

Chemie v tom není sama

Září je v českých zemích měsícem nástupu studentů do nového školního roku. Vybranou školu navštíví pan prezident, zviditelňuje se ministr školství, v denním tisku se objevují úvahy o počtech žáků a kvalitě vzdělávání, jeho nedostatcích, inovacích, perspektivách atd. Proč se tedy v této době nezamyslet i nad perspektivami vysokoškolského vzdělávání v chemii – již s ohledem na skutečnost, že v minulých číslech Chemických listů vyšly dva tematicky příbuzné příspěvky, z nichž první se zabýval současnou výukou chemie na základních a středních školách¹ a druhý představil různé pohledy na téma zda chemie na střední škole je „zpučná a nenáviděná“².

Žijeme v období informační společnosti. Je zřejmé, že informace mohou využívat k optimálnímu vedení výroby, výzkumu, vývoje či řízení společnosti pouze vzdělaní lidé a to nejen ekonomicky a právně, ale také technicky. Vzdělávání v technických disciplínách je pro nastupující generaci neatraktivní a Česká republika i celá Evropská unie se potýkají s narůstajícím nedostatkem kvalitních vysokoškolsky vzdělaných odborníků v technických a přírodovědných oborech. Chtěl bych v této souvislosti obrátit pozornost čtenáře na zajímavé studie, které jsou součástí realizace projektu Podpora technických a přírodovědných oborů řízeného MŠMT.

Ve studii Důvody nezájmu žáků o přírodovědné a technické obory³, která byla zpracována společností White Wolf Consulting jako součást analytické fáze projektu, byl hlavním výzkumným cílem popis faktorů působících na volbu oboru studia u žáků posledních ročníků ZŠ a třetích ročníků gymnázií. Na základě rozsáhlých dotazníkových šetření je ve zprávě formulováno několik zajímavých zjištění. Ukazuje se, že s přibývajícím rokem školní docházky se akcentuje odmítavý postoj (v dotaznících jako „velmi nerad“) k přírodním vědám. Středoškolští studenti tedy odmítají přírodovědné předměty více než žáci základních škol. Dále cituji: „Co se týče hodnocení dílčích přírodovědných předmětů, nejvíce odmítanou se stala fyzika, následována chemií a matematikou, tyto předměty odmítá přibližně třetina dotázaných. Opět platí, že tyto předměty jsou více odmítány středoškoláky, kdy největší rozdíl lze pozorovat u chemie (na základní škole je odmítána méně než pětina studentů), zatímco na škole střední ji odmítala téměř polovina studentů), pak u fyziky.“ Alarmující je nepříznivý trend času – hodnocení se pro přírodní vědy vyvíjí k horšímu mezi jednotlivými sociologickými šetřeními (1995–2007). Zajímavý je opačný trend u ekologie, kdy její obliba vzrůstá s narůstající délkou školní docházky – na základní škole je její odmítání srovnatelné s matematikou.

Ve zprávě se dále uvádí, že v porovnání vědomostí českých žáků s mezinárodní konkurencí dosáhli naši žáci vynikajících výsledků, statisticky významně lepší byli žáci pouze dvou zúčastněných zemí. Naopak se svými znalostmi postupů a metod využívaných v přírodních vědách jsou

naši žáci jen průměrní. Rozdíl mezi přírodovědnými vědomostmi českých žáků a jejich znalostmi postupů a metod je největší v zemích OECD. Ukazuje se zajímavý paradox, že čeští žáci bodují v testech přírodovědných znalostí poměrně dobře, nicméně tyto předměty je nebaví, nemají je rádi. Autoři zprávy usuzují, že je možné, že právě z vysokých nároků a značného množství požadovaných znalostí pramení ony negativní postoje žáků a studentů. Ve vztahu k přírodovědným předmětům pak lze pozorovat jistou ambivalentnost přístupu studentů k nim – na jedné straně jsou považovány za zajímavé a pro další život užitečné, na straně druhé jsou tyto předměty hodnoceny jako obtížné, které proto studenti ve srovnání s jinými předměty nemají příliš rádi.

Jak čelit těmto nepříznivým trendům s pomocí zahraničních zkušeností uvádí materiál s názvem Studie zahraničních zkušeností s podporou zájmu o technické a přírodovědné obory zpracovaný Akademickým centrem studentských aktivit, který lze nalézt na téže webové stránce⁴. Jedná se o velmi rozsáhlou studii mapující zkušenosti z mnoha zemí světa a obsahující velké množství inspirací. Nicméně i z této studie je zřejmé (při podrobnějším průzkumu webových stránek, na které se studie ve většině případů odkazuje), že zainteresované státní instituce a univerzity se snaží podchycovat zájem dětí v čím dál tím nižším věku. Stále častěji jsou k tomu využívány sociální sítě (uspokojující přirozenou tendenci dětí sdružovat se do skupin se společným zájmem) a jsou vytvářeny atraktivní portály otevřené hravosti dětí s nenásilnými formami sdělování technických poznatků. Tak např. velmi pěkný portál <http://www.planet-science.com>, který přináší řadu inspirací a zajímavostí, je dělen do sekcí pro učitele, rodiče, starší děti a obsahuje i sekci pro děti mladší než 11 let. Jeden z mých kolegů se proto domnívá, že se ještě dožije toho, že bude získávat budoucí studenty chemie programem koncipovaným pro mateřskou školu. Možná, že ta doba není ani tak vzdálená – při letošní pražské Bambiriádě se VŠCHT Praha prezentovala vlastním stanem, kde mohly jednoduché experimenty provádět děti vlastně všech věkových kategorií.

Naše technické a přírodovědné vysoké školství má před sebou nelehkou etapu. Na vysoké školy jako takové nastupuje již více než 60 % populačního ročníku a brzy lze očekávat situaci, že míst na vysokých školách bude víc než čerstvých maturantů⁵. Je to mj. proto, že od roku 1999 v Česku vzniklo 47 soukromých vysokých škol a univerzit a v posledních dvou letech soukromých vysokých škol přibývá průměrným tempem jedna za každé čtyři měsíce⁶. Připočteme-li k tomu stávajících 26 veřejných vysokých škol, dostaneme se k číslu 73 (pro srovnání – ve Velké Británii s populací více než 60 milionů obyvatel bylo v roce 2009 celkem 130 vysokých škol a také ve srovnání s Holandskem máme vysokých škol na obyvatele přibližně třikrát více⁷). V roce 1989 v Čechách a na Moravě úspěš-

ně dokončilo vysokou školu 18 580 studentů, v roce 2008 to již bylo přes 71 tisíc (cit.⁸). Při tak „lukrativní nabídce“ počtu míst volí převaha studentů pohodlnější cestu k vysokoškolskému diplomu – bez matematiky, fyziky a chemie. Postupně se tak stává významným problémem nedostatek absolventů technických oborů. Existují odhady, že např. v energetice bude České republice v blízké budoucnosti chybět 12 až 15 tisíc odborníků. V této situaci je zřejmé, že technické obory budou muset bojovat o každého studenta a stát by měl pro tyto obory možná uplatňovat školné se záporným znaménkem....

Pavel Chuchvalec

LITERATURA

1. Čtrnáctová H., Zajíček J.: Chem.listy 104, 811 (2010).
2. Wichterle K., Čtrnáctová H., Kratochvíl B., Čech J.: Chem. listy 104, 753 (2010).
3. http://ipn.msmt.cz/data/uploads/projekt_1/Důvody%20nezájmu%20žáků%20o%20PTO.pdf staženo dne 14.6.2010
4. http://ipn.msmt.cz/data/uploads/projekt_1/Studie%20zahranických%20zkušeností.pdf, staženo dne 18.6.2010
5. Lidové noviny: Studentů VŠ už nemůže dál přibývat, Akademie 8.6.2010
6. <http://domaci.ihned.cz/c1-44301340-studentu-je-prilis-vysoke-skoly-dostanou-na-vyuku-mene-penez> , staženo dne 17.6.2010
7. <http://www.ct24.cz/domaci/statni-maturity/86620-techniku-cesi-studovat-nehteji-prevalcují-nas-asiati/>, staženo dne 25.6.2010
8. <http://www.profit.cz/clanek/chysta-se-bitva-o-maturanty.aspx>, staženo dne 17.6.2010.

KOKRYSTALY A JEJICH OČEKÁVANÉ FARMACEUTICKÉ APLIKACE

BOHUMIL KRATOCHVÍL

*Ústav chemie pevných látek, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
bohumi.kratochvil@vscht.cz*

Došlo 18.3.10, přijato 29.4.10.

Klíčová slova: kokkrystaly, multikomponentní sloučeniny, farmaceutický kokkrystal, supramolekulární synthony, syntéza kokkrystalů, fyzikální vlastnosti kokkrystalů

Obsah

1. Úvod
2. Proč jsou kokkrystaly zajímavé pro farmacii ?
 - 2.1. Kokkrystaly itakonazolu s 1,4-dikarboxylovými kyselinami
 - 2.2. Kokkrystal karbamazepin : sacharin (1:1)
 - 2.3. Kokkrystal (S)-pregabalin : (S)-mandlová kyselina (1:1)
 - 2.4. Kokkrystaly paracetamolu
3. Jak drží kokkrystaly pohromadě
4. Systematika kokkrystalů
 - 4.1. Hranice mezi solí a kokkrystalem
5. Syntéza kokkrystalů
6. Fyzikální vlastnosti kokkrystalů
 - 6.1. Fyzikální stabilita kokkrystalů – polymorfismus
7. Závěr

1. Úvod

Přiléhavý pojem kokkrystal byl poprvé použit v roce 1963 Hoogsteenem¹ pro označení produktu kokkrystalizace mezi 1-methylthyminem a 9-methyladeninem. Při kokkrystalizaci nekkrystalizují ze směsi čisté složky, ale jejich spojením vzniká nová kvalita – kokkrystal. Jednoznačně předpovědět², za jakých podmínek ze směsi vykkrystalují čisté složky a za jakých jejich kokkrystal, není v současnosti možné, protože neumíme dokonale řídit krystalizační proces, predikovat krystalové struktury a ani neznáme do všech detailů povahu slabých interakcí.

Kokkrystaly nejsou žádnou novinkou, ale dalším pojmenováním multikomponentních sloučenin, pro které v literatuře již existují různé názvy: směsné krystaly, adiční sloučeniny, organické molekulární sloučeniny, molekulární komplexy, heteromolekulární krystaly, klathráty, interkaláty, supramolekulární adukty atd. Kokkrystaly jsou

však v posledních deseti letech intenzivně studovány především pro svoje očekávané aplikace ve farmacii, což vedlo k vytvoření termínu farmaceutický kokkrystal^{3,4}. Kokkrystaly však nalézají uplatnění i v jiných oborech, např. v nelineární optice aj. Lze proto konstatovat, že pojem kokkrystal dnes mezi multikomponentními sloučeninami jednoznačně dominuje.

Farmaceutický kokkrystal je nejčastěji definován podle Aakeröye a Salmona⁵ tak, že se jedná o stechiometrický multikomponentní krystal, vytvořený ze dvou a více molekulárních nebo iontových sloučenin, které jsou v čistém stavu a za pokojové teploty pevné. Definice termínu farmaceutický kokkrystal není jednoduchá a stále je předmětem diskuse⁶. To proto, že se jednoznačně nedaří kokkrystaly vymezit vůči farmaceutickým solím, což jsou také multikomponentní sloučeniny, ale mezi farmaceutické kokkrystaly se nepočítají.

Farmaceutický kokkrystal je sloučenina typu hostitel : host, kde v pozici hostitele figuruje farmaceutická aktivní molekula, zatímco v pozici hosta kokkrystalizační partner. Kokkrystalizační partner je zpravidla neaktivní molekula, ovšem výjimečně se může jednat i o aktivní substanci, např. kokkrystal theofylin : nikotinamid (1:1). Stechiometrický poměr hostitel : host je většinou jednoduchý (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, resp. 1:2 atd.).

V obrovském množství možných kokkrystalizačních kombinací musí kokkrystalizační partner ve farmaceutickém kokkrystalu navíc splňovat kritérium FDA GRAS (Generally Recognized as Safe)⁷ neboli podmínku farmaceutické akceptovatelnosti. Tomuto americkému kritériu vyhovuje okolo 50 kokkrystalizačních partnerů, které lze rozdělit do tří hlavních skupin: kyseliny (např. adipová, benzoová, citronová, fumarová, glutarová, jantarová, kaprinová, kaprylová, maleinová, malonová, suberová aj.), amidy (např. nikotinamid, sacharin, močovina aj.) a alkoholy (např. manitol, sorbitol, xylitol aj.). Farmaceutické kokkrystaly jsou většinou binární sloučeniny, ovšem obecné kokkrystaly mohou být tvořeny i více složkami, např. ternární a kvaternární kokkrystaly připravené syntézou cyklohexantrikarboxylové kyseliny s různými deriváty bipyridinu⁸.

Ačkoliv na trhu zatím neexistuje lék formulovaný z kokkrystalu, farmaceutické kokkrystaly se intenzivně zkoumají jak na akademických pracovištích, tak na pracovištích R&D farmaceutických firem, protože se předpokládá jejich razantní nástup ve farmaceutických formulacích v blízké budoucnosti.

2. Proč jsou kokkrystaly zajímavé pro farmacii ?

Při výzkumu a vývoji API (Active Pharmaceutical Ingredient = léčivá látka = léčivo) postupně přichází dvě rozhodovací fáze. Nejdříve se hledá (v anglické terminolo-

gii) „lead structure“ a potom „drug candidate“⁹. Při vyhledávání a syntéze optimální molekuly léčiva, které vychází z prvotní aktivní molekuly (lead structure), se neřeší problematika pevné fáze (především polymorfismus), protože syntetizovaných molekul je velmi mnoho a testují se především v systémech *in vitro*. V momentě, kdy je vybrána nejslibnější molekula (drug candidate) se výběr její optimální pevné formy stává důležitým ve vztahu k vývoji finálního léčivého přípravku.

Současný farmaceutický průmysl produkuje především pevné léčivé přípravky, které tvoří asi 80 % celkového portfolia. Největším problémem nově vyvinutých aktivních molekul však je, že jsou v pevném stavu často velmi málo rozpustné ve vodě a tím i v zažívacím traktu. Výběr optimální API neznámá pouze maximálně rozpustnou látku. S rostoucí rozpustností látky stoupá její difuzibilita a klesá stabilita. Látka se v organismu snadno difunduje a penetruje biologickými membránami. Násled-

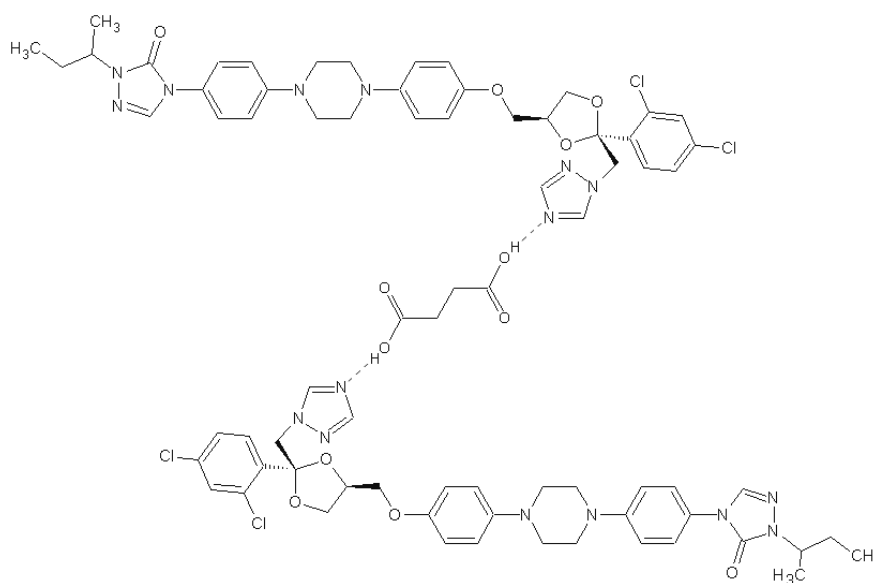
kem toho je méně specifická co do místa účinku a rychleji se vylučuje z těla.

Pro výběr optimálně rozpustné API může být od jedné molekuly k dispozici až několik desítek jejích pevných forem. Příkladem je atorvastatin vápenatý (statinové hypolipidemikum), pro který je patentováno více než 60 pevných forem¹⁰ nebo sulfathiazol (sulfonamidové bakterio-
statikum), u kterého je popsáno více než 100 pevných forem¹¹. Zahnutím kokrystalů se tento počet ještě zvýší, protože kokrystalizační potenciál některých molekul je vysoký, např. u piroxikamu (oxikamové nesteroidní antiflogistikum) bylo syntetizováno okolo 50 jeho farmaceutických kokrystalů¹². Přehled možných chemických a fyzikálních typů farmaceutických pevných forem (API) uvádí tab. I.

Proč jsou tedy pro farmacii kokrystaly zajímavé? Volba optimální API pro určitou pevnou lékovou formulaci znamená optimalizaci jejích vlastností. Kromě opti-

Tabulka I
Chemické a fyzikální typy farmaceutických pevných forem (API)

Krystalické formy (všechny jsou potenciálně polymorfni)	Semikrystalické formy	Amorfní formy
Anhydráty <i>Multikomponentní fáze:</i> Hydráty (výjimečně ethanol solváty) Soli Kokrystaly Glykosylované deriváty	Semikrystalické fáze	Amorfní fáze Amorfní hydráty



Obr. 1. Sendvičová struktura kokrystalu itrakonazol : jantarová k. (2:1)

Tabulka II
Nejdůležitější parametry pro výběr optimální API

Funkční a technologický parametr

Rozpustnost, rozpouštěcí rychlost (disoluční profil)^a
 Hygroskopicita (hygroskopičnost)
 Krystalická (tvar krystalů) nebo amorfni fáze
 Chemická čistota (zahrnující chirální čistotu) a fyzikální čistota (polymorfismus)
 Chemická a fyzikální stabilita
 Toxicita
 Tekutost prášku
 "Lepivost" (statický náboj)
 Porozita
 Filtrovatelnost
 Zpracovatelnost, homogenizovatelnost, robustnost a reprodukovatelnost výroby
 Odolnost vůči mechanickému stresu
 Chuťová přijatelnost
 Nesmí korodovat tabletovačku
 Patentová nekoliznost (pro generické firmy)

^a Rozpustnost se měří v nasyceném roztoku po jeho separaci, který se ustaví mícháním nad pevnou fází, zpravidla po 24 h. V literatuře často nacházíme rozptýl hodnot rozpustnosti pro jednu API z důvodu řady definic (angl. solubility, biological solubility, native solubility, water solubility, equilibrium solubility, intrinsic solubility atd.) a nerespektování všech parametrů, které ji ovlivňují (teplota, tlak, pH, velikost částic, rozpouštědlo atd.). Pro farmacii má větší význam rozpouštěcí rychlost (disoluční profil), tj. závislost rozpustnosti na čase

mální rozpustnosti se dále jedná o optimální rozpouštěcí rychlost (disoluční profil), tzn. parametry, které úzce souvisí s orální biodostupostí léčiva. Kromě toho však existuje celá řada dalších vlastností API, které ovlivňují její funkční a technologické parametry a patentovou nekoliznost (tab. II). Kokrystaly nejsou farmakodynamicky lepší než ostatní pevné formy aktivní molekuly, ale jejich zahrnutím se výrazně zvyšuje počet pevných forem, ze kterých lze vybrat farmakokineticky a technologicky optimální API.

Následující čtyři případové studie demonstrují kokrystaly, jejichž vlastnosti jsou buď lepší nebo alternativní k API v používaných lékových formulacích.

