. A. (Eds.): Process Engineering in the Food Industry. England, Elsevier Appl. Sci. 1991.

CABLE, D. W. - SAASKI, E.: Fiberoptic pressure measurement of spontaneous bumping/splattering of foods during microwaving. Food Technol., *6*, 1990 : 120.

GEORGE, R. M.: Measuring the Themperature in a Microwave Oven. CFDRA, March 1991.

JAMES, S. J. - BURFOOT, D.: Microwave pasteurization of chilled convenience meals. Proc. Microwave Food - 89. London, June 26-27, 1989 .
KENT, M.: Electrical and Dielectric Properties of Food Materials. Sci. Technol. Publ. England, 1987.
KWANG-HOONG NG.: Microwave ovens: Mapping the electrical field distribution. Medical Labor. Sci., *48*, 1991 : 189-192.
OHLSSON, T.: Methods for measuring temperature distribution in microwave ovens. Microwave World, 1981 : 14-17.
OHLSSON, T. - BENGTSSON, N. E .: Dielectric food data for microwave sterilization processing. J. Microwave Power, *10*, 1975 : 93.
RICHARDSON, P. S.: Measuring the temperature in a microwave oven. Food Manufact., *64*,11989 : 43-46.
SAWYER, C.: Post-processing temperature rise in foods: Conventional hot air and microwave ovens. J. Food Protect., *48*, 1985 : 429-434.
VOORT, F. R. van de - LAUREANO, M. - SMITH, J. P.: A practical thermocouple for temperature measurement in microwave ovens. Can. Inst. Food Sci. Technol., *20*, 1987 : 279-284.
WICKERSHEIM, K. A. - SUN, MEI H.: Fiberoptic thermometry and its aplications. J. Microwave Power, 1975 : 85-93.
Methods for Measuring the Performance of Microwave Ovens for Household and Similar Purposes. CEI IEC 705, 2nd ed. Ženeva 1988.

The monitoring of time-temperature of materials during microwave heating (problems and posible methods)

The monitoring of time-temperature history during thermal processing of foods is necessary to optimize the process from product quality and process economy point of view. The temperature measurments during microwave heating is complicated by electrically hostile environment (microwave field). Several methods and procedures available for this problem are discussed including convential and new methods. Fibre-Optic Thermometry as one of new methods is mentioned and two systems - LUXTRON and METRICOR are described.

OBSAH – CONTENTS

Celba J.: 35 let trvání Výzkumného ústavu potravinářského v Praze 257

Beran M., Paulíček V.: Characterization of biological active Cr-Compounds from yeast product DIASTABIL – Izolace a identifikace biologicky aktivních Cr^{III+} sloučenin z kvasičného produktu DIASTABIL‰ 259

Fiedlerová V., Shultis K., Křišťan P.: Ascorbic acid stability in yoghurt – Stabilita kyseliny askorbové v jogurtu 265

Paulíček V., Beran M.: Flow-microcalorimetric determination of celloblase activity and its end inhibition by glucose – Mikrokalorimetrické stanovení celobiasové aktivity a její inhibice glukosou 275

Popadičová K., Bohačenko I.: Biologický test na kyselinu sorbovou a některé látkové složky limonád pomocí organismů *Lebistes reticulatus* a *Daphna magna* – Biological test for sorbic acid and same material components of soft drinks using the organisms *Lebistes reticulatus* and *Daphna magna* 281

Kmínková M., Prošková A., Kučera J.: Charakterizace sorbentů Ostsorb red a Ostsorb blue pro chromatografickou separaci bílkovin – Characterization of Ostsorb red and Ostsorb blue sorbents for protein chromatographic separation . . 291

Houška M., Rysová J., Kubešová A., Šrámek P.: Korelace senzorické a přístrojové viskozity tekutých potravin – The colerration between sensoric and instrumental viscosity of fluid food 299

Erban V., Gottwaldová M., Špicner J., Bohačenko I.: Citlivost kvasinkových kmenů sbírky RIFIS k nystatinu – Sensitivity of yeast strains of the RIFIS collection to nystatin 311

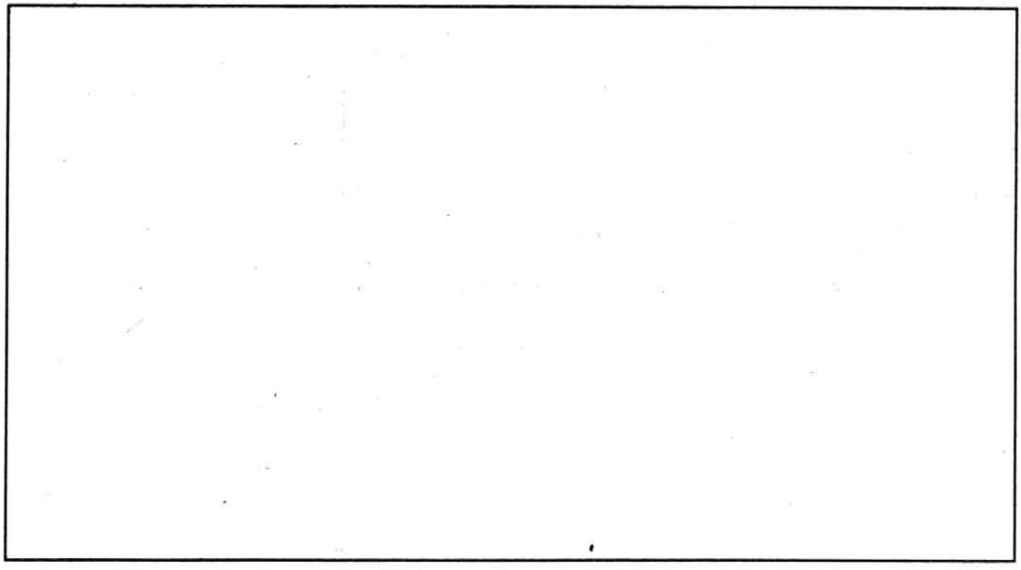
Houšová J., Kristová Š., Topinka P.: Mikrovlnný ohřev: porovnání rovnoměrnosti mikrovlnného pole ve třech typech mikrovlnných zařízení pro domácnosti – Microwave heating: A comparison of microwave field uniformity in the three household microwave ovens 323

Holasová M., Paříkzková H., Kopecký A., Blattná J., Winterová L., Mrázek M.: Stabilita nenasycených mastných kyselin řady n-3 při kulinární úpravě makrely – Stability of 3n-polyunsaturated fatty acids during culinary processing of mackerel 335

PŘEHLEDY – SURVEY

Nývlt V.: Obrazová analýza - perspektivní metoda pomáhající při klasifikaci kvality v potravinářství – Image analysis - prospective method assisting in the quality classification in food production 341

Houšová J., Topinka P.: Monitorování teploty materiálu během mikrovlnného ohřevu (problém a možné metody) – The monitoring of time-temperature of materials during microwave heating (problems and possible methods) . . . . . .



Vědecký časopis POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY ◆ Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied– Ústav zemědělských a potravinářských informací ◆ Vychází šestkrát ročně ◆ Redaktorka RNDr. Marcela Braunová ◆ Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 02/251 098 ◆ Sazba a tisk ÚZPI ◆ © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1993.

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, doručovatel tisku a Administrace centralizovaného tisku, Hvožďanská 5 - 7, 149 00 Praha 4.