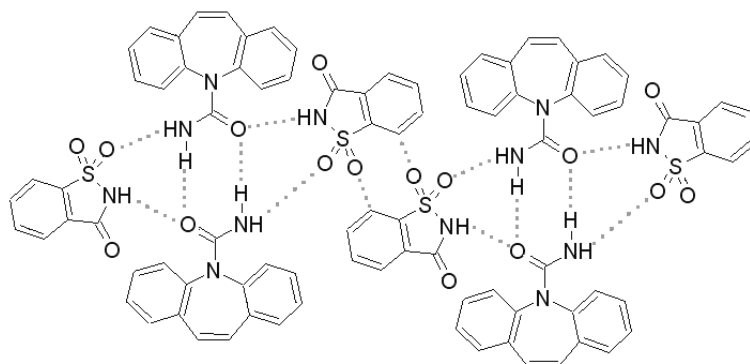
2.1. Kokrystaly itraconazolu s 1,4-dikarboxylovými kyselinami

Itrakonazol, léková forma Sporanox (Salutas Pharma), je protiplísňové orální léčivo. Vyskytuje se buď v krystalické nebo amorfni fázi, přičemž léková forma je formulována z amorfni fáze. To proto, že krystalická fáze má jen nepatrnou rozpustnost ($< 1 \mu\text{g ml}^{-1}$), zatímco amorfni fáze je asi 20× rozpustnější (v 0,1 N-HCl při 25 °C)¹³. Kokrystalizací itraconazolu s 1,4-dikarboxylovými kyselinami (L-jablečnou, L-vinnou a jantarovou) se vytváří H-vazby mezi dvěma molekulami itraconazolu a jednou molekulou kyseliny a vznikají příslušné kokrystaly

(itraconazol : L-jablečná k. (2:1), itraconazol : L-vinná k. (2:1), itraconazol : jantarová k. (2:1))¹⁴. Tyto kokrystaly mají rozpustnosti v intervalu mezi krystalickou a amorfni fází itraconazolu a tak umožňují modifikaci rozpustnosti a disolučního profilu pevného léčiva. Na obr. 1 je pro ilustraci uvedena sendvičová struktura kokrystalu itraconazol : jantarová k. (2:1).

2.2. Kokrystal karbamazepin : sacharin (1:1)

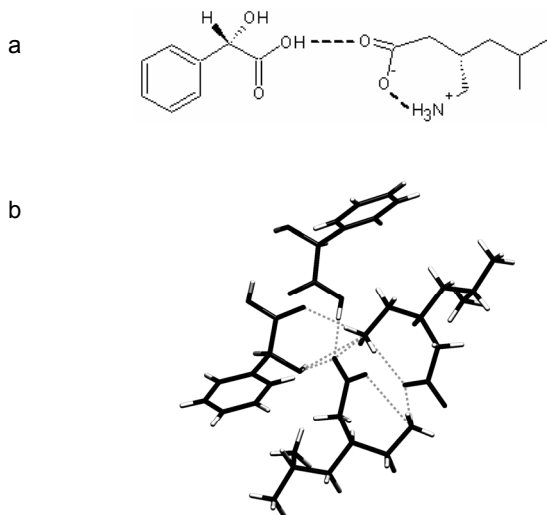
Jednou z nejvíce studovaných farmaceutických molekul je karbamazepin, právě z hlediska svého kokrystalizačního potenciálu. Léková forma Tegretol (Novartis) obsahuje krystalickou fází karbamazepinu a používá se k léčbě epilepsie. Z hlediska formulace z pevné fáze má karbamazepin nepříznivé vlastnosti, a sice: tvoří 4 polymorfy, je náchylný k tvorbě různých solvátů a hydrátů, přičemž většinou se jedná o špatně rozpustné formy. Karbamazepin neobsahuje ionizovatelné skupiny, a proto jen velmi obtížně tvoří soli. S různými kokrystalizačními partnery však vytváří okolo 50 farmaceutických kokrystalů³⁴, které jsou daleko rozpustnější než samotný karbamazepin. Velmi nadějný kokrystal karbamazepin : sacharin (1:1) byl srovnáván s formulovaným karbamazepinem, polymorfem III. Ukázalo se, že zmíněný kokrystal (obr. 2) je fyzikálně stabilnější a navíc nejsou žádné jeho solváty¹⁵.



Obr. 2. Systém H-vazeb v kokryystalu karbamazepin : sacharin (1:1)

2.3. Kokryystal (*S*)-pregabalin : (*S*)-mandlová kyselina (1:1)

Pregabalin, léková forma Lyrica (Pfizer), patří jako karbamazepin do skupiny antikonvulsantů (léčba epileptických záchvatů). Molekula pregabalínu je chirální a pro farmaceutickou aplikaci se používá (*S*)-isomer. Ukázalo se, že kokrystalizací s (*S*)-mandlovou kyselinou lze z racemické směsi separovat pouze (*S*)-pregabalin. Na obr. 3 je znázorněn kokryystal (*S*)-pregabalin : (*S*)-mandlová k. (1:1)¹⁶. Tuto technologii chirální separace kokrystalizací používá firma Pfizer.



Obr. 3. Kokryystal (*S*)-pregabalin : (*S*)-mandlová kyselina (1:1). H-vazby mezi oběma molekulami (a) a nekonečný řetězec, ve kterém se střídají vždy dvě molekuly pregabalínu a dvě molekuly mandlové kyseliny (b)

2.4. Kokrystaly paracetamolu

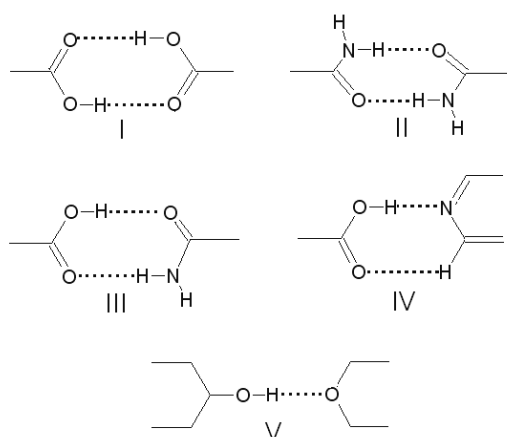
Pro formulace paracetamolu se používá stabilní polymorf I, např. Panadol (GlaxoSmithKline) nebo Paralen (Zentiva). Ukázalo se však, že kokrystaly paracetamol : theofylin (1:1), paracetamol : šťavelová k. (1:1) a paracetamol : fenantrolin (1:2) vykazují vesměs lepší pevnosti tablet¹⁷ než samotný paracetamol (polymorf I).

3. Jak drží kokrystaly pohromadě

Vazba v kokryystalu mezi hostitelem (aktivní molekula) a hostem (kokrystalizační partner) je nekovalentní slabá interakce (většinou H-můstky) a vzniklé útvary se v krystalu dále spojují především π - π interakcemi nebo VdW silami. Důležité je, že obě molekuly (hostitel a host) si v kokryystalu podrží svoji kovalentní integritu. To má velký význam při průchodu zažívacím traktem, kde dochází k postupnému rozpuštění farmaceutického kokryystalu na jeho složky.

Tvorba kokryсталů je aplikací krystalového inženýrství na supramolekulární systémy. Přístup ze zdola nahoru (bottom up) vyžaduje aplikaci strategie supramolekulárních synthonů¹⁸. Elementární funkční skupiny, např. karboxyl, hydroxyl, *N*-heterocykly, amidy, ale i S=O, P=O a další, disponují protonovými donory a akceptory, a proto mezi sebou tvoří H-můstky. Pokud se H-můstek vytvoří mezi dvěma stejnými skupinami, nazýváme tento útvar homosynthonem, pokud jde o dvě různé funkční skupiny, hovoříme o heterosynthonu. Inspekci v Cambridgeské strukturální databázi (CSD) bylo zjištěno, že existuje více než 120 různých homo- a heterosynthonů. Energeticky výhodnější jsou zřejmě heterosynthony, ale kompetici různých synthonů při tvorbě kokryystalu je obtížné předpovědět. Obr. 4 uvádí nejdůležitější synthony.

Přístup ze zdola nahoru dobře ilustruje vliv kokrystalizačního partnera (různé deriváty melaminu) na výsledný



Obr. 4. Nejčastější supramolekulární synthony v kokrystalech. Homosynthony (I, II) a heterosynthony (III, IV a V)

design kokrystalu s barbitalem. Kokrystalizací barbitalu s 2-amino-4,6-bis(*tert*-butylamino)-1,3,5-triazinem vzniká nekonečný zvlněný řetězec, zatímco při kokrystalizaci barbitalu s *N,N'*-bis(4-*tert*-butylfenyl)melaminem je strukturálním motivem cyklický trimer³. Dalším zajímavým příkladem je kokrystalizace kofeinu nebo theofylinu se šťavelovou kyselinou. Zatímco kofein má na jednom dusíku v pětičlenném cyklu navázán methyl, theofylin má v této pozici vodík. Methyl blokuje schopnost kofeinu vytvářet v této pozici H-můstky. To se projeví v rozdílném designu výsledných kokrystalů. Strukturálním motivem kokrystalu kofein : šťavelová k. (2:1) je izolovaný útvar a strukturálním motivem kokrystalu theofylin : šťavelová k. (2:1) je nekonečný řetězec³.

Různá krystalová uspořádání se samozřejmě projeví i různými vlastnostmi pevné fáze a obráceně, vlastnosti pevné fáze lze řídit volbou krystalového designu.

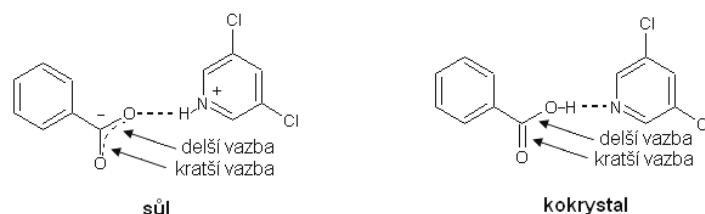
4. Systematika kokrystalů

Z hlediska systematiky kokrystalu tvoří jednotlivý blok, ale rozeznáváme několik typů:

- „prosté“ kokrystalu (binární, ternární, kvaternární a zřejmě i vyšší)⁸,
 - solvatované (hydratované) kokrystalu, např. kokrystal norfloxacin : isonikotinamid : chloroform (1:1:1)¹⁹,
 - kokrystalu ionizované (kokrystalu soli), např. kokrystal fluoxetin hydrochlorid : fumarová kyselina (2:1)²⁰,
 - kokrystalu soli solvatované (hydratované), např. kokrystal zolpidem hydrogentarát : zolpidem báze bis-methanol solvát (1:1:2)²¹,
 - polymorfy všech předchozích typů kokrystalů, např. dimorfní kokrystal kofein : glutarová kyselina (1:1)²².
- Fundamentální důvod, proč molekuly tvoří kokrystalu, sice známe ($\Delta G \rightarrow \min.$), ale neznáme detaily. Je pravda, že některé molekuly k tomu mají velký sklon a byly systematicky a dlouho studovány (piroxikam, karbamazepin, theofylin, kofein, norfloxacin, piracetam, barbital ad.). V literatuře se objevují empirické studie, které tendenci tvořit kokrystalu korelují např. s počtem molekul v asymetrické části elementární buňky²³. Nejdůležitější metodou stále zůstává experimentální kokrystalizační screening, který je založen na různých metodách syntézy kokrystalů. Dále se ukazuje, že např. polymorfni molekuly většinou tvoří i polymorfni kokrystalu, hydratované molekuly tvoří i hydratované kokrystalu apod.

4.1. Hranice mezi soli a kokrystalem

Diskuse týkající se přesné definice pojmu kokrystal (kap. 1), se promítají do neostře hranice mezi kokrystalu a solemi^{24,25}. Celý problém lze demonstrovat na reakci mezi karboxylovou kyselinou a bazickým *N*-heterocyklem, např. benzoovou kyselinou a 3,5-dichlorpyridinem. Je produktem této reakce sůl (3,5-dichlorpyridinium benzoát) nebo kokrystal (3,5-dichlorpyridin : benzoová kyselina (1:1))? Klíčem k řešení tohoto problému je experimentální určení pozice protonu mezi kyselinou a bází, tzn. mezi atomy – O...H...N – vytvářejícími H-můstek (obr. 5). Pokud proton zůstane blíže atomu kyslíku, je produktem reakce kokrystal, pokud se přesune blíže k dusíku, je produktem sůl. Samozřejmě se nabízí otázka, jak nazvat produkt, když proton zůstane zhruba uprostřed, tzn. že je společně sdílen kyslíkem i dusíkem (vzdálenost protonu od obou atomů je okolo 1,25 Å). V tomto případě nelze roz-



Obr. 5. Rozdíl mezi soli (3,5-dichlorpyridinium benzoát) a kokrystalem (3,5-dichlorpyridin : benzoová kyselina (1:1))

hodnout a tento stav se označuje jako kontinuum sůl – kokryystal²⁴.

Ke stanovení pozice protonu se nejčastěji používá NMR spektroskopie v pevné fázi, neutronová difrakce a RTG difrakce. NMR v pevné fázi a neutronová difrakce však nejsou běžné laboratorní techniky. RTG difrakce je běžnější, ale ta stanoví pozici protonu nepřímo z vazebných délek a úhlů nevodíkových atomů. Pro sůl platí tato kritéria: C-O(delší) – C-O(kratší) < 0,03 Å ; C-O (delší)/C-O(kratší) = 1,027(15) ; C-N-C > 120° a pro kokryystal: C-O(delší) – C-O(kratší) > 0,08 Å ; C-O(delší)/C-O(kratší) = 1,081(12) ; C-N-C = 117,7–118,5°.

Tato kritéria nemají ovšem charakter normy závazné pro farmaceutické společnosti, protože jinak by se musely některé farmaceutické soli překvalifikovat na farmaceutické kokrystaly. To by se samozřejmě odrazilo i v patentových sporech.

Pozice protonu mezi kyselinou a bází je ovšem velmi citlivý parametr, který ovlivňuje řada faktorů. Např. různý poměr mezi pyridinem a 3,5-dinitrobenzoovou kyselinou vede v případě stechiometrie (1:2) ke kokryystalu a v případě (1:1) k soli monohydrátu²⁶. Zvýšená teplota posouvá proton od dusíku blíže ke kyslíku, jak bylo zjištěno strukturálním studiem kokryystalu pentachlorofenol : 4-methylpyridin (délka vazby O-H = 1,309 Å při 20 K a 1,228 Å při 200 K; délka vazby H-N = 1,206 Å při 20 K a 1,306 Å při 200 K)²⁷. Pozici protonu ovlivňuje také zvolené rozpouštědlo, jak bylo zjištěno ve fluoridových komplexech²⁸.

Vznik kokryystalu nebo soli lze do určité míry predikovat na základě difference $\Delta pK_a = pK_a(\text{báze}) - pK_a(\text{kyselina})$ výchozích složek²⁴. Pro tento účel je nejlepší software společnosti ACD²⁹, kterým lze počítat hodnoty pK_a pro jednotlivé kyselé nebo zásadité skupiny v molekule. Pokud je hodnota difference $\Delta pK_a = pK_a(\text{báze}) - pK_a(\text{kyselina}) > 3$, pak vzniká sůl, pokud je ΔpK_a

= $pK_a(\text{báze}) - pK_a(\text{kyselina}) < 0$, pak vzniká kokryystal. Při hodnotách $\Delta pK_a = pK_a(\text{báze}) - pK_a(\text{kyselina}) = 0-3$ je proton sdílen kyselinou i bází a hovoříme o kontinuu sůl-kokryystal.

Kritérium predikce založené pouze na hodnotě difference ΔpK_a je ovšem příliš tvrdé a ne vždy fungující. Je důležité si uvědomit, že je aplikovatelné pouze na jednu třídu sloučenin, nelze např. srovnávat kokrystalizační potenciál fenolu s thiofenolem. Thiofenol je kyslejší, ale fenol je lepší protonový donor³⁰.

5. Syntéza kokrytalů

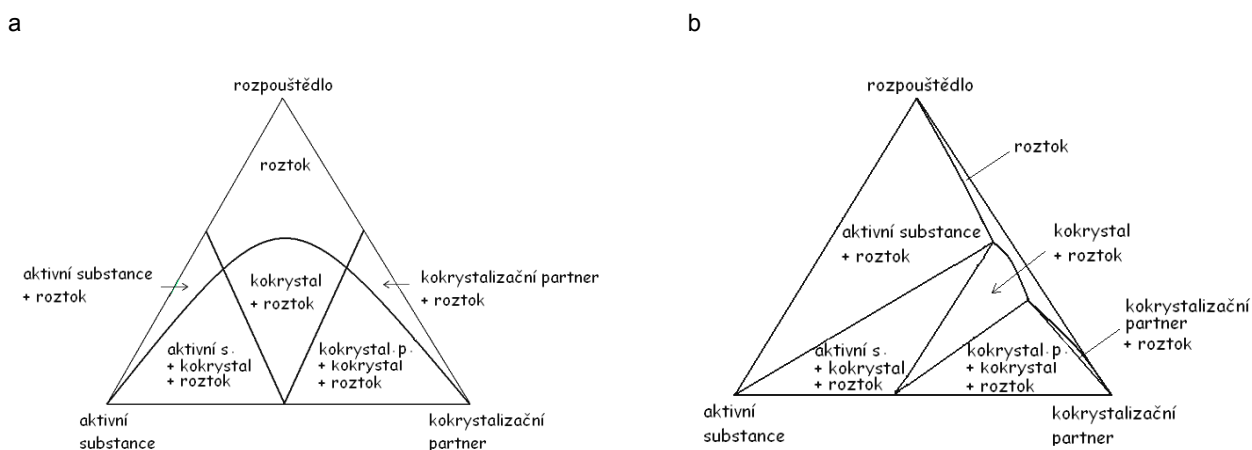
Kokrystaly nevznikají chemickými reakcemi, při nichž se tvoří nové kovalentní nebo iontové vazby (soli), ale fyzikálními pochody. Syntéza kokrytalů nevyžaduje přítomnost ionizovatelných skupin v molekule (předpoklad vzniku soli), ale je podmíněna schopností molekul vytvářet s partnery slabé mezimolekulární interakce (především H-vazby).

Kokrystaly lze syntetizovat několika důležitými způsoby:

- společná krystalizace (kokrystalizace) složek z roztoku,
- společné mletí (mechanochemická syntéza),
- společná sublimace,
- společné zahřívání, příp. tavení.

Kokrystalizace z roztoku je nejpoužívanější a nejstarší metodou. Základním předpokladem je přibližně stejná rozpustnost složek ve zvoleném rozpouštědle, tzn. symetrický fázový diagram (obr. 6a). To, že systém dá přednost vzniku kokryystalu před krystalizací jednotlivých složek se často projevuje rychlou krystalizací nebo vznikem velkých krystalů³¹.

Společné mletí je procesem v pevné fázi



Obr. 6. **Fázový diagram kokrystalizace.** Aktivní substance a kokrystalizační partner jsou v daném rozpouštědle stejně rozpustné (a), aktivní substance a kokrystalizační partner nejsou v daném rozpouštědle stejně rozpustné (b)

s teoretickým 100% výtěžkem bez vedlejších produktů, pokud je poměr výchozích složek stejný jako jejich výsledná stechiometrie v kokryystalu. Někdy se však může stát, že konverze na kokryystal neproběhne úplně a produkt je znečištěn nezreagovanými výchozími složkami.

Společné mletí je k dispozici tehdy, pokud krystalizace z roztoku nepřipadá v úvahu pro výrazný rozdíl v rozpustnosti složek, tzn. nesymetrický fázový diagram (obr. 6b). Společné mletí lze ovšem použít i jako alternativu ke krystalizaci z roztoku při symetrickém fázovém diagramu. Obecně se však produkty společné krystalizace a společného mletí mohou lišit.

Častými variantami jsou kryomletí (např. mletí v kapalném dusíku pro potlačení degradačních reakcí), mletí pevné složky v kapalně složce nebo mletí za přítomnosti tzv. molekulárního maziva. Např. při kokrytalizaci kofeinu s octovou kyselinou vznikne kokrytal kofein : octová k. (1:1), zatímco při mletí kofeinu v octové kyselině vznikne kokrytal kofein : octová k. (1:2)³². Molekulárním mazivem je míněno přikápnutí malého množství např. methanolu, chloroformu nebo cyklohexanu k mletým pevným fázím. Účinek se projeví zrychlením reakční kinetiky nebo změnou reakčního mechanismu. Např. při společném mletí cyklohexantrikarboxylové kyseliny s bipyridinem dojde za 1 h teprve k částečné konverzi na kokrytal (1:1), zatímco přidáním několika ml methanolu proběhne kompletní konverze do 20 min (cit.³³). Pokud je ke směsi kofeinu a glutarové kyseliny při společném mletí přikapáván cyklohexan, tak vznikne kokrytal kofein : glutarová k. (1:1), polymorf I, když je přikapáván chloroform, tak vznikne od stejného produktu polymorf II²².

Metoda společného tavení znamená např. rozpouštění pevné aktivní substance v nadbytku taveniny kokrytalizačního partnera. Při tomto postupu se častokrát nedaří dodržet stechiometrii výchozích složek, takže identifikace produktu se provede IČ spektroskopii, která indikuje přítomnost pásů vibračních vazeb typu OH...N, NH...O, OH...O atd.

6. Fyzikální vlastnosti kokrytalů

Je dlouho a dobře známo, že pevné látky odvozuji svoje vlastnosti od vnitřní struktury a naopak změnou vnitřní struktury se tyto vlastnosti změní. Kokrytalizací se změní vnitřní struktura pevné látky a tudíž i její vlastnosti (viz tab. II).

Vlastnosti kokrytalů jsou v literatuře korelovány s fyzikálními parametry pevné fáze a hledají se souvislosti. Ve studii Schultheisse a spol.³⁴ jsou korelovány body tání farmaceutických kokrytalů s jejich rozpustností, resp. logaritmem rozpustnosti. V souboru 50 farmaceutických kokrytalů bylo zjištěno, že jejich b.t. leží většinou mezi b.t. příslušné aktivní substance a b.t. kokrytalizačního partnera. Pokud se řízenou syntézou podaří řídit i b.t. kokrytalů, potom můžeme alterovat i jeho disoluční profil.

Dalším výzkumným směrem, jak alterovat vlastnosti kokrytalů, je jejich syntéza za vysokého tlaku. Kokrytalizací paracetamolu a piperazinu z ethanolu při tlaku 0,57

GPa vznikl jejich kokrytal (2:1) ethanol solvát, zatímco kokrytalizací při normálním tlaku vznikl kokrytal stejné stechiometrie, ale nesolvovaný. Navíc se oba produkty liší délkou a uspořádáním H-můstků a tudíž i svými vlastnostmi³⁵. Vysokotlakové kokrytaly jsou ovšem málo stálé a většinou při snížení tlaku přechází na nízkotlakové formy.

6.1. Fyzikální stabilita kokrytalů – polymorfismus

Protože žádný kokrytal nebyl dosud formulován do pevné lékové formy, tak nebylo nutné provádět systematický screening na polymorfismus. Publikované polymorfy kokrytalů jsou tak spíše „vedlejším produktem“ syntézy nových kokrytalů. Kromě toho se zdá, že kokrytalizací se většinou vysytí všechny dobré donory a akceptory protonů v molekulách a na tvorbu možných polymorfů již nejsou k dispozici. Na druhé straně i pro kokrytaly platí mnohokrát ověřené McCroneho prohlášení z roku 1963: „Každá molekula je potenciálně polymorfni, počet polymorfů dané látky závisí pouze na množství peněz, času a energie investovaných do jejího výzkumu ...”

Prestížní hledání polymorfů kokrytalů karbamazepin : sacharin (1:1) bylo nakonec po sérii několika set krystalizačních pokusů a společném mletí za přikapávání desítek rozpouštědel, korunováno úspěchem. Nestabilní polymorf II byl připraven krystalizací vyvolanou heterogenní nukleací polymerem³⁶.

Dalšími dimorfními kokrytaly jsou např. kofein : glutarová k. (1:1)²², kofein : trifluorooctová k. (1:1)³², ethenzamid : sacharin (1:1)³⁷ ad.

7. Závěr

Farmaceutické kokrytaly jsou výrazným rozšířením portfolia pevných API od určité aktivní molekuly. Představují novou možnost, jak optimalizovat technologické a funkční parametry pevné fáze. V současné době se aktivní molekula může teoreticky vyskytovat až v několika desítkách farmaceutických pevných formách (polymorfy, hydráty, soli, glykosylované deriváty, amorfni a semikrytalické fáze), zahrnutím kokrytalů se toto číslo zvětší zhruba na dvojnásobek. Vznik kokrytalů však nelze předpovědět pouze z vlastností jeho výchozích složek.

Na trhu zatím neexistuje lék formulovaný z farmaceutického kokrytalů. Kokrytaly se ale intenzivně zkoumají na akademických pracovištích a pracovištích V&V farmaceutických firem a produkty jsou často patentovány. S kokrytalem se ovšem do lékové formulace vnáší farmakodynamicky balastní chemikálie (kokrytalizační partner), která ovšem musí být farmaceuticky akceptovatelná.

Některé registrované soli by měly být, na základě strukturálních experimentů (pozice protonu mezi kyselinou a bází), překvalifikovány na kokrytaly. Volba farmaceutického kokrytalů jako API může být v budoucnu pro generické firmy výhodná i při patentových sporech.

Práce byla podpořena projektem NVP II MSM 2B08021 MŠMT ČR. Autor děkuje pánům Dr. Michalu Hušákovi a Štefanu Auerovi za technickou pomoc.

LITERATURA

1. Hoogsteen K.: *Acta Crystallogr.* 16, 907 (1963).
2. Issa N., Karamertzanis P. G., Welch G. W. A., Price S. L.: *Cryst. Growth Des.* 9, 442 (2009).
3. Vishweshwar P., McMahon J. A., Bis J. A., Zaworotko M. J.: *J. Pharm. Sci.* 95, 499 (2006).
4. Schultheiss N., Newman A.: *Cryst. Growth Des.* 9, 2950 (2009).
5. Aakeröy C.B., Salmon D. J.: *CrystEngComm.* 7, 439 (2005).
6. Parkin A., Gilmore C. J., Wilson C. C.: *Z. Kristallogr.* 223, 430 (2008).
7. <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/default.htm>, staženo 8.3. 2010.
8. Bhogala B.R., Nangia A.: *New J. Chem.* 32, 800 (2008).
9. Rádl S.: *Chem. Listy* 98, 1073 (2004).
10. Hájková M., Kratochvíl B., Rádl S.: *Chem. Listy* 102, 3 (2008).
11. Bingham A. L., Hughes D. S., Hursthouse M. B., Lancaster R. W., Tavener S., Threlfall T. L.: *Chem. Commun.* 2001, 603.
12. Childs S. L., Hardcastle K. I.: *Cryst. Growth Des.* 7, 1291 (2007).
13. Remenar J. F., Morissette S. L., Peterson M. L., Moulton B., MacPhee M., Guzmán H., Almarsson Ö.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8456 (2003).
14. Childs S. L., Wood P. A., Rodriguez-Hornedo N., Reddy L. S., Hardcastle K. I.: *Cryst. Growth Des.* 9, 1869 (2009).
15. Hickey M. B., Peterson M. L., Scoppettuolo L. A., Morissette S. L., Vetter A., Guzman H., Remenar J. F., Zhang Z., Tawa M. D., Haley S., Zaworotko M. J., Almarsson O.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 112 (2007).
16. Samas B., Wang W., Godrej D., B.: *Acta Crystallogr. E* 63, o3938 (2007).
17. Jones W.: 25. *European Crystallographic Meeting. Istanbul 2009.* Abstracts (Kendi E., Ozbey S., Ide S., ed.), str. 102 (lecture FA4-MS09-O3).
18. Fleischman S. G., Kuduva S. S., McMahon J. A., Molton B., Walsh R. D. B., Rodriguez-Hornedo N., Zaworotko M. J.: *Cryst. Growth Des.* 3, 909 (2003).
19. Basavoju S., Boström D., Velaga S. P.: *Cryst. Growth Des.* 6, 2699 (2006).
20. Childs S. L., Chyall L. J., Dunlap J. T., Smolenskaya V. N., Stahly B. C., Stahly G. P.: *J. Amer. Chem. Soc.* 126, 13335 (2004).
21. George P., Rossey G., Depoortere H., Mompon B., Allen J., Wick A., v knize: *Zolpidem and Related Compounds: Syntheses, Physical Properties and Structure Activity Relationship* (Sauvanet J. P., Langer S. Z., Morselli P. L., ed.), str. 11–23. Raven Press, New York 1988.
22. Trask A. V., Motherwell W. D. S., Jones W.: *Chem. Commun.* 7, 890 (2004).
23. Anderson K. M., Probert M. R., Whiteley Ch. N., Rowland A. M., Goeta A. E., Steed J. W.: *Cryst. Growth Des.* 9, 1082 (2009).
24. Childs S. L., Stahly G. P., Park A.: *Mol. Pharmaceutics* 4, 323 (2007).
25. Aakeröy C. B., Fasulo M. E., Desper J.: *Mol. Pharmaceutics* 4, 317 (2007).
26. Arora K. K., PrakashaReddy J., Pedireddi V. R.: *Tetrahedron* 61, 10793 (2005).
27. Steiner T., Majerz I., Wilson C. C.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 40, 2651 (2001).
28. Clark J. H., Jones C. W.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1990, 1786.
29. Program ACD/pK_a DB v. 12.0.. Advance Chemistry Development Inc. Toronto, ON.
30. Aakeröy C. B.: 25. *European Crystallographic Meeting. Istanbul 2009.* Abstracts (Kendi E., Ozbey S., Ide S., ed.), str. 8 (lecture KN-16).
31. Loub J., Haase W., Mergenhenn R.: *Acta Crystallogr. B* 35, 3039 (1979).
32. Frišič' T., předneseno v rámci: 24. *European Crystallographic Meeting. Satellite meeting. Marrakech 2007.*
33. Shan N., Toda F., Jones W.: *Chem. Commun.* 20, 2372 (2002).
34. Schultheiss N., Newman A.: *Cryst. Growth Des.* 9, 2950 (2009).
35. Oswald I. D. H., Pulham C. R.: *CrystEngComm* 10, 1114 (2008).
36. Porter III W. W., Elie S. C., Matzger A. J.: *Cryst. Growth Des.* 8, 14 (2008).
37. Aitipamula S., Pui Shan Chow, Tan R. B. H.: *Cryst EngComm* 11, 889 (2009).

B. Kratochvíl (*Department of Solid State Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Cocrystals and Their Expected Pharmaceutical Applications**

Pharmaceutical cocrystals are H-bonded multicomponent mixtures formed from a molecular or ionic substance and a cocrystal former, which are solids under ambient conditions. The cocrystals are the latest material investigated to enhance drug properties such as solubility, dissolution rate, stability, powder flow, and hygroscopicity. Very close to cocrystals are salts which can be distinguished by the localization of proton between an acid and base. Crystal engineering of cocrystals is based on the concept of supramolecular synthons. The major experimental techniques in cocrystal screening are cocrystallization in solution, solvent evaporation, melt crystallisation, dry cogrinding, solvent-assisted grinding and cryogrinding.

METABOLISMUS EKDYSTEROIDŮ U HMYZU (*Insecta*) A VÝZNAM HMYŽÍ STŘEVNÍ MIKROFLÓRY

MILAN PAVLÍK^a, HANA RYŠAVÁ^{a,b}
a ZDENĚK WIMMER^a

^a Izotopová laboratoř, ÚEB AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč, ^b Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka, pavlik@biomed.cas.cz

Došlo 1.9.09, přepracováno 2.12.09, přijato 5.1.10.

Klíčová slova: střevní symbiotické mikroorganismy, biotesty 20-hydroxyekdysonu

Obsah

1. Ekdysteroidy – svlékáci hmyzí hormony
2. Charakteristika zoekdysteroidů
3. Metabolismus ekdysteroidů hmyzu
4. Injektováním ke stanovení kapacity a variability detoxifikačních cest ekdysteroidů
5. Metabolismus aktivních a neaktivních fytoekdysteroidů přijímaných hmyzem
6. Reprodukovatelnost testů sledujících vliv fytoekdysteroidů podávaných potravou
7. Význam střevní symbiotické mikroflóry pro vývoj hmyzu
8. Závěr

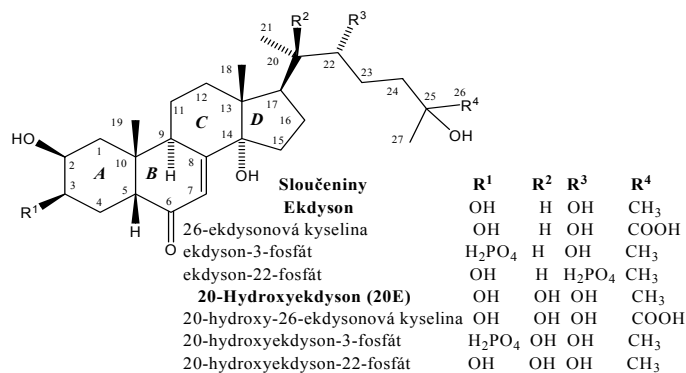
1. Ekdysteroidy – svlékáci hmyzí hormony^{1–4}

Podle výskytu v organismech jsou ekdysteroidy rozdělovány na zoekdysteroidy a fytoekdysteroidy. Zoee-

kdysteroidy, které fungují v organismech patřících do členovců (*Arthropoda*), mají ekdysonovou aktivitu. 20-Hydroxyekdyson (20E) je příkladem hlavního aktivního ekdysteroidního hormonu, který reguluje svlékáci proces u hmyzu (*Insecta* nebo také *Hexapoda*) a korýšů (*Crustaceae*). 20E, nazývaný také β-ekdyson, ekdysteron, kommisteron A, isoinokosteron, polypodin A, nebo hmyzí svlékáci hormon (insect moulting hormone) vzniká aktivací ekdysonu jako prohormonu. Mezi ekdysteroidy patří produkty hmyzích detoxifikačních (katabolických) drah, které vedou k jejich neaktivním analogům, většinou konjugátům. Regulace aktivních zoekdysteroidů musí být z důvodů fylogenetického vývoje pro úspěšné druhy hmyzu energeticky minimálně náročná. Právě energetická nenáročnost regulace metabolismu v živých organismech je jedním z významných faktorů obecně zaručujících úspěšnost druhu. Proto neaktivní formy zoekdysteroidů jsou strukturně tak podobné aktivním formám (obr. 1).

Ekdysteroidy jsou nejvíce testovány právě na hmyzu. Entomologové vycházejí z biologické funkce fytoekdysteroidů, a proto uvádějí, že funkce fytoekdysteroidů spočívá v obraně rostliny proti herbivornímu hmyzu⁵. Lékaři a farmaceuti se přiklánějí k názoru, že biologická funkce fytoekdysteroidů je spojena se steroidními účinky na býložravce, nebo všežravce. Přes tyto poznatky stále není plně zřejmá úloha fytoekdysteroidů v rostlině^{6,7}.

Cílem práce je posoudit, zda na základě současných znalostí o detoxifikačních mechanismech je reálné uvažovat o možnostech využívání těchto typů látek pro ochranu rostlin v zemědělství, nebo zda je reálnější využití strukturní znalosti o aktivitě zoekdysteroidů pro tvorbu specifických látek zasahujících do ekdyse škůdců. Tento výzkum nabude na aktuálnosti, protože Evropský parlament připravuje směrnice k omezení použití insekticidních organofosfátů a karbamátů.



Obr. 1. Ekdysteroidy – ekdyson a 20-hydroxyekdyson, analogy jejich kyselin a fosfátů

2. Charakteristika zoekdysteroidů^{1–4}

K zoekdysteroidům a jejich odvozeným sloučeninám řadíme velkou skupinu látek, které ačkoliv splňují strukturní kritéria⁸, nemusí ale vykazovat ekdysonovou aktivitu. Zoekdysteroidy obsahují chromofor konjugovaného ketonu 7-en-6-on cholestanového typu cytoskeletu – C₂₇ a 5β-vodík (*cis* A/ B-spojení kruhů), které jsou velmi důležité pro aktivitu, protože 5α-vodík (*epi*; *trans* A/ B-spojení kruhů) tvoří neaktivní analogy, podobně jako dvojná vazba 4-en (se pak přibližuje spíše *trans* A/ B-spojení kruhů). Podmínkou je i přítomnost několika hydroxylových skupin, které umožňují lepší rozpustnost ve vodě, resp. dobrou rozpustnost v cytosolu hmyzu nebo v rostlinné buňce. Hydroxylové skupiny vytváří podmínky pro tvorbu vodíkových můstků s okolními sloučeninami obsaženými v cytosolu. To vysvětluje kvantitativní omezení izolovaných fytoekdysteroidů postupně pomocí sekvenční extrakce do 4 frakcí rozpouštědly EtOAc, BuOH, MeOH nebo MeOH + voda (1:1). Extrakce je diskontinuální, s rozložením obsahu fytoekdysteroidů ve frakcích^{9,10} dle Gausovy křivky. Kromě toho jsou hydroxylové skupiny také pro hmyz východiskem deaktivčních procesů exekdysteroidů a endoekdysteroidů.

3. Metabolismus ekdysteroidů hmyzu^{1–3}

Biosyntéza zoekdysteroidů začíná u 24-dealkylace fytoosterolů ve střevech všežravého a býložravého hmyzu a korýšů až postupně vznikne cholesterol. Cholesterol se změní buď postupně přes 5β-ketodiol a 2-deoxyekdyson na ekdyson^{11,12} v protorakálních žlázách, a nebo především v hemolymfě postupně přes 5β-diketol a 3-dehydroekdyson na ekdyson^{11–13}. Ten se pak v povrchových tkáních v protorakálních žlázách přemění po hydroxylaci katalyzovanou ekdyson-20-monooxygenasou z ekdysonu na 20E. Systém 24-dealkylace sterolů probíhá také u několika dalších kmenů bezobratlých, včetně prvoků, zelených řas, hub, hlístů, a některých měkkýšů¹¹. Regulace syntézy zoekdysteroidů je složitá, protože je propojená s vývojovými stádii jedince¹⁴. Vajíčka hmyzu obsahují různé zoekdysteroidy ve volné i konjugované formě¹⁵. Množství zoekdysteroidů se mění během vývoje embrya. Zoekdysteroidy podporují fungování regulace embryogeneze^{14,16} a pomáhají při kontrole reprodukce¹⁴.

U hmyzu existuje několik možností deaktivace a detoxifikace ekdysteroidů. Detoxifikace probíhá u všech druhů adaptovanou střevní symbiotickou mikroflórou. U některých druhů hmyzu je ovlivněna také přítomností specifických střevních hmyzích enzymů. Hmyz během svého životního cyklu reguluje metabolismus svlékacích hormonů, přeměnou aktivních forem ekdysteroidů na neaktivní a nebo naopak. Tento proces je pro organismy, v nichž se tyto látky vyskytují, energeticky méně náročný, než tyto látky komplexně katabolickými procesy degradovat. Detoxifikace proto nastává také po průniku trávicím

traktem přímo ve vlastním organismu.

Čerstvě nakladená vajíčka obsahují mateřské konjugované fyziologicky neaktivní fosfatové estery ekdysteroidů. Fosfáty zoekdysteroidů jsou umístěny v žlutkových zrnech, kde jsou vázány na žlutkový protein vitellin¹⁷. Ve vajíčkách mimo diapauzu je vytvářen 20E přeměnou mateřských fosfatů zoekdysteroidů. Další metabolickou cestou tvorby 20E v hmyzím organismu je biosyntéza *de novo* z cholesterolu. U vajíček v diapauze se ani jeden z těchto metabolických procesů nevyskytuje¹⁵. Tvorba 20E během vývoje rané embryogeneze je regulována společně přes 2 enzymy¹⁸: ekdyson-20-hydroxylasu a ekdysteroid-fosfat-fosfatasa. Ekdysteroid-fosfat-fosfatasa katalyzuje přeměnu fyziologicky neaktivních konjugovaných fosfatů ekdysteroidů, jako např. ekdyson-22-fosfátu a 20E-22-fosfátu s vitellinem na volné neaktivní fosfáty ekdysteroidů¹⁹. Fosfatové vazby komplexu vitellinu s fosfáty zoekdysteroidů jsou obtížně hydrolyzovány ekdysteroid-fosfat-fosfatasa, na rozdíl od volných fosfatů zoekdysteroidů, které mohou být ekdysteroid-fosfat-fosfatasa kompletně hydrolyzovány¹⁷. Ekdysteroid-fosfat-fosfatasa nebyla objevena u vajíček v diapauze, jejichž vývoj je chráněn v pozdním stadiu gastruly²⁰. Kromě několika jiných enzymů byla objevena kinasa regulovaná extracelulárním signálem, který má klíčovou roli v ukončení diapauzy²¹. Deaktivace probíhá několika způsoby včetně jejich kombinací:

- Tvorba různých konjugátů, především fosfatů.
- Hydroxylace na uhlíku C26 a další oxidace až na příslušnou kyselinu na uhlíku C26.
- Tvorba 3-dehydroekdysteroidů za katalýzy ekdyson-oxidasy. Po následné redukci vzniká epiekdysteroid, který pak tvoří různé fosfatové konjugáty za katalýzy fosfotransferasy²².

Biotransformace aktivních zoekdysteroidů na neaktivní spočívá především v tvorbě ekdysteroidních konjugátů, na uhlíku C22 s mastnými kyselinami, glukosou nebo již uvedenou kyselinou fosforečnou. Deaktivace zoekdysteroidů je pozorovaná např. během posledního larválního instaru u *Lepidoptera* ve středním střevě, kde probíhá pomocí aktivní cytosolové ekdysonoxidasy a ekdysteroid-fosfotransferasy. Transformace vede přes 3-dehydroekdysteroidy k odpovídajícímu 3-epiekdysteroidu (3α-hydroxy), až k fosfatové konjugaci. Pro zoekdysteroidy je charakteristická postupná deaktivace, která je většinou nakonec završena fosforylací. Produkty fosforylace jsou převážně 2-fosfáty ekdysteroidů doprovázené malým množstvím odpovídajícího 22-fosfátu ekdysteroidů^{22,23}.

U všech organismů je znám význam enzymu v detoxifikaci xenobiotik a v rezistenci hmyzu k rostlinným látkám²⁴. Hmyzí genom obsahuje přes 100 různých genů enzymu Cytochromu P450 (CyP450). Tyto geny jsou složitě regulovány. U živočichů se CyP450 účastní biotransformace steroidních hormonů (testosteron, progesteron). CyP450 je životně důležitý v biotransformaci endogenních steroidních substrátů u *Crustacea*, protože je spojen s aktivací ekdysonu jako prohormonu na 20E (cit.^{24,25}), či konverzí ponasteronu A na 20E (cit.²⁶). Stejná biotransforma-

ce ekdysonu na 20E za katalýzy CyP450 je známá také u rostlin. U hmyzu je biosyntéza ekdysonu dána hydroxylací na C2 a/nebo C22 (mitochondriální CyP450) a na C25 mikrosomální CyP450 (cit.²⁴). Úloha CyP450 při aktivaci 20E je známá, ale pozapomíná se na její funkci i při deaktivaci ekdysteroidů, zvláště pak ekdysonu a 20E, která vede přes jejich hydroxylaci na uhlíku C26 a končí oxidací přes aldehyd až u příslušné karboxylové kyseliny^{24,27,28}.

Vzájemné regulace v celém těle nebo pouze např. v hemolymfě a/nebo ovarii^{12,14,15,29–33} ve vztahu k ekdysonu hmyzu je spojena s několika cestami deaktivace. Tyto regulační mechanismy vzájemné biotransformace zoekdysteroidů³¹ umožňují hmyzu určitou míru adaptability, pokud přes střevní stěnu do hemolymfy pronikne jak aktivní, tak neaktivní forma fytoekdysteroidů. K pochopení regulace je nutné znát rychlost dynamické změny (nárůst, pokles) koncentrace aktivních nebo neaktivních analogů zoekdysteroidů převážně v těle hmyzu, nebo v hemolymfě v průběhu vývoje jedince^{34,35}, či v průběhu embryogeneze³⁶. Tyto znalosti jsou významné při hodnocení toxikokinetických procesů (biologická dostupnost)³⁷ a následně toxikodynamických procesů (interakce – tvorba specifických bílkovin, inhibice či aktivace specifických enzymů) po podání fytoekdysteroidů potravou^{37,38}, protože vedou k vyvolání odpovědi, regulaci³⁸ fyziologických procesů během vývoje jedince.

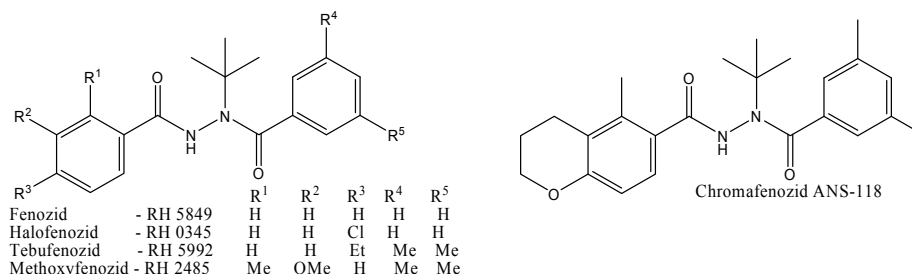
4. Injektováním ke stanovení kapacity a variability detoxifikačních cest ekdysteroidů^{1–3}

Sledování efektu exoekdysteroidů, lze obecně shrnout do sledování toxikokinetických a toxikodynamických procesů, které vyvolá injektovaný ekdysteroid a do jeho biotransformace³³. Proto se objasnění biotransformačních mechanismů zoekdysteroidů neobejde bez injektování radioisotopem značeného ekdysteroidu do testovaných jedinců vybraného druhu hmyzu.

Injektování exoekdysteroidů do hmyzu musí předcházet stanovení akutní toxicity (dávka ekdysonu a 20E do 10 µg) a chronické toxicity (do 100 ppm 20E)³⁹. Exoekdysteroidy stimulují ovaria v dávkách 1–5 µg 20E / samičku a plodnost v dávce 1 µg 20E / samičku³³. Naopak

ve vyšších koncentracích 10 µg 20E / samičku je inhibován vývoj ovarii⁴⁰. Při opakovaném injektování dávek 2 až 5 µg, a to jak ekdysonu, tak 20E / samičku, dochází u nich ke stimulaci produkce vajíček⁴¹.

Injekční aplikace ekdysonu nebo 20E značeného isotopem ³H ([³H]ekdysonu a [³H]20E) v poloze C23 a C24 do hemolymfy v dávkách od 0,8 ng do 10 µg přes břišní stěnu larev můry blýskavky (*Spodoptera littoralis*) v 6. instaru potvrdila dva hlavní (polární a nepolární) detoxifikační mechanismy zoekdysteroidů. Injektovaný ekdyson byl hydroxylován buď na C26, kde je dále oxidován na 26-ekdysonovou kyselinu, a nebo na C20 na 20E. Ten je také hydroxylován na C26 s následnou oxidací až na 20-hydroxy-26-ekdysonovou kyselinu. Injektovaný ekdyson byl ale transformován méně na 20E 22-acyl estery mastných kyselin a/nebo více na ekdyson 22-acyl estery mastných kyselin, které byly např. jako palmitát nalezeny v hemolymfě. Odstraňování injektovaných zoekdysteroidů z hemolymfy do střev bylo velmi rychlé. Za 30 minut bylo 35 % injektovaných metabolitů ve střevech, za 3 hodiny bylo injektovaných metabolitů v hemolymfě pouze 27 % a 20 % již bylo současně ve střevních výkalech. Po 24 hodinách, podobně jako i u podávání fytoekdysteroidů potravou, byly zaznamenány pouze stopy radioaktivity injektovaných zoekdysteroidů⁴². Tyto výsledky jsou proto velmi významné ve vztahu k rychlosti trávení, množství spotřebované potravy a rozmezí obsahu fytoekdysteroidů v rostlinách např. ve špenátu setém (*Spinacia oleracea*) nebo parše saflorové (*Leuzea carthamoides*). Tato hlavní polární detoxifikační cesta byla potvrzena i po injektování 20E do larev bource morušového (*Bombyx mori*) a *Heliothis virescens*, když doplňkovou detoxifikací byla epimerizace 20E. Detoxifikační analogy vytvořily konjugáty. V *B. mori* to byl sulfát, který je ojedinělý oproti obvyklým fosfátovým konjugátům nalezeným v *H. virescens*⁴³. Tyto poznatky jsou ve shodě s výsledky dřívějšího injektování ekdysonu⁴⁴ i do dalšího hmyzího zástupce octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*), kde u nepolární detoxifikační cesty byl hlavním neaktivním produktem konjugát s mastnou kyselinou na C22. U polární detoxifikační cesty jsou hlavními deaktivujícími produkty 26-ekdysonová kyselina a 20-hydroxy-26-ekdysonová kyselina, dále 3-dehydroekdyson a nejméně 20E.



Obr. 2. Diacylhydrazinovi (DAH) agonisté ekdysteroidů

Během fylogenetického vývoje hmyzu se biotransformace endoekdysteroidů na příslušné kyseliny na uhlíku C26 (cit.^{27,45,46}) stala obecnou, protože je energeticky výhodné oxidací vytvořit hormonálně neaktivní analogy. Začíná po hydroxylaci uhlíku C26. Účastní se jí 20-monooxygenasa, která je indukována substrátem ekdysonu na produkt 20E. Finální biotransformaci indukují substráty ekdysonu a 20E, které aktivují 26-hydroxylasu, jejíž produktem je hydroxylová skupina na uhlíku C26 jak u ekdysonu, tak 20E. Tuto reakci také indukuje agonista RH5849 (obr. 2, 1,2-dibenzoyl-1-*terc*-butylhydrazin)^{47,48}. Pokud pronikne ekdyson do těla, hmyz má dostatečné mechanismy k jeho eliminaci na neaktivní analogy. A to i přesto, že část se aktivuje na 20E, protože i tento následně rychle podléhá biotransformaci. Existují dva mechanismy deaktivace, metabolizace ekdysteroidů. Vedle deaktivace spouštěné endoekdysteroidy byl potvrzen i mechanismus spouštěný exoekdysteroidy, které vstupují do hmyzu přes trávicí soustavu potravou. Ve střevě dochází ke trávení potravu včetně začátku deaktivace ekdysteroidů. Nesteroidní agonisti odvození od diacylhydrazinů jsou komerčně používané insekticidy³. Fenozid (obr. 2) indukuje deaktivací metabolickou cestu přes hydroxylaci ekdysteroidů na C26 a po následné oxidaci přes jeho aldehyd vzniká příslušná kyselina na C26 (cit.^{22,48}).

5. Metabolismus aktivních a neaktivních fytoekdysteroidů přijímaných hmyzem^{1–3}

Enzymový systém ve střevěch larev hmyzu má mnoho funkcí. Z cytosolu střední části střev byly izolovány enzymy, jako jsou ekdysonoxidasa, 3-dehydroekdyson-3 α -reduktasa, 3-dehydroekdyson-3 β -reduktasa, ekdysteroid-2-fosfotransferasa a ekdysteroid-22-fosfotransferasa, které se podílejí na detoxifikaci (deaktivaci) ekdysteroidů^{23,49,50}. Rozsah optimálního pH pro tyto enzymy je stanoven mezi 6,5–7,8. Metabolity detoxifikace ekdysteroidů tvoří neaktivní analogy. Při deaktivaci je uplatňována nejen polární cesta, ale přednostně i nepolární cesta. U nepolární cesty je nezbytná acyltransferasa, která je účinná pro oba hlavní substráty ekdysonu a 20E. Menší část potravou přijatého 20E odchází ale v nezměněné formě ze střev výměty (např. u zavíječe paprikového – *Plodia interpunctella*)⁵¹. Z detoxifikace ekdysteroidů ale nelze vyloučit ani střevní symbiotické bakterie, ačkoliv byly nalezeny v cytosolu středního střeva enzymy larev, které umožňují tvorbu neaktivních ekdysteroidů.

Deaktivaci ekdysteroidů se tvoří hormonálně neaktivní méně polární konjugáty ekdysteroidů s estery kyseliny octové (3-acetát ekdysteroidů), nacházející se v larvách sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*)⁵² a především s mastnými kyselinami na C(22)-acylestery ekdysteroidů, které se vyměšují ze střev výměty larev černopásky bavlníkové (*Heliothis armigera* syn. *Helicoverpa armigera*)⁵³, *H. virescens*^{43,54,55}, cvrčka dvouskvrnného (*Gryllus bimaculatus*)⁵⁶, *S. littoralis*⁴², *P. interpunctella*⁵¹. *P. interpunctella* odstraňuje 20E z potravu také jako 3-oxo-20E a 3-

epi-20E, které také tvoří konjugáty s mastnými kyselinami⁵¹. Oproti tomu zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*) produkuje pouze konjugáty s mastnými kyselinami⁵¹. Již po 15 minutách se z těla hmyzu ve výmětech (exkrementech) nejdříve vylučují estery ekdysteroidů. Obecně se vylučuje zpracovaná potrava výměty po 2–4 hodinách. Oproti tomu např. pro černopásku bavlníkovou (*H. armigera*) je rychlost trávení větší než 12 hodin⁵³ a pro *Helicoverpa virescens* je menší než 1 hodina⁵⁴. Ekdysteroidy značené isotopem ³H podané spolu s potravou se projeví na nízké úrovni radioaktivity u uhynulých jedinců⁵³. Radioaktivita ve střevěch je nepřímo úměrná výmětům⁴².

Přes stěnu střevní do těla více vstupují estery 20E než polárnější 20E. V tomto případě je proto tvorba esterů 20E pouze pseudodetoxifikací. K této deaktivaci ekdysteroidů přes jejich estery může dojít, pokud fytofágní hmyz trvale žije na rostlinách obsahujících ekdysteroidy. Biotransformace ekdysteroidů z fytoosterolů je energeticky náročná. Odtud se může opět část těchto esterů ekdysteroidů vrátit zpět do střeva pomocí molekulárních buněčných pump (není známa žádná práce popisující, zda a jak dochází k aktivaci), a nebo vstoupit do hemolymfy. Hlavní funkcí hemolymfy je roznášení výživných a exkrečních látek. Proto deaktivované ekdysteroidy včetně esterů, jako stále relativně polární látky, pokud nemají upotřebení v metabolismu larev, mohou být postupně z hemolymfy vylučovány přes malpighické žlázy do zadního střeva (*proctodaeum*), kterým odcházejí zbytky potravu do konečnicků.

Deaktivace probíhá v larvách přes 14-deoxyekdysteroidy (*G. bimaculatus*)⁵⁷, odštěpením postranního řetězce na poststeron (*B. mori*)⁵⁸ a také přes 3-dehydroekdysteroidy (*S. littoralis*)^{23,50}, *D. melanogaster*⁵⁹, *P. interpunctella*⁵¹ na 3-epiekdysteroidy (bělásek zelný – *Pieris brassicae*)⁶⁰, *Manduca sexta*^{49,61,62}, *S. littoralis*)^{23,50}. Z těchto biotransformovaných ekdysteroidů se následně mohou vytvářet především fosfátové konjugáty. Deaktivaci ekdysteroidů se tvoří hormonálně neaktivní polární konjugáty ekdysteroidů se sacharidy, jako je 22-glukosid ekdysteroidů (obsaženo v medovici mšic, např. u mšice broskvoňové – *Myzus persicae*)⁵¹, a především s kyselinou fosforečnou, jako je 2-fosfát ekdysteroid (*L. migratoria*, cit.^{52,63}, *M. sexta*)⁶¹, *S. littoralis*)^{23,50}, 3 α -fosfát ekdysteroid (*P. brassicae*)⁶⁰, 22-fosfát ekdysteroid (*M. sexta*)⁶¹, *S. littoralis*)^{23,50}, které se rychle vyměšují ze střev larev. Enzymatická deaktivace cytosolu středního střeva ukázala u larev *S. littoralis* v podmínkách *in vitro*^{23,50} tvorbu především 3-fosfátů ekdysteroidů a méně 22-fosfátů ekdysteroidů²³. Neaktivní konjugáty ekdysteroidů s glukosou nebo galaktosou v poloze C22 jsou tvořeny glukosyltransferasou v hemolymfě hmyzu infikovaného bakulovirem⁶⁴.

Diverzita detoxifikačních metabolických cest zoeekdysteroidů fytofágního hmyzu umožňuje larvám překonat negativní účinky v potravě přítomných fytoekdysteroidů. Diverzita detoxifikačních mechanismů může být také příčinou rozdílné citlivosti jednotlivých druhů k obsahu fytoekdysteroidů v potravě.

6. Reprodukovatelnost testů sledujících vliv fytoekdysteroidů podávaných potravou

Při studiu repelentní aktivity rostlinných látek na hmyzu jsou testy dobře reprodukovatelné^{65,66}. Metodiky sledující toxicitu rostlinných látek, zvláště pak ekdysteroidů nebo s tím spojenou biologickou aktivitu na hmyzu, vypadají také bezchybně. Jsou ale do určité míry specifické. Za standardní lze považovat biotest využívající ekdysteroid značený izotopem ³H, který je aplikován potravou larvám většinou v 6. instaru. Pro povzbuzení spotřeby potravy, zvýšení krmeného poměru jsou larvy např. *S. littoralis* předem vyhladověny. Postup je standardně využíván v ekotoxikologických testech. Ekdysteroidy musí být rovnoměrně aplikovány na povrch zkrmovaných listů o maximálním průměru 1,2 mm (cit.⁴²).

Vyhladovění a minimalizace potravy umožňuje dobrou organizaci pokusu, protože jsou relativně dostatečně odděleny potrava a výměty. Problém může nastat s určením hodnoty množství látky ovlivňující 1 kg testovaného organismu (LD₅₀, ED₅₀ či ID₅₀). To lze eliminovat aplikací látky (juvenilní hormon) pitnou vodou, ne potravou. Podmínkou je, že ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*) v testované životní fázi (poslední nymfální ekdyse) nezbytně potřebuje k životu v daných podmínkách přesně stanovenou denní dávku vody (55 μl)⁶⁷. Účinné koncentrace ekdysteroidů podávané potravou^{68–72} byly již od 10 ppm (ED₅₀ – inhibice růstu), resp. od 50 ppm, kdy byla pozorována 90% mortalita. U hmyzu ale nebyly pozorovány změny v ekdyse či jiné specifické fyziologické změny pozorované při injektování.

Během ekdyse při zvýšeném obsahu 20E roste i specifický glykoprotein (Gp 150), který je součástí slizu a má i imunitní funkci. Vyskytuje se v hemocytech a slinných žlázách. Odtud se dostává do předního střeva (*stomadaeum*). Část vyloučeného Gp 150 změní strukturu a polapí bakterie. Proto má hmyz během ekdyse a zvýšené hladině ekdysteroidů vyšší imunitu proti patogenním bakteriím. Při podávání 20E potravou v biozkouškách se zvyšuje obsah Gp 150 nejen v hemocytech, ale i ve slinných žlázách a následně i ve střevech⁷³. To zpětně vyvolává negativní vliv na střevní symbiotickou mikroflóru významnou nejen pro trávení potravy, ale i pro celkový vývoj jedince. Je proto nutné obezřetně postupovat při interpretaci výsledků biozkoušek ekdysteroidů aplikované potravou, pokud není zároveň sledována změna diverzity střevní symbiotické mikroflóry.

Velký počet nalezených druhů hmyzu v polní kultuře *L. carthamoides*, mající vysoký obsah 20E, jej musí z potravy eliminovat⁶. To dává předpoklad, že součástí fenotypové proměnlivosti hmyzu je i adaptace střevní symbiotické mikroflóry spolupodílející se na rezistenci hmyzu k fytoekdysteroidům. Při biotestech se nedoceňuje fakt, že v tomto případě hmyz žil na rostlině obsahující v listech několikanásobně větší množství 20E, než je v jiných rostlinách např. špenátu, po napadení hmyzem. Protože se obsah fytoekdysteroidů v napadených listech rostliny zvyšuje,

bývají fytoekdysteroidy řazeny k faktorům podílejících se na odolnosti rostlin ke škůdcům⁵.

Larvám ektoparazitoidu *Diapetimorpha introita* žijícím na umělé výživě a nikoliv na blýskavce kukuřičné (*Spodoptera frugiperda*), se významně snižuje ve všech stádiích životaschopnost, zpomaluje se vývoj a nastávají některé změny, jako např. zvětšení očí, vyprázdněná střeva. Obsah 20E byl vyšší v hemolymfě ektoparazita chovaného na přirozené výživě především v 6. instaru. Nedostatek ekdysteroidů v hemolymfě u chovu na umělé výživě by mohl být částečně příčinou relativně vysokého procenta mortality ve 4. (maximální) a následně i u 1. a 2. instaru⁷⁴. Hexapeptid byl izolován⁷⁵ z vitellogenických ovarii s follikulostatickou aktivitou a regulující oostatický faktor inhibuje biosyntézu trypsinu ve střevech. Následné snížení koncentrace žlutkových polypeptidů v hemolymfě se projevuje v inhibici biosyntézy ekdysteroidů v larválních žlázách⁷⁶. Inhibice ekdysonu nepotlačuje aktivitu hexapeptidu, avšak je na něm závislá regulace ekdysonu. Rostlinné látky uvolněné proto ve střevech z potravy mohou být potenciálně významné v regulaci ekdysteroidů přes inhibici proteolytických enzymů nebo přes inhibici biosyntézy trypsinu⁷⁶.

Nejvhodnější je pravděpodobně koncepce biotestů používaná skupinou Rowell-Rahier^{77–79}, která přímo neeliminuje vliv změny potravy, např. přidavku potenciálně toxického sesquiterpenového laktonu kakalolu. Tito vědci založili pokusy na sledování vlivu kakalolu na specialisto- vi mandelince havězové (*Oreina cacaliae*) sebraného z rostlin obsahujících i neobsahujících kakalol. Výsledky ukázaly nejen vysokou heterogenitu srovnávaných populací, ale také nízkou heritabilitu rezistentní populace ke kakalolu^{77–79}. Fenotypová proměnlivost rezistence sledovaná pomocí růstu a mortality není závislá na genotypové variabilitě (proměnlivosti) testovaných jedinců, ale na faktorech prostředí, tedy na negenetické variabilitě. Vysvětlením je toxicita kakalolu na střevní symbiotické bakterie u hmyzu, který nežil na rostlinách obsahujících kakalol. Porušením symbiózy bakterií s hmyzem došlo k sekundárnímu projevu toxicity kakalolu.

Biotesty ekdysteroidů na hmyzu, který se živí, resp. neživí, rostlinami obsahujícími ekdysteroidy ve vztahu ke střevní symbiotické mikroflóře hmyzu nebyly provedeny. Vliv ekdysteroidů na mikroorganismy⁸⁰ není ještě dostatečně popsán. Aplikací vysokých dávek ekdysteroidů může dojít ke snížení diverzity střevních symbiotických bakterií, podobně jako při změnách potravy^{81–83}. V testech rostlinných látek aplikovaných potravou do hmyzu nebýval význam symbiosy střevních bakterií s hmyzím hostitelem doceněn. Proto se začíná se studiem vlivu rezistence střevní symbiotické mikroflóry hmyzu k přírodním látkám a insekticidům. Při sledování toxického vlivu rostlinných látek, polutantů a pesticidů na střevní symbiotickou mikroflóru hmyzu v podmínkách *in vitro* je nutné dbát na 2 základní faktory: 1. Jen zlomek z těchto bakterií, podobně jako půdních bakterií⁸⁴, je možno kultivovat *in vivo*. To omezuje studium vlivu bakterií na trávení potravy hmyzem, úlohy bakterií při detoxifikaci přírodních látek, polu-

tantů a pesticidů⁸⁵, změn střevních symbiotických bakterií způsobených toxickými látkami a jejich vlivu na patogeny v trávicím traktu hmyzu. 2. U mikroorganismů, podobně jako u pylu je nutné udávat zároveň koncentraci testovaných organismů a množství media, protože v nízkých koncentracích dramaticky vzrůstá citlivost k látce^{86,87}. Částečně lze k eliminaci využít známé referenční látky^{88,89}.

7. Význam střevní symbiotické mikroflóry pro vývoj hmyzu

Význam změny složení symbiotických bakterií ve střevech hostitelského hmyzu na trávení potravy, odolnost proti patogenům a detoxifikaci látek je nezpochybnitelný. Studium diverzity a vlastností mikroorganismů zvláště pak střevního mikroekosystému hmyzu, jejich izolace a správné taxonomické identifikace úzce souvisí s dokonalostí použitých technik v mikrobiální analýze^{84,90}. Pro sledování a taxonomické určení nekultivovatelných symbiotických mikrobů ve střevech hmyzu^{91,92} nebo háďátek⁹³, včetně stanovení komplexního střevního společenstva např. u *Poecilus chalcides*, *Harpalus pensylvanicus*, *Anisodactylus*^{82,94}, jsou využívány různé genetické analýzy (metagenomická analýza^{95,96}). Metoda značení stabilními isotopy (stable isotope probing) – SIP⁹⁰ deteguje aktivní organismy při detoxifikačním procesu a zároveň tento proces umožní studovat.

Změnou, např. přidávkou další složky do potravy (proteinový rybí hydrolyzát), je ovlivněn růst a zvětší se imunita proti patogenním bakteriím (*Vibrio anguillarum*) nejen u hmyzu, ale i jiných živočichů⁸¹. Po inokulaci střevního symbionta *Enterobacteriacea* do střev octomilky dochází k následnému zvýšení dlouhověkosti u pozorovaných jedinců⁹². Mnohé symbionty, jako např. *Enterobacteriaceae*, eliminují v potravě patogenní bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*) nebo potenciální patogeny (*Hafnia alvei*, *Serratia* spp., zejména pak *Serratia marcescens*) ve střevech vrtule velkohlavé (*Ceratitis capitata*), *H. pensylvanicus*, *Anisodactylus sanctaerucis*^{92,94}. *S. marcescens* může být významná v subpatogenní hladině při dynamické regulaci střevního bakteriálního společenstva. Infekce entomopatogenní *Photobacterium temperata* se významně projevuje i ve snížení trávicích enzymů a následně v mortalitě motýla *Diatraea saccharalis*⁹⁷.

Ve střevech hmyzu při trávení potravy např. *S. marcescens* a *H. alvei* produkují specifické enzymy (chitinasy)⁹⁸. Bakteriální symbiotická společenstva se uplatňují v produkci vitaminů B nebo rozkladu celulosy⁹⁹. Biotransformují rostlinné steroly na cholesterol, který je důležitým meziproduktem biosyntézy zoekdysteroidů⁹⁹.

Střevní symbiotická mikroflóra hmyzu se významně podílí na trávení potravy, detoxifikaci a degradaci škodlivých látek^{100,101}. Významně rozdíly střevních symbiotických bakterií vyplývají z analýzy tří hmyzích populací (dvou laboratorních proti insekticidům rezistentní a citlivé) škůdce západníčka polního (*Plutella xylostella*) a popula-

ci, která byla nasbírána z polního ekosystému¹⁰². O bakteriích (*Burkholderia fungorum*, *H. alvei* a *Enterobacter*) detoxifikující PCB, polyaromatické uhlovodíky (fenanthren) a insekticidy (chlorpyrifos) v půdě^{103,104} víme mnohem více než o bakteriích v trávicím traktu hmyzu, které degradují přírodní látky¹⁰⁵, toxiny⁹⁴ a pesticidy, zvláště pak insekticidy⁹⁴. *Enterobacter*, degradující insekticid chlorpyrifos, byl nalezen v půdě i v trávicím traktu hmyzu⁹⁴.

8. Závěr

Pro tvorbu pesticidů 3. generace na základě využití procesů spojené s ecdysí, je vhodné jít cestou tvorby agonistů, nejen již komerčně používaných, ale vývojem nových perspektivních typů agonistů³, jako jsou agonisté odvozené od amidoketonů, oxadiazolinů, benzamidů a tetrahydroquinolinů. Alternativou jsou přírodní rostlinné fenylypropanoidní analogy lignanových agonistů nebo stilbenových antagonistů¹⁰⁶, nebo molekuly s velmi nízkou toxicitou k mikroorganismům. Takovým modelem by mohly být i některé analogy esterových konjugátů juvenilních hormonů nebo steroidní saponiny jako např. aginosid, alliporin, vyskytující se v různých druzích rodu *Allium* (česnek), nebo obecně známý digitonin¹⁰⁷. Tyto saponiny se asociují s fytosteroly důležitými to prekurzory zoekdysteroidů. Z toho vyplývá, že afinita zoekdysteroidového receptoru není tak vysoká, jak ukazují selektivní aktivátory a inhibitory insulinové signální kaskády, které aktivují nebo inhibují biosyntézu zoekdysteroidů¹⁰⁸.

Autoři děkují MŠMT za finanční podporu grantu 2B06024 (SUPRAFYT) a projektu MŠM 6046070901.

LITERATURA

Výběr z nejdůležitější literatury, v příloze (v elektronické verzi časopisu) jsou uvedeny zbylé citace.

- Sláma K., Romaňuk M., Šorm F. (ed.): *Insect hormones and Bioanalogs*. Springer-Verlag, New York 1974.
- Koolman J. (ed.): *Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action*. Georg Thime Verlag, Stuttgart 1989.
- Smagghe G. (ed.): *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer 2009.
- Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *The ecdysone handbook*. <http://ecdybase.org>, 3rd Edition (2002), staženo 1. srpna 2009.
- Zelený J., Havelka J., Sláma K.: *Eur. J. Entomol.* 94, 183 (1997).
- Pavlík M., Pavlíková D., Száková J., Vašíčková S., Tlustoš P.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 239 (2004).

23. Webb T. J., Powls R., Rees H. H.: *Biochem. J.* 312, 561 (1995).
42. Blackford M. J. P., Clarke B. S., Dinan L.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 329 (1997).
43. Zhang M., Kubo I.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 831 (1993).
49. Nigg H. N., Svoboda J. A., Thompson M. J., Kaplanis J. N., Dutky S. R., Robbins W. E.: *Lipids* 9, 971 (1974).
50. Webb T. J., Powls R., Rees H. H.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 809 (1996).
51. Rharrabe K., Alla S., Maria A., Sayah F., Lafont R.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65, 65 (2007).
52. Modde J. F., Lafont R., Hoffman J. A.: *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 7, 161 (1984).
53. Robinson P. D., Morgan E. D., Wilson I. D., Lafont R.: *Physiol. Entomol.* 12, 321 (1987).
54. Kubo I., Komatsu S., Asaka Y., de Boer G.: *J. Chem. Ecol.* 13, 785 (1987).
57. Hoffmann K. H., Thiry E., Lafont R.: *Z. Naturforsch., C* 45, 703 (1990).
58. Hikino H., Ohizumi Y., Takemoto T.: *J. Chem. Soc. D., Chem. Commun.* 1971, 1036.
60. Beydon P., Girault J. P., Lafont R.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 4, 139 (1987).
61. Weirich G. F., Thompson M. J., Svoboda J. A.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3, 109 (1986).
64. O'Reilly D. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 541 (1995).
65. Hägele B., Harmatha J., Pavlík M., Rowell-Rahier M.: *Entomol. Exp. Appl.* 80, 169 (1996).
67. Jedlička P., Hrdý I., Kuldová J., Wimmer Z.: *Pest Manag. Sci.* 63, 1026 (2007).
68. Lafont R., Bouthier A., Wilson I. D.: *Insect Chemical Ecology, Proceedings of a Conference in Tábor*, 197 (1991).
73. Korayem A. M., Fabbri M., Takahashi K., Scherfer Ch., Lindgren M., Schmidt O., Ueda R., Dushay M. S., Theopold U.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1297 (2004).
74. Gelman D. B., Carpenter J. E., Greany P. D.: *J. Insect Physiol.* 46, 457 (2000).
75. Hua Y. J., Bylemans D., De Loof A., Koolman J.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, R1 (1994).
76. Bylemans D., Hua Y. J., Chiou S. J., Koolman J., Borovsky D., De Loof A.: *Eur. J. Entomol.* 92, 143 (1995).
79. Hägele B. F., Rowell-Rahier M.: *J. Evol. Biol.* 13, 131 (2000).
80. Ahmad V. U., Khaliq-Uz-Zaman S. M., Ali M. S., Perveen S., Ahmed W.: *Fitoterapia* 67, 88 (1996).
82. Lehman R. M., Lundgren J. G., Petzke L. M.: *Microb. Ecol.* 57, 349 (2009).
86. Pavlík M., Jandurová O. M.: *Environ. Exp. Bot.* 44, 49 (2000).
88. Pavlík M., Váňová M., Laudová V., Harmatha J.: *Rostl. Vyr.* 46, 343 (2000).
90. Uhlík O., Ječná K., Macková M., Leigh M. B., Demmerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 102, 474 (2008).
92. Behar A., Yuval B., Jurkevitch E.: *J. Insect Physiol.* 54, 1377 (2008).
94. Lundgren J. G., Lehman R. M., Chee-Sanford J.: *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100, 275 (2007).
95. Handelsman J.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669 (2004).
97. Carneiro C. N. B., DaMatta R. A., Samuels R. I., Silva C. P.: *Protein Pept. Lett.* 15, 658 (2008).
99. Douglas A. E.: *Funct. Ecol.* 23, 38 (2009).
100. Dillon R. J., Dillon V. M.: *Annu. Rev. Entomol.* 49, 71 (2004).
101. Genta F. A., Dillon R. J., Terra W. R., Ferreira C.: *J. Insect Physiol.* 52, 593 (2006).
102. Indiragandhi P., Anandham R., Madhaiyan M., Ponguzhali S., Kim, G. H., Saravanan V. S., Sa T.: *J. Appl. Microbiol.* 103, 2664 (2007).
105. Hayashi A., Aoyagi H., Yoshimura T., Tanaka H.: *J. Biosci. Bioeng.* 103, 358 (2007).
106. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochem. Rev.* 2, 321 (2003).
108. Riehle M. A., Brown M. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 855 (1999).

M. Pavlík^a, H. Ryšavá^{a,b}, and Z. Wimmer^a
^a *Isotope Laboratory, Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,*
^b *Department of Plant Protection, Czech University of Life Sciences, Prague):* **Metabolism of Insect Ecdysteroids and Significance of Insect Intestinal Microbiota**

Metabolism of ecdysteroids, insect moulting hormones, is described including that of active (20E)-20-hydroxyecdysone, showing a low activity, and inactive 20-phosphate. Transformation of active to inactive ecdysteroids (and vice versa) must be rapid and simple, with minimum energy requirements. In addition to ecdysteroid biosynthesis from phytosterols via cholesterol, insect larvae can obtain ecdysteroids from food as nonpolar and inactive esters with fatty acids. These esters penetrate through the midgut into the hemolymph in contrast to more polar ecdysteroids. The larvae excrete useless ecdysteroids during 24 hours. Wide diversity is shown of detoxified and deactivated pathways of ecdysteroids in insects, determined by bioassay. The biotests in insects mainly ecdysteroid tests are described in detail, in relation to digestion, the influence of intestinal symbiotic microbiota, detoxification of xenobiotics and subsequent inhibition of pathogenic microorganisms. Regulation and reduction of intestinal microorganisms are affected by an increased content of (20E)-20-hydroxyecdysone during ecdysis. Based on the current knowledge, the use of ecdysis by agonist formation for plant protection in agriculture would be suitable because the specificity of ecdysteroid receptors is low and they react as activators or inhibitors of insulin signalling cascades.

SENZORICKÁ STABILITA PIVA

PAVOL NÁDASKÝ
a DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

Oddelenie biochemickej technológie, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
daniela.smogrovicova@stuba.sk

Došlo 24.7.09, prepracované 30.12.09, prijaté 14.1.10.

Kľúčové slová: pivo, senzoričná stabilita, starnutie piva, polyfenoly, antioxidantná aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Starnutie piva
3. Reakčný mechanizmus procesov starnutia piva
 - 3.1. Radikálové reakcie – reaktívne formy kyslíka (ROS)
 - 3.2. Maillardove reakcie
 - 3.3. Alfa-dikarbonylové zlúčeniny
 - 3.4. Streckerovo odbúravanie aminokyselín
 - 3.5. Aldolová kondenzácia
 - 3.6. Oxidácia nenasýtených mastných kyselín
 - 3.7. Oxidácia vyšších alkoholov
 - 3.8. Degradácia izo-horkých kyselín
4. Antioxidanty významné v pivovarníctve a ich vlastnosti
 - 4.1. Polyfenolové antioxidanty
 - 4.2. Melanoidíny a reduktóny
 - 4.3. Chelatačné činidlá
 - 4.4. Oxid siričitý
5. Záver

1. Úvod

Jedným z hlavných problémov pivovarnického priemyslu je dosiahnutie vysokej trvanlivosti piva. Súčasný trend smeruje k predaju piva vo fľašiach a plechovkách, čo je dôsledok zmeny životného štýlu a rozrastajúceho sa exportu. Vo všeobecnosti sa dnes vyžaduje až ročná garantovaná trvanlivosť. Vysoká trvanlivosť neznamena iba zachovanie čírosti, ktorá je dnes samozrejmom požiadavkou, ale tiež zachovanie aj ostatných kvalitatívnych vlastností, ako sú chuť, vôňa, farba a penivosť, a to počas transportu i pri následnom skladovaní. Žiaľ ani najlepší systém výroby a kontroly nedokáže jednoznačne zaručiť, že finálny produkt bude mať dobrú senzoričnú stabilitu¹.

Aj v pivách, ktoré sú biologicky a koloidne stabilné, môže dôjsť postupom času k nežiaducim chuťovým zmenám. Tieto zmeny sa môžu prejaviť vo veľmi krátkom čase, alebo – pri dobre chuťovo stabilizovaných pivách – až po niekoľkých mesiacoch².

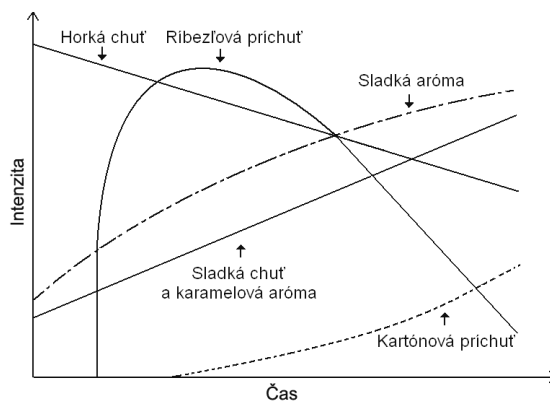
Výskumy na vzorke konzumentov piva poukázali na to, že chute a vône spôsobené starnutím piva sú nie vždy považované za senzorične nežiaduce. Oveľa dôležitejšie bolo, aby konzumenti v konkrétnej značke piva, ktorú preferovali, rozpoznali jej charakteristickú chuť. Každý presadzoval názor, že chuť danej značky piva by sa nemala meniť, avšak chuť, ktorú očakávali, bola chuť čerstvého piva. V priebehu starnutia piva dochádza k výrazným senzoričným zmenám a práve očakávaná charakteristická chuť sa môže stratiť. Je to jeden z hlavných dôvodov, prečo je starnutie piva považované za nežiaduce³.

Nasledujúce kapitoly sa venujú senzoričkej charakteristike piva, pojednávajú o chemických zmenách nastávajúcich v priebehu starnutia a o obsahu polyfenolových látok ako účinných antioxidantov.

2. Starnutie piva

Vplyvom skladovania (starnutia) stráca pivo svoje charakteristické senzoričné vlastnosti a získava skôr či neskôr takzvanú starú chuť. Kvalita piva môže byť poškodená prítomnosťou menej príjemných až vyslovene nepríjemných vôní a chutí, ktoré nazývame cudzie.

Dalgliesh⁴ detailnejšie popísal senzoričné zmeny, ktoré nastávajú počas starnutia piva (obr. 1). Dochádza ku konštantnému poklesu horkosti a zároveň k postupnému



Obr. 1. Senzoričné zmeny počas starnutia piva⁴

zvyšovaniu sa sladkej chuti. Vznik karamelových a pripálených chutí a vôní sa prekrýva so sladkou chuťou. Ďalej dochádza k rapidnému nárastu ríbeľovej príchuti, ktorá však postupom času klesá. Podľa Dalglisha⁴ k rozvinutiu kartónovej príchuti dochádza až po poklese intenzity ríbeľovej. Kartónová príchuť konštantne stúpa až kým nedosiahne maximum, následne tiež klesá. Pozitívne sensorické vlastnosti piva, ako sú esterová, ovocná alebo kvetová aróma, majú klesajúcu tendenciu. Pre celkový dojem je pokles sensoricky pozitívnych aróm tak isto dôležitý ako rozvoj starých chutí a vôní.

V súčasnosti sa využívajú na určenie zmien sensorického profilu piva počas starnutia aj chromatografické prístroje, headspace analýza s tzv. elektronickým nosom, čo vyvoláva diskusie o úlohe profesionálnych degustátorov na jednej strane a inštrumentálnych prístrojoch na strane druhej. McKellar a spol.⁵ pri štúdiu vplyvu starnutia piva na profil jeho sensoricky aktívnych látok zistili, že elektronický nos bol schopný zachytiť oveľa jemnejšie zmeny ako degustačná komisia. Bamforth⁶ prišiel k záveru, že určenie sensorických vlastností piva je veľmi komplikovaná záležitosť, pričom záleží na cieľi, pre ktorý sa to robí. Aj keď neexistujú chodiace chromatografy – ľudské bytosti schopné určovať koncentráciu určitých látok, školení degustátori sú dostatočne schopní relatívne objektívne posúdiť sensorické vlastnosti piva aj pri istých obmedzeniach, ktoré sú dané psychologickými aspektmi celého procesu. Je dôležité si uvedomiť, že ich vkus nemusí byť v súlade s vkusom zákazníka⁷.

Na starnutie piva vplyva veľa rozličných faktorov a môžu byť jednoducho rozdelené na vnútorné faktory (napr. zloženie piva) a vonkajšie faktory (napr. podmienky, ktorým je pivo vystavené počas skladovania a transportu). Kyslík je v dnešnej dobe jedným z najštudovanejších vnútorných faktorov⁸.

Kontakt piva s kyslíkom spôsobuje veľmi rýchle zhoršenie chuti a vône a sensorická zmena závisí od obsahu kyslíka vo fľaši. Zistilo sa však, že starnutie prebieha aj keď je koncentrácia kyslíka znížená na minimum, čo naznačuje, že starnutie piva môže byť čiastočne aj neoxidačný proces.

Okrem koncentrácie kyslíka výrazne ovplyvňuje starnutie piva teplota, pretože je od nej závislá rýchlosť chemických reakcií. Zvýšenie reakčnej rýchlosti pre určité zvýšenie teploty závisí od aktivačnej energie danej reakcie. Táto aktivačná energia je rozdielna pre rôzne typy reakcií čo znamená, že rýchlosť rozdielnych reakcií sa nezvyší rovnako so zvýšením teploty. Preto v pive skladovanom pri rôznych teplotách nedochádza k rovnakému nárastu sensoricky nežiaducich zlúčenín. Kaneda, Kobayashi, Furusho, Sahara a Koshino⁹ to potvrdili svojimi meraniami a zistili, že v pive skladovanom pri 25 °C prevládala karamelová aróma, zatiaľ čo pri 30–37 °C bola dominantná príchuť po kartóne.

Sensorické zmeny, ku ktorým dochádza počas starnutia, sú veľmi komplexným problémom a závisia hlavne od typu piva, koncentrácie kyslíka a teploty skladovania.

3. Reakčný mechanizmus procesov starnutia piva

Počas skladovania piva môže dochádzať k zmene koncentrácie mnohých sensoricky aktívnych látok nachádzajúcich sa v pive, a to k:

- zníženiu koncentrácie sensoricky aktívnych látok, ktoré vedie k zhoršeniu arómy stratou požadovaného sensorického charakteru piva,
- zvýšeniu koncentrácie sensoricky aktívnych látok, ktoré vedie k zhoršeniu arómy zvýšením nežiaduceho sensorického charakteru piva.

Z chemického hľadiska je pivo vodno-etanolovým roztokom s pH okolo 4,2, v ktorom sú rozpustené stovky rôznych molekúl. Z hľadiska sensorickej kvality piva sú dôležité karbonylové zlúčeniny a ich prekursori, ktorým sa pripisuje zásadný vplyv na sensorické vlastnosti.

Starnutie piva je zložitý komplexný proces, ktorý zahŕňa niekoľko rôznych mechanizmov. Jednotlivé mechanizmy sa nevyklučujú a môžu pôsobiť súčasne. Reakcie vytvárajúce látky, ktoré narušujú sensorickú stabilitu piva, môžeme rozdeliť do nasledujúcich skupín:

- radikálové reakcie – reaktívne formy kyslíka a dusíka (RONS),
- Maillardove reakcie,
- tvorba α -dikarbonylových zlúčenín,
- Streckerovo odbúravanie aminokyselín,
- aldolové kondenzácie nižších karbonylov,
- oxidácia nenasýtených mastných kyselín,
- oxidácia vyšších alkoholov,
- oxidačná degradácia izo-horkých kyselín,
- sekundárne oxidácie vyšších aldehydov,
- fotooxidačné reakcie piva.

3.1. Radikálové reakcie – reaktívne formy kyslíka (ROS) a dusíka (RNS)

Aj napriek snahe pivovarníckych technológov minimalizovať kontakt všetkých surovín, medziproduktov výroby a hotového piva s kyslíkom, môže i z nepatrného množstva tohto prvku v stabilnom stave vznikajú dodaním energie vo forme svetla alebo tepla, prípadne katalytickým účinkom kovových iónov veľké množstvo reaktívnych foriem (obr. 2), ktoré sa súhrnne označujú skratkou ROS (Reactive Oxygen Species)¹¹.

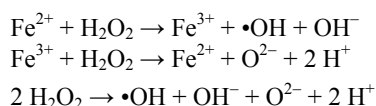
Kyslík v základnom stave ($^3\text{O}_2$) je stabilný a nevstupuje ľahko do reakcie s organickými molekulami. V prítomnosti železných iónov (Fe^{2+}) v pive, kyslík môže prijať elektrón a vznikne superoxidový anión (O_2^-) a Fe^{3+} . Ióny medi môžu vystupovať v procese oxidácie podobne ako ióny železa a Cu^+ sa oxiduje na Cu^{2+} . Má sa za to, že $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ a $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ióny sú súčasťou oxidačného systému v ktorom polyfenoly, cukry, izo- α -horké kyseliny a alkoholy vystupujú ako donory elektrónov¹². Superoxidový anión môže prijať protón za vzniku perhydroxylového radikálu ($\text{OOH}\cdot$), ktorý je oveľa reaktívnejší. pKa tejto

Tabuľka I
Zlúčeniny vznikajúce počas skladovania piva¹¹

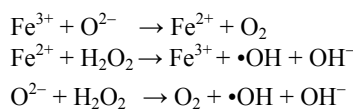
Skupina látok	Zlúčenina	
Aldehydy	acetaldehyd (<i>E</i>)-non-2-enál (<i>E</i>)-okt-2-enál (<i>E,E</i>)-deka-2,4-dienál (<i>E,E</i>)-nona-2,6-dienál	2-metylbutanál 3-metylbutanál benzaldehyd 2-fenylacetaldehyd 3-(metylsulfanyl)propanál
Ketóny	<i>E</i> -β-damascenón biacetyl 3-metylbutan-2-ón	4-metylbutan-2-ón 4-metylpentan-2-ón pentan-2,4-dión
Cyklické acetály	2,4,5-trimetyl-1,3-dioxolán 2-izopropyl-4,5-dimetyl-1,3-dioxolán	2-izobutyl-4,5-dimetyl-1,3-dioxolán 2- <i>sek</i> -butyl-4,5-dimetyl-1,3-dioxolán
Heterocyklické zlúčeniny	furaldehyd 5-(hydroxymetyl)furaldehyd 5-metylfuraldehyd 2-acetylfurán 2-acetyl-5-metylfurán 2-propionylfurán furán (2-furyl)metanol etyl(2-furfurylmetyl)éter 5-(etoxymetyl)furaldehyd	2-etoxy-2,5-dihydrofurán maltol 5,5-dietylfuran-2(5 <i>H</i>)-ón 5,5-dimetylfuran-2(5 <i>H</i>)-ón 2-acetylpyrazín 2-metoxypyrazín 2,6-dimetylpyrazín trimetylpyrazín tetrametylpyrazín
Etyl estery	etyl-3-metylbutanoát etyl-2-metylbutanoát etyl-2-metylpropanoát etyl-nikotinát dietyl-sukcinát	etyl-laktát etyl-fenylacetát etyl-formát etyl-cinnamát
Laktóny	nonano-4-laktón hexano-4-laktón	
Sírne zlúčeniny	dimetyltrisulfid 3-metyl-3-sulfanylbutyl-formát	

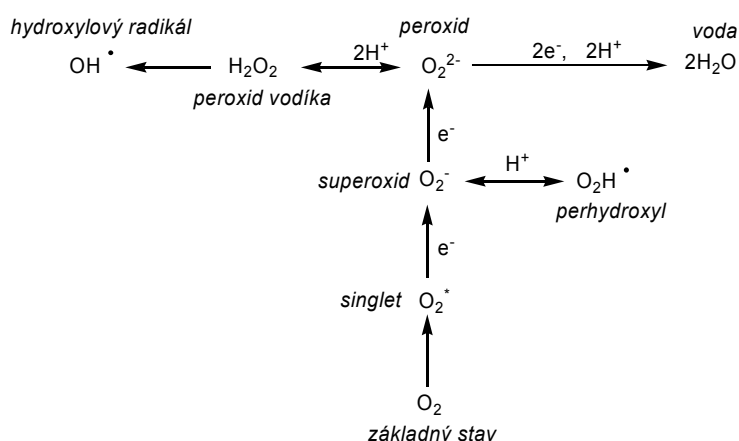
reakcie je 4,8 čo znamená, že pri pH piva bude najväčšia časť superoxidu vo forme perhydroxyly. Superoxidový anión môže byť ďalej redukovaný iónmi Fe^{2+} a Cu^+ na peroxidový anión (O_2^{2-}). V pive je tento anión ľahko protonizovaný za vzniku peroxidu vodíka (H_2O_2). Hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) môže byť následne vytvorený z H_2O_2 alebo zo superoxidového aniónu O_2^- reakciami, ktoré sú katalyzované iónmi kovov, ako sú Fentonova a Haber-Weissova reakcia:

Fentonova reakcia



Haber-Weissova reakcia





Obr. 2. Premeny reaktívnych zlúčenín kyslíka

Hydroxylové radikály sú jedny z najreaktívnejších radikálov vôbec, ktoré boli identifikované. Hydroxylový radikál veľmi často neselektívne reaguje s etanolom. Etanol je hneď po vode druhá najzastúpenejšia zložka piva a je dobrý vychytávač voľných radikálov. Zistenia Anderse- na a Skibsteda¹³ dokazujú, že takto vzniknutý 1-hydroxy- etylový radikál je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcim radikálom v pive. Konečným degradačným produktom tejto reakcie je acetaldehyd.

Reaktivita rôznych foriem kyslíka vzrastá v smere superoxidový anión < perhydroxylový radikál < hydroxy- lový radikál. Množstvo voľných radikálov počas starnutia piva rastie s rastúcou koncentráciou iónov meďi a železa, s rastúcou koncentráciou kyslíka vo fľaši a so vzrastajúcou teplotou skladovania. Reakcie voľných radikálov prebieha- jú pri nízkych teplotách len veľmi pomaly.

Podobne ako v pive vznikajú rôzne reaktívne formy kyslíka, dôležitú úlohu pri procesoch starnutia piva majú aj reaktívne formy dusíka (RNS). Tieto reaktívne formy sa často nazývajú súhrnným názvom RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species). Medzi RONS patria okrem voľných radikálov aj také zlúčeniny, ktoré ľahko oxidujú iné látky alebo sa na radikály menia. Významným dusika- tým radikálom je oxid dusnatý •NO, ktorý prednostne rea- guje s inými paramagnetickými látkami. Do reakcie vstu- puje aj s iónmi železa, s molekulárnym kyslíkom (vzniká dusitanový anión NO₂⁻) a inými radikálmi ako napríklad so superoxidovým aniónom. Pri reakcii so superoxidovým aniónom dochádza k vzniku peroxyinitritu (ONOO⁻). Pero- xynitrit ako aj jeho konjugovaná kyselina sú veľmi silné oxidačné činidlá, preto môžu ľahko oxidovať ostatné látky nachádzajúce sa v pive.

3.2. Maillardove reakcie

Maillardove reakcie prebiehajú väčšinou počas prí- pravy mladiny (rmutovania) z dôvodu vyšších teplôt pou- žívaných pri týchto procesoch, niektoré reakcie však pre- biehajú aj pri oveľa nižších teplotách počas skladovania.

Maillardove reakcie, iniciované reakciou redukujúce- ho sacharidu a animokyseliny vedú ku vzniku komplexnej sieti rôznych reakčných mechanizmov, ktoré do dnes nie sú úplne objasnené. Neenzymatické reakcie hneďnutia prebiehajú takmer vo všetkých spracovávaných potravinár- skych produktoch a preto prebiehajú aj počas prípravy mladiny a pokračujú pri skladovaní piva¹⁴.

Po ukončení rmutovania obsahuje mladina 10 % glu- kózy, 60–70 % maltózy a 20–30 % maltotriózy. V dôsled- ku vysokej koncentrácie týchto sacharidov a prítomnosti rôznych aminozlúčenín dochádza veľmi rýchlo k Maillar- dovým reakciám počas chmeľovaru. Z kvantitatívneho hľa- diska sú 5-hydroxymetylfurfural (HMF, pochádzajúci z hexózy) a furfural (pochádzajúci z pentózy) jedny z najzau- jímavejších Maillardových monomérov v mladine. Vzni- kom monoméryných zlúčenín však Maillardove reakcie nekončia a ďalšími reakciami (kondenzácia, cyklizácia, dehydratácia, izomerizácia) vznikajú vysokofarebné mel- anoidíny. Hoci bolo navrhnutých niekoľko modelov štruk- túry melanoidínov, väčšina z nich zostáva do dnes neobjasnená^{15–17}.

Maltóza, maltotrióza a iné malto-oligosacharidy pat- ria podobne ako glukóza medzi redukujúce cukry a vstu- pujú do reakcií s aminozlúčeninami za vzniku α- dikarbonylových zlúčenín mechanizmom, ktorý navrhl Hollnagel a Kroh¹⁸.

3.3. Alfa-dikarbonylové zlúčeniny

Aj počas skladovania piva pri izbovej teplote dochádza k Maillardovým reakciám. Počas tohto procesu bol pozorovaný vznik desiatich rôznych α -dikarbonylových zlúčenín¹⁴. Vznik a akumulácia týchto zlúčenín v pive naznačuje, že Streckerova degradácia ako aj degradácia Amadoriho medziproduktov prebieha počas starnutia piva aj pri skladovaní pri nižších teplotách. Vzhľadom na centrálnu úlohu α -dikarbonylových zlúčenín v procese Maillardových reakcií môže blokovanie týchto medziproduktov zabrániť vzniku typických zlúčenín zodpovedajúcich za starú príchuť piva. Použitím tzv. "vychytávacích" činidiel, ako napr. aminoguanidinu, dochádza k rýchlej a irreverzibilnej reakcii s dikarbonylovými zlúčeninami za vzniku 3-aminotriazínu a tým sa zabráni vstupu dikarbonylových zlúčenín do ďalších reakcií, ktoré by viedli ku vzniku konečných produktov, napr. HMF.

3.4. Streckerovo odbúravanie aminokyselín

Je nazvaná podľa Adolfa Streckera, ktorý už v roku 1862 publikoval, že α -alanín môže byť alloxanom rozkladaný na acetaldehyd a oxid uhličitý. Tento typ reakcie je súčasťou Maillardových reakcií, ktoré vedú k rozkladu α -aminokyseliny za vzniku aldehydu, obsahujúceho o jeden atóm uhlíka menej ako pôvodná aminokyselina. Pri reakcii sa predpokladá prítomnosť α -dikarbonylových zlúčenín, ktoré predtým vznikajú oxidáciou aromatických alebo alifatických zlúčenín so susednými hydroxylovými skupinami, poprípade Amadoriho prešmykom v priebehu Maillardových reakcií.

Z najbežnejších látok, ktoré sa zúčastňujú na odbúrání aminokyselín, možno uviesť kyselinu pyrohroznovú, diacetyl a kyselinu dehydroaskorbovú¹⁹. Napríklad z aminokyseliny leucín vzniká 3-metylbutanal, z valínu 2-metylpropanal, z metionínu metanal, z fenylalanínu fenylacetaldehyd a za prítomnosti maltózy a meďnatých iónov aj benzaldehyd^{20,21}.

3.5. Aldolová kondenzácia

Aldolová kondenzácia nižších aldehydov, vzniknutých najčastejšie Streckerovou degradáciou má za následok vznik aldehydov s dlhším reťazcom. Kondenzáciou acetaldehydu a *n*-heptanal vzniká napr. aj (*E*)-non-2-enál dodávajúci pivu nepríjemnú kartónovú arómou. Katalytickú funkciu aldolovej kondenzácie plnia aminokyseliny, tvoriace s aldehydmi iminový medziprodukt²². Touto cestou dochádza k tvorbe karbonylových zlúčenín s nižším prahovým vnemom z karbonylových zlúčenín nachádzajúcich sa v pive, ktoré sú menej senzoricke aktívne a ktoré môžu vzniknúť inými reakciami.

3.6. Oxidácia nenasýtených mastných kyselín

Cesta, ktorou sa oxidačne degradujú nenasýtené mastné kyseliny za vzniku rôznych senzoricke významných

karbonylových zlúčenín môže byť dvojaká: enzymatická a neenzymatická.

Enzymatická oxidácia kyseliny linolénovej na (*E*)-non-2-enál vyvolá typickú vôňu piva po kartóne, papieri^{23,24}. Lipoxygenázy (spoločný termín pre enzýmy jačmeňa), ktorých koncentrácia sa pri rmutovaní zvyšuje, oxidujú kyselinu linolénovú na hydroxykyselinu. Táto je ďalej štiepená na kratšie reťazce aldehydov. Pri oxidácii lipidov sa generujú aj lipidové hydroperoxydy, ktoré sú bez chuti a vône (napr. kyselina linolénová – linoleový hydroperoxid). Tieto hydroperoxydy sú veľmi nestabilné a rozpadajú sa sekundárne na reakčné produkty ako karbonyly, kyseliny a estery²⁵.

Konkrétne (*E*)-non-2-enál vzniká z kyseliny linolénovej pôsobením lipoxygenázy 1 za vzniku 9-hydroperoxidu, ktorého rozkladom vzniká (*Z*)-non-3-enál a ten okamžite izomerizuje na (*E*)-non-2-enál.

Neenzymatická oxidácia vedie k vzniku podobných hydroperoxidov, resp. peroxyradikálov ako cesta enzymatická, pričom katalytický účinok enzýmov je nahradený oxidáciou prostredníctvom aktívnych foriem kyslíka. Reakcia je autokatalytická, oxidačné produkty sami katalyzujú a urýchľujú reakciu²². V reakcii vystupuje voľný radikál kyslíka, prijíma elektróny a stáva sa z neho superoxidový, peroxidový a nakoniec najtoxickejší hydroxylový radikál, ktorý je schopný spustiť veľmi nebezpečnú reťazovú reakciu voľných radikálov, končiacu až úplnou deštrukciou mastných kyselín.

3.7. Oxidácia vyšších alkoholov

Pôvod vyšších alkoholov vznikajúcich počas kvasenia spočíva v prevažnej miere v premene aminokyselín, pričom sa primárne vznikajúce aldehydy redukujú na alkoholy. Pri starnutí piva sa môžu alkoholy opäť oxidovať na aldehydy, ktoré slúžia ako indikátory starnutia²⁶. Hashimoto²⁷ sa presvedčil, že vyššie alkoholy prítomné v pive sú oxidované melanoidínmi vo väčšej miere, ako molekulárnym kyslíkom. Tak počas skladovania vznikajú prchavé aldehydy. Transport elektrónov z vyšších alkoholov prechádza na karbonylovú skupinu melanoidínov. Hoci molekulárny kyslík neoxiduje alkoholy priamo, jeho prítomnosť urýchľuje oxidáciu spôsobenú melanoidínmi²⁷.

3.8. Degradácia izo-horkých kyselín

Izohumulóny, izokohumulóny a izoadhumulóny majú typickú reaktívnu štruktúru, ktorá má v tautoménej forme tri karbonylové skupiny. Oxidáciou izohumulónov vzniknú odštiepením bočného reťazca karbonyly s krátkym reťazcom (aldehydy). Zistilo sa, že tejto reakcii rýchlejšie podliehajú *trans*-izo- α -horké kyseliny ako *cis* izoméry. Meraniami to potvrdil Araki a spol.²⁸. Sledovali pomocou metódy HPLC zmeny obsahu horkých kyselín v pive počas skladovania a našli podstatné rozdiely v rýchlosti a rozsahu redukcie izohumulónu. Obsah *trans*-izoméru klesal, zatiaľ čo *cis*-izomér ostával nezmenený. Pomer izomérov *trans* a *cis* koreloval s intenzitou starej chuti

piva. Následnou aldolovou kondenzáciou krátkych aldehydov vznikajú nenasýtené karbonyly s dlhým reťazcom, napr. *trans*-2-nonenal, izovaleral, izobutanal. Fotooxidácia izohumulónov, katalyzovaná riboflavínom, ktorý sa prirodzene nachádza v pive, môže vyvolať vznik látok, ktoré ovplyvňujú vôňu. Sulfhydrylové skupiny, ktoré vznikli po oxidácii sírnych aminokyselín, reagujú s bočnými reťazcami izo- α -horkých kyselín a H₂S.

4. Antioxidanty významné v pivovarníctve a ich vlastnosti

Každé pivo podlieha prirodzenému procesu starnutia. Avšak vďaka niektorým látkam, ktoré pivo obsahuje, je možné tieto procesy obmedziť²⁹. Z biologického pohľadu významný antioxidant je taká zlúčenina, ktorá v malej koncentrácii v reakcii s reaktívnym metabolitom (prooxidantom) tvorí relatívne stabilné a netoxické produkty. Tým zabráni oxidácii cieľovej molekuly. Produkt reakcie oxidanta s antioxidantom by nemal spúšťať ďalšie radikálové reakcie, pri ktorých by sa tvorili nové voľné radikály alebo reaktívne metabolity kyslíka a oxidované substráty.

Podľa Kochhara a Rossella³⁰ môžeme antioxidanty rozdeliť do piatich skupín:

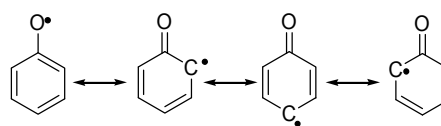
- primárne antioxidanty (polyfenolové zlúčeniny, tokoferoly, butylhydroxyanzol a i.),
- zlúčeniny reagujúce priamo s kyslíkom (kyselina askorbová),
- sekundárne antioxidanty, rozkladajúce hydroperoxydy na stabilné produkty,
- enzymatické antioxidanty,
- chelatačné a maskujúce činidlá (kyselina citrónová, aminokyseliny, EDTA).

4.1. Polyfenolové antioxidanty

Polyfenolové zlúčeniny sú významnými antioxidantmi v rôznych systémoch. Všeobecne 70–80 % polyfenolových látok piva pochádza zo sladu a ostatných 20–30 % z chmeľu. Polyfenoly môžu pôsobiť ako antioxidanty tromi rôznymi spôsobmi:

- ako lapače (scavengery) voľných radikálov^{31,32},
- sú schopné inhibovať aktivitu lipoxygenáz³³,
- sú schopné pôsobiť ako chelatačné činidlá³⁴.

Rozdiel medzi antioxidantami a lapačmi voľných radikálov je ten, že antioxidanty zabraňujú oxidácii nenasýtených mastných kyselín ešte pred vznikom alkylových radikálov, a tým nedochádza k vzniku hydroperoxidov. Na druhej strane scavengery nezabraňujú priamo vzniku alkylových radikálov, ktoré potom reagujú s kyslíkom a vznikajú tak peroxidové radikály, ktoré veľmi rýchlo reagujú s vodíkovým atómom scavengerov za vzniku hydroperoxidov, pričom vzniknutý hydroperoxid je pomerne stabilný a zabraňuje tak reťazovej reakcii³⁵. Polyfenoly reagujú s voľnými radikálmi za vzniku fenoxi radikálov,



Obr. 3. Stabilizácia fenoxi radikálu delokalizáciou

ktoré sú relatívne stabilné v dôsledku delokalizácie elektrónu na aromatickom kruhu zlúčeniny (obr. 3). Rovnakým mechanizmom sú najmä flavonoidy schopné pohlcovať aj iné formy kyslíka, konkrétne superoxidový anión.

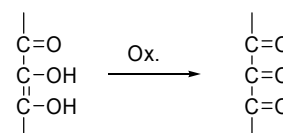
Okrem toho môžu niektoré polyfenoly vystupovať ako inhibítory lipoxygenáz v procese enzymatickej oxidácie mastných kyselín.

4.2. Melanoidíny a reduktóny

Počas hvozdenia sladu (nad 80 °C), praženia sladu (110–250 °C) a chmeľovaru dochádza k tvorbe antioxidantov Maillardovými reakciami³⁶. Medzi tieto antioxidanty patria reduktóny a melanoidíny. Redukčná kapacita reduktónov je daná prítomnosťou endiolovej skupiny (obr. 4). Typickým reduktónom je aj kyselina askorbová (vitamín C), ktorá nie je však produktom Maillardových reakcií. V procese výroby piva sa však kyselina askorbová používa skôr ako exogénny antioxidant³⁷.

Je viacerou mechanizmov ktorými môžu produkty Maillardových reakcií pôsobiť ako antioxidanty³⁸ a existuje priama závislosť medzi farbou sladu (a tým aj hotového piva) a antioxidačnou aktivitou. Antioxidačná aktivita reduktónov priamo úmerne stúpa s farbou sladu. Do druhej skupiny antioxidantov, ktoré vznikajú Maillardovými reakciami, patria antioxidanty s antiradikálovým účinkom, avšak v tomto prípade nebola zistená závislosť medzi intenzitou hnednutia a efektivitou vychytávania kyslíkových radikálov³⁹.

Štúdie^{40–42} zaoberajúce sa antioxidačnými vlastnosťami melanoidínov naznačili, že je veľmi ťažké určiť štruktúrne znaky zodpovedné za antioxidačnú aktivitu. Okrem toho, melanoidíny a ich prekursori môžu mať aj prooxidačnú aktivitu⁴³.



endiolová skupina

Obr. 4. Oxidácia reduktónu

Množstvo antioxidantov vytvorených Maillardovými reakciami a karamelizáciou sacharidov je nízke vo svetlých sladoch, ale významné v špeciálnych tmavých sladoch. Vyššia redukčná sila mladiny a piva vyrobeného z tmavých sladov môže viesť k lepšej senzorickej stabilite⁴⁴.

4.3. Chelatačné činidlá

Okrem polyfenolov, rôzne iné zlúčeniny v mladine a pive, ako napr. aminokyseliny, kyselina fytová a melanoidíny môžu slúžiť ako chelatačné činidlá pre kovové ióny (najmä medi a železa), čím zabráňujú katalytickej funkcii týchto iónov pri oxidačno-redukčných premenách. V mladine a pive existuje určitá rovnováha medzi voľnými a chelátovanými iónmi kovov³⁴.

4.4. Oxid siričitý

Premena síranov pomocou kvasiniek je hlavným endogénnym zdrojom oxidu siričitého v pive. Rôzne merania využívajúce metódou ESR dokázali, že oxid siričitý je jedným z najefektívnejších antioxidantov piva. Jeho prítomnosť oddialila tvorbu voľných radikálov (hlavne 1-hydroxyetyl radikálu) meraných pomocou ESR spinového lapača. Jeho účinnosť ako antioxidanta je daná jeho dvomi elektrónmi, pričom pri reakcii s peroxidmi sa netvoria žiadne radikály.

5. Záver

Skladovaním piva v spotrebiteľských obaloch sa nepriaznivo menia jeho senzorické vlastnosti. Dochádza k tzv. starnutiu piva, ktoré sa prejavuje najmä tvorbou cudzích chutí a vôní, spôsobených prevažne vznikom karbonylových zlúčenín. Preto zachovanie čo najvyššej senzorickej stability je jedným zo základných cieľov výroby piva.

Na zhoršenie senzorickej stability majú vplyv fyzikálne faktory pri jeho skladovaní, t.j. vyššia teplota, pohyb a svetlo. Dôležitý význam majú aj chemické faktory pri samotnej výrobe piva, ako napr. prítomnosť kyslíka vo varnom procese a hlavne vyšší obsah rozpusteného kyslíka pri stáčaní piva. Priaznivý vplyv má naopak prítomnosť antioxidantov, medzi ktoré patria niektoré polyfenolové látky, oxid siričitý a prípadne kyselina askorbová.

Je zrejmé, že problematika starnutia a senzorickej stability piva je rozsiahla a výskum v danej oblasti ani z ďaleka nie je ukončený. Treba však poznamenať, že procesu starnutia sa nedá úplne zabrániť. Väčšina reakcií, ktoré sú zodpovedné za senzorickejšiu nestabilitu, sa nedá úplne eliminovať, ale ich účinok sa dá v mnohých prípadoch minimalizovať.

Práca bola vypracovaná vďaka podpore Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA, reg. č. 1/0786/08.

LITERATÚRA

- Čepička J., Karabín M.: Chem. Listy 96, 90 (2002).
- Kosař K., Procházka S. (ed.): *Technologie výroby sladu a piva*. Výskumný ústav pivovarský a sladařský a.s., Praha 2000.
- Stephenson W. H., Bamforth C. W.: J. Inst Brew. 108, 406 (2002).
- Dalgliesh C. E.: *16th European Brewery Convention Congress, Amsterdam, 1977*, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., str. 623, 1977.
- McKellar R. C., Young J. C., Johnson A., Knight K. P., Lu X., Bottenham S.: Techn. Q. Master Brew. Assoc. Am. 39, 99 (2002).
- Bamforth Ch.: Brew. Distill Int. 32, 20 (2001).
- Simpson W. J., Canteranne E.: Brauwelt Int. 19, 280 (2001).
- Victor R. Preedy: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, London 2009.
- Kaneda H., Kobayashi M., Furusho S., Sahara H., Koshino S.: Techn. Q. Master Brew. Assoc. Am. 32, 90 (1995).
- Vanderhaegen B., Neven H., Verachtert H., Derdelinckx G.: Food Chem. 95, 357 (2006).
- Šavel J., Zdvihalová D.: Kvasny Prum. 44, 171 (1998).
- Kaneda H., Kano Y., Koshino S., Ohyanishiguchi H.: J. Agric. Food Chem. 40, 2102 (1992).
- Andersen M. L., Skibsted L. H.: J. Agric. Food Chem. 46, 1272 (1998).
- Bravo A., Sanchez B., Scherer E., Herrera J., Rangel-Aldao R.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 39, 13 (2002).
- Tressl R., Wondrak G. T., Garbe L. A., Kruger R. P., Rewicki D.: J. Agric. Food Chem. 46, 1765 (1998).
- Cammerer B., Jalyschkov V., Kroh L. W.: Int. Congr. Ser. 1245, 269 (2002).
- Adams A., Tehrani K. A., Kersiene M., Venskutonis R., DeKimpe N.: J. Agric. Food Chem. 51, 4338 (2003).
- Hollnagel A., Kroh L. W.: J. Agric. Food Chem. 48, 6219 (2000).
- Takácsová M., Pribela A.: *Chémia potravín*. STU, Bratislava 1996.
- Basařová G., Janoušek J.: Kvasny Prum. 46, 233 (2000).
- Veselý P., Boháč J., Basařová G.: Kvasny Prum. 47, 276 (2001).
- Hashimoto N., Kuroiwa Y.: Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 33, 104 (1975).
- Drost B. W., Van Eerde P., Hoekstra S. F., Strating J.: *13th European Brewery Convection Congress, Estoril, 1971*, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., str. 451, 1971.
- Jamieson A.M., Van Gheluwe J. E. A.: Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 29, 192 (1970).
- De Bruck A., De Rouck G., Aerts G., Bonte S.: Cerevisia 23, 25 (1998).

26. Šavel J., Zdvihalová D.: *Kvasny Prum.* 45, 67 (1999).
27. Hashimoto N.: *Rep. Res. Lab. Kirin. Brew.* 31, 19 (1988).
28. Araki S., Takashio M., Shinotsuka K.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60, 26 (2002).
29. Back W., Franz O., Nakamura T.: *Brauwelt Int.* 141, 209 (2001).
30. Kochhar S. P., Rossell J. B.: *Food Antioxidant*. Elsevier, Londýn 1990.
31. Hussain S. R., Cillard J., Cillard P.: *Phytochemistry* 26, 2489 (1987).
32. Torel J., Cillard J., Cillard P.: *Phytochemistry* 25, 283 (1986).
33. Boivin P., Malanda M., Maillard M. N., Berset C., Hugues M., Forget-Richard F., Nicolas J.: *25th European Brewery Convection Congress, Brussels, 1995*, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., str. 159, 1995.
34. Bamforth C. W.: *Brauwelt Int.* 48, 98 (1999).
35. Lacan F., Soulet S., Arnaudinaud V., Nay B., Verge S., Castagnino C., Delaunay J. C., Chèze C., Vercauteren J.: *Cerevisia* 25, 35 (2000).
36. Boivin P., Allain D., Clamagirant V., Maillard M. N., Cuvelier M. E., Berset C., Richard H., Nicolas J., Forget-Richard F.: *24th European Brewery Convection Congress, Oslo, 1993*, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., str. 397, 1993.
37. Andersen M. L., Outtrup H., Skibsted L. H.: *J. Agric. Food. Chem.* 48, 3106 (2000).
38. Ames J. M.: *Cerevisia* 26, 210 (2001).
39. Morales F. J.: *Anal. Chim. Acta* 534, 171 (2005).
40. Wijewickreme A. N., Kitts D. D., Durance T. D.: *J. Agric. Food. Chem.* 45, 4577 (1997).
41. Wijewickreme A. N., Kitts D. D.: *J. Food Sci.* 63, 466 (1998).
42. Wijewickreme A. N., Krejpcio Z., Kitts D. D.: *J. Food Sci.* 64, 457 (1999).
43. Hashimoto, N.: *J. Inst. Brew.* 78, 43 (1972).
44. Griffiths D. J., Maule A. P.: *26th European Brewery Convection Congress, Maastricht, 1997*, Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., str. 267, 1997.

P. Nádaský and D. Šmogrovičová (*Department of Biochemical Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Sensory Stability of Beer**

This review summarises current data on chemical origin of various aging flavours and the reaction mechanisms responsible for their formation. The formation of typical flavours during beer storage could be linked to the Maillard reactions, formation of straight-chain aldehydes, ester formation, ester degradation, acetal formation, etherification and degradation of hop bitter compounds. Most of the reactions cannot be avoided, but they can be minimized. In addition to the storage temperature and conditions, the characteristics of aging beer are affected mainly by its chemical composition. Polyphenols present in beer act as antioxidants, which are involved in maintaining physical and chemical stability of beer by elimination of free radicals.

ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD CHEMICKOU OXIDACÍ HYDROXYLOVÝMI RADIKÁLY

LIBOR DUŠEK

*Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice
libor.dusek@upce.cz*

Došlo 22.9.08, přepracováno 1.2.10, přijato 18.2.10.

Klíčová slova: hydroxylový radikál, procesy AOP, Fentonova oxidace, fotolýza, fotokatalýza

Obsah

1. Úvod
2. Procesy chemické oxidace využívající hydroxylový radikál
 - 2.1. Fentonova oxidace
 - 2.2. Modifikace Fentonovy oxidace
 - 2.3. Foto-Fentonova oxidace
 - 2.4. Fotokatalytická oxidace
 - 2.5. Fotolýza peroxidu vodíku UV zářením
 - 2.6. Procesy využívající ozon
3. Mechanismy ataku organického polutantu hydroxylovými radikály
4. Perspektivy využívání pokročilých oxidačních procesů při čištění průmyslových odpadních vod
5. Závěr

1. Úvod

Sanačních technologie používané při čištění odpadních vod a starých ekologických zátěží zaznamenaly rychlý rozvoj. Společným a často se vyskytujícím požadavkem podmiňujícím průmyslovou aplikaci je jejich schopnost odbourávat toxické a často také perzistentní organické polutanty, které vzdorují nebo přímo deaktivují tradičně používaný biologický stupeň, tvořící nedílnou součást většiny ČOV¹. Součástí nových technologií jsou obvyklé separační techniky^{2,3} (adsorpce, stripování, membránové procesy aj.) a procesy, které přímo rozkládají organické polutanty, využívající přitom obvykle chemické oxidace a redukce. Jsou-li výslednými produkty chemické oxidace organických polutantů CO₂, H₂O a další neškodné anorganické sloučeniny, hovoříme o mineralizaci organické matrice. Odpadní vody předupravené, nejlépe přímo v průmyslovém komplexu, technologií zahrnující proces chemické oxidace, pak mohou být dočištěny v ČOV běžným způsobem, aniž se likviduje aktivovaný kal.

V souvislosti s průmyslovou aplikací chemické oxidace odpadních vod se často vyskytují polutanty, které jsou obvyklými oxidačními činidly (KMnO₄, K₂Cr₂O₇ a Na₂S₂O₈) oxidovatelné pouze obtížně a částečně⁴. Je-li třeba snížit vodárenské ukazatele CHSK či TOC nebo dokonce je-li požadována mineralizace organické matrice, jsou pak postupy založené na těchto oxidačních činidlech prakticky bezcenné. Účinnost oxidovadla vyplývá z jeho oxidačního potenciálu (tab. I). Náchylnost polutantu k oxidaci vyjadřuje poměr ukazatelů BSK, CHSK_{Cr} a zejména TSK udávající spotřebu O₂ v mg l⁻¹ (cit.⁵⁻⁸).

2. Procesy chemické oxidace využívající hydroxylové radikály

Vývoj účinných oxidačních procesů vedl ke vzniku samostatné skupiny oxidačních technik označovaných jako pokročilé oxidační procesy (AOP, advanced oxidation processes)⁹⁻¹³. Ve stručnosti je lze charakterizovat těmito společnými znaky:

- bez ohledu na reakční mechanismus jsou reakčním činidlem vysoce reaktivní hydroxylové radikály OH[•],
- atak OH[•] na organický substrát je velice rychlý, rychlostní konstanty reakce druhého řádu dosahují hodnot 10⁶–10⁹ l mol⁻¹ s⁻¹,
- atak OH[•] se vyznačuje nízkou selektivitou, což dává předpoklad pro široké uplatnění AOP při předúpravě průmyslových odpadních vod s obsahem toxické organické matrice,
- AOP probíhají za normální teploty a tlaku, což s sebou přináší energetické úspory,
- možnost generovat OH[•] různými chemickými reakcemi dává procesům AOP potřebnou variabilitu při řešení praktických ekologických problémů,
- jelikož činidla potřebná pro tvorbu OH[•] radikálů jsou dosud drahá (O₃, H₂O₂), je ekonomické využívat procesy AOP na odpadní vody s hodnotou CHSK resp. TSK < 5000 mg l⁻¹, nebo je kombinovat s aerobním biologickým stupněm.

Je zřejmé, že širšímu rozšíření procesů AOP brání především ekonomický aspekt a je otázkou, jaké alternativní postupy lze použít. Pro vysoce toxické organické polutanty a CHSK > 5000 mg l⁻¹ přichází v úvahu proces mokré oxidace⁹, probíhající za zvýšených teplot (125 až 300 °C) a tlaků (0,5–20 MPa). Ekonomicky výhodný se tento proces stává při CHSK cca 20 g l⁻¹, kdy lze teplo uvolňované v průběhu oxidace využít pro ohřev reakční směsi. Při ještě vyšších hodnotách CHSK začíná mokrá oxidace konkurovat spalování odpadních vod, které je při CHSK vyšších než 200 g l⁻¹ ekonomicky jednoznačně zvýhodněno. Vraťme se ale nyní k technikám AOP a po-

Tabulka I

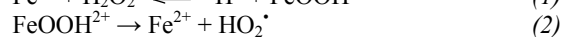
Přehled oxidačních činidel používaných pro úpravu vody a jejich standardních oxidačně-redukční potenciálů E^0 při teplotě 25 °C

Činidlo	Reakce	E^0 [V]
Fluor	$F_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2HF(aq)$	3,03
Hydroxylové radikály	$OH^\cdot + H^+ + e^- \rightleftharpoons H_2O$	2,80
Singletový kyslík	$O^1 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O$	2,42
Ozon	$O_3 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O + O_2$	2,07
Peroxydisíran sodný	$S_2O_8^{2-} + 2e^- \rightleftharpoons 2SO_4^{2-}$	2,01
Peroxid vodíku	$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	1,78
Hydroperoxylový radikál	$2HOO^\cdot + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O + O_2$	1,70
Manganistan draselný	$MnO_4^- + 8H^+ + 5e^- \rightleftharpoons Mn^{2+} + 4H_2O$	1,68
Oxid chloričitý	$ClO_2 + 4H^+ + 5e^- \rightleftharpoons Cl^- + 2H_2O$	1,57
Dichroman draselný	$Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e^- \rightleftharpoons 2Cr^{3+} + 7H_2O$	1,38
Chlor	$Cl_2 + 2e^- \rightleftharpoons 2Cl^-$	1,36
Kyslík rozpuštěný ve vodě	$O_2(g) + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$ $O_2(g) + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$	1,22 0,68

píše si nejnámější reakční systémy. Jejich přehled uvádí tab. II.

2.1. Fentonova oxidace

Historicky nejstarším procesem AOP je bezesporu Fentonova reakce, pojmenovaná podle svého objevitele, britského chemického inženýra Henryho Johna Horstmana Fentona (1854–1929), který v roce 1890 objevil oxidaci činidlem obsahujícím ionty Fe^{2+} a peroxid vodíku. V literatuře je reakce často zmiňována v souvislosti s oxidačním odbouráváním etherů, alkoholů, fenolů, aldehydů, ketonů a dále aromátů včetně polycyklických, aminů či barviv, čehož se často využívá při odbarvování odpadních vod z textilního průmyslu^{15,51,52}. Velmi významným přínosem reakce pro chemickou předúpravu odpadních průmyslových vod je úspěšná oxidace organických halogenovaných látek, jako jsou PCB, chlorfenoly či alifatická chlorovaná rozpouštědla^{49,50}. Právě tato neselektivnost předurčuje Fentonovu reakci k čištění některých problematických typů průmyslových odpadních vod – např. z textilní výroby, či z farmaceutického nebo chemického průmyslu. Další výhodou je její malá náročnost na technologické vybavení. Potřebné chemikálie jsou relativně laciné, snadno dostupné a z pohledu zátěže pro životní prostředí neškodné. S rostoucím počtem prací se zdá, že reakční systém je složitější, než popisuje rovnice v tab. II. Při pH 2,5–3 byla pozorována také redukce iontů Fe^{3+} , rovnice (1) a (2):



Za těchto podmínek lze jako katalyzátor reakce v jistém smyslu považovat i samo železo. Kapacita zaříze-

ní musí vycházet z faktu, že nezbytná doba prodlevy v oxidačním reaktoru je nejméně 2–4 h (cit.^{2,3}). Oxidaci předchází úprava pH, prováděná nejčastěji vápenným mlékem, přičemž vysrážené soli např. $CaSO_4$, se oddělují sedimentací v usazovacích či filtračních. Z praxe přitom vyplývá, že nezbytná doba pro sedimentaci je alespoň 5–8 h (cit.²).

2.2. Modifikace Fentonovy oxidace

Se vzrůstajícím využitím Fentonovy reakce se hledají nové možnosti aplikace a přibývá podobných procesů, ale které již nelze označovat jako Fentonovu reakci. Typickými příklady jsou procesy využívající jako katalyzátor železo v jiném oxidačním stupni¹³, (Fe^0 , Fe^{3+}), jiné kovy (přechodné kovy jako Cu, Ti, Cr a Co)^{31–33}, popř. jiný zdroj radikálů (např. HOCl) nebo různé foto- a elektro-Fentonovy reakce⁵³.

2.3. Foto-Fentonova oxidace

Je známo, že Fentonova oxidace je silně urychlována UV zářením. To lze rozdělit podle energie resp. vlnové délky na UV-A (3,26–3,87 eV, 320–380 nm), UV-B (do 4,41 eV, 280 nm) a UV-C (do 6,52 eV, 190 nm). Do skupiny AOP procesů označovaných jako foto-Fentonova oxidace patří systémy $H_2O_2/Fe^{2+}/UV$, $H_2O_2/Fe^{3+}/UV$ nebo ozařovaný roztok peroxidu vodíku se solí tris(oxaláto)železitanu $H_2O_2/[Fe^{III}(C_2O_4)_3]^{3-}/UV$, jejichž reakční mechanismy shrnuje tab. II. Zatímco Fentonovo činidlo H_2O_2/Fe^{2+} je schopno využívat záření do cca 400 nm, systém H_2O_2/Fe^{3+} je schopen absorbovat záření do 550 nm. Oproti fotolýze lze tak při účasti Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů využívat fotony s nižší energií. Třetí z uvedených systémů založený

Tabulka II
Přehled procesů AOP a vznik hydroxylových radikálů

Proces	Reakční systém	Reakce	Lit.
Fentonova oxidace	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$	9, 15–30
Modifikovaná Fentonova oxidace	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^0$	$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+$ $\text{Fe}^0 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{OH}^-$	28–30
Foto-Fentonova oxidace	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{UV}$	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ $\text{Fe}(\text{OH})^{2+} + h\nu \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{OH}^\bullet$	31–33
	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}/\text{UV}$ $\text{H}_2\text{O}_2/[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}/\text{UV}$	$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+$ $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-} + h\nu \rightarrow [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]^{2-} + \text{C}_2\text{O}_4^{\bullet-}$ $\text{C}_2\text{O}_4^{\bullet-} + [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-} \rightarrow [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]^{2-} + \text{C}_2\text{O}_4^{2-} + 2\text{CO}_2$ $\text{C}_2\text{O}_4^{\bullet-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{CO}_2$	34–40 9
Fotokatalytická oxidace	$\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{O}_2$	$\text{TiO}_2 + h\nu \rightarrow \text{e}^- + \text{TiO}_2(\text{h}^+)$ $\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-}$ $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$ $\text{TiO}_2(\text{h}^+) + \text{OH}^- \rightarrow \text{TiO}_2 + \text{OH}^\bullet$ $\text{TiO}_2(\text{h}^+) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{TiO}_2 + \text{OH}^\bullet + \text{H}^+$	9
	$\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{TiO}_2 + h\nu \rightarrow \text{e}^- + \text{TiO}_2(\text{h}^+)$ $\text{TiO}_2(\text{h}^+) + \text{OH}^- \rightarrow \text{TiO}_2 + \text{OH}^\bullet$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$	41–45
	$\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{S}_2\text{O}_2$	$\text{TiO}_2 + h\nu \rightarrow \text{e}^- + \text{TiO}_2(\text{h}^+)$ $\text{TiO}_2(\text{h}^+) + \text{OH}^- \rightarrow \text{TiO}_2 + \text{OH}^\bullet$ $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + \text{e}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{\bullet-}$	9, 14
Fotolýza	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}-\text{C}$	$\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2\text{OH}^\bullet$ $2\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2^\bullet$ $2\text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	9, 43 44 46
Procesy využívající ozon	O_3	$\text{O}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{OH}^-$	9, 10,
	O_3/UV	$\text{O}_3 + h\nu(\lambda < 310\text{nm}) \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}(^1\text{D})^{\text{ii}}$ $\text{O}(^1\text{D}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{OH}^\bullet$	47, 48
	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{HO}_2^- + \text{H}^+$ $\text{HO}_2^- + \text{O}_3 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{O}_3^{\bullet-}$ $\text{HO}_2^- \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+$ $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_3 \rightarrow \text{O}_3^{\bullet-} + \text{O}_2$ $\text{O}_3^{\bullet-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_3^\bullet$ $\text{HO}_3^\bullet \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{O}_2$ $\text{OH}^\bullet + \text{O}_3 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{O}_2$	9, 14
	$\text{Mn}^{3+}/(\text{COOH})_2/\text{O}_3$	$\text{Mn}^{\text{III}}(\text{COO})^{2-n} + \text{O}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Mn}^{\text{II}}(\text{COO})^{2-(n-1)} + 2\text{CO}_2 + \text{HO}_2^\bullet + \text{O}_2$	9

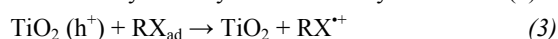
ⁱ $\text{TiO}_2(\text{h}^+)$ je aktivovaný katalyzátor obsahující elektronové vakance, ⁱⁱ $\text{O}(^1\text{D})$ metastabilní excitovaný stav atomárního kyslíku s energií 1,97 eV

na komplexech železa s kyselinou šťavelovou v přítomnosti peroxidu vodíku se rovněž osvědčil při odbourávání organických polutantů, jako jsou benzen, toluen a xylen či methyl(ethyl)keton. Ozařováním komplexu / $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$ v kyselém prostředí tak vzniká CO_2 a ion Fe^{2+} , který se může dále účastnit klasické Fentonovy oxidace. Systém je zvláště účinný při oxidaci polutantů, jež absorbují ve stejné oblasti spektra jako Fe^{3+} a H_2O_2 . Oproti předešlým systémům je spotřeba energie potřebná pro oxidaci snížena až o 80 %. To je způsobeno jednak absorpcí komplexu v rozmezí 200–400 nm, umožňující efektivní využití UV zdrojů, jednak vysokým kvantovým výtěžkem systému. Ten dosahuje hodnoty 1–1,2 oproti kvantovému výtěžku systému $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})/\text{UV}$ 0,15 (313 nm) resp. 0,017 (360 nm)¹⁰.

2.4. Fotokatalytická oxidace

Z mnoha prací je patrný trend využívat pro rozvíjející se sanační technologie některý z fotoprocusů AOP záření s $\lambda > 300$ nm. Ve většině případů však jde spíše o fotokatalýzu založenou na systému $\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{O}_2$.

Jako katalyzátor zde vystupuje oxid kovu zvyšující oxidační účinek kyslíku. Z mnoha testovaných katalyzátorů se jako nejvýhodnější dosud jeví TiO_2 anatasového typu, vyznačující se při nízké ceně vysokou stabilitou a účinností. Ozáření katalyzátoru vzniká elektronový pár a vakance – viz tab. II. Katalyzátor tedy produkuje elektrony, které redukují ve vodě rozpuštěné ionty kovů a kyslík, jež se přitom mění na superoxidový radikál $\text{O}_2^{\cdot-}$. Povrch katalyzátoru s aktivovanými elektronovými vakancemi adsorbuje H_2O nebo OH^- ionty a produkuje OH^{\cdot} . Kromě ataku OH^{\cdot} může být v některých případech na povrchu katalyzátoru adsorbovaný organický substrát oxidován přímo aktivovaným katalyzátorem ve smyslu rovnice (3):



kde $\text{TiO}_2(\text{h}^+)$ je aktivovaný katalyzátor obsahující elektronové vakance.

Většina prací studující fotokatalytické procesy se zaměřuje na využití sluneční energie^{43–46}. V současnosti probíhá i výzkum s dopovaným TiO_2 , ovšem dosud nejsou známy příklady aplikace při čištění průmyslových odpadních vod⁴⁷.

2.5. Fotolýza $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}-\text{C}$

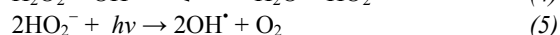
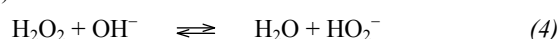
Fotolýza za přítomnosti peroxidu vodíku představuje vysoce účinný oxidační proces⁹, jsou-li splněny tyto předpoklady:

- organické polutanty jsou ve vodě rozpustné,
- koncentrace peroxidu vodíku překračuje hodnotu cca 0,1 %,
- je použit zdroj UV záření s $\lambda < 280$ nm.

Při splnění výše uvedených podmínek se dle uvedeného mechanismu (tab. II) homolyticky štěpí peroxidové vazby a vznikají dva molární ekvivalenty OH^{\cdot} . Účinnost štěpení ve vodě je oproti vzduchu snížena vlivem solvata-

ce molekul H_2O_2 , v důsledku čehož klesá kvantový výtěžek na cca 0,5 (cit.¹⁰). Hydroxylové radikály zanikají atakem další molekuly peroxidu za vzniku superoxidového radikálu HO_2^{\cdot} . Nevýhodou systému $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}-\text{C}$ je nízký molární absorpční koeficient $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ve vodě, který při 254 nm činí pouze $18,6 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. To snižuje efektivitu využití zdroje UV-C zvláště, když organický polutant současně působí jako vnitřní optický filtr^{9,10}.

Rychlost fotolýzy H_2O_2 může být vyšší za přítomnosti OH^- iontů, které produkují peroxidové aniony HO_2^- , jejichž $\epsilon_{\text{HO}_2^-}$ ve vodě je $240 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ při 254 nm (4) a (5):



2.6. Procesy využívající ozon

Ozon jako prostředek úpravy vody není novou technologií. Počátky jeho využití sahají do přelomu 19. a 20. století. Zvláště v posledních 20 letech velmi pokročily technologie výroby ozonu a tím i jeho efektivnější využití. Ozon je uznáván jako neúčinnější prostředek oxidace ve vodárenství. V odůvodněných případech jej lze doplnit dávkou H_2O_2 nebo UV zářením za účelem velice rychlé a masivní oxidace s výraznější spoluúčasti OH^{\cdot} . V praxi bývá tato technologie označována jako „peroxonová“ a lze jí odstranit např. dusitany, kyanidy, sirovodík a je-li $\text{pH} > 9$, pak i amoniak^{2,4}.

Nejjednodušší systémy $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ potřebují pro dostatečnou účinnost alkalické prostředí^{9,10}, (tab. II). Rozklad ozonu doprovází vznik OH^{\cdot} , přičemž jako iniciátor řetězové radikálové reakce vystupuje OH^{\cdot} . Reakční mechanismus současně napovídá, že v kyselém prostředí je nezbytná přítomnost H_2O_2 .

Použití systému O_3/UV zahrnuje sycení odpadní vody ozonem za současného ozařování nízkotlakou rtuťovou výbojkou. Výhodou je, oproti použití peroxidu vodíku, vysoký absorpční koeficient $\epsilon_{\text{O}_3} = 3600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ při 254 nm. Nezanedbatelnou výhodou je při srovnávání s H_2O_2 i větší šířka absorpčního pásu, což se projevuje vyšší účinností při oxidaci aromatických sloučenin, které ve vodě mohou působit jako vnitřní optický filtr¹⁰.

Dalším systémem využívajícím ozon je $\text{Mn}^{3+}/(\text{COOH})_2/\text{O}_3$. Jeho výhodou je vznik OH^{\cdot} při $\text{pH} > 4$. Reakce spočívá v oxidaci kyseliny šťavelové ozonem za katalýzy ionty Mn^{2+} a vzniku štavelanu di a tri manganitého, hydroxylového radikálu, kyslíku a oxidu uhličitého. Tento systém, popisovaný Andreozzim^{54,55}, prokázal účinnost přes 98 % i pro vysoce rezistentní polutanty, např. pyrazin a pyridin.

3. Mechanismy reakce organického polutantu s hydroxylovými radikály

V uvedených procesech AOP vystupuje po fluoru nejsilnější oxidovadlo – hydroxylový radikál, (tab. I). Ačkoliv jde o částici s krátkou dobou života, její reaktivita je

Tabulka III

Rychlostní konstanty reakcí druhého řádu ozonu a hydroxylových radikálů s organickými polutanty

Polutant	Rychlostní konstanta [$\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$]	
	k_{O_3}	$k_{\text{OH}\cdot} \times 10^{-9}$
Benzen	2	7,8
Toluen	14	7,8
Chlorbenzen	0,75	4
Trichlorethen	17	4
Tetrachlorethen	< 0,1	1,7
Butan-1-ol	0,6	4,6
Propan-2-ol	0,2	3,4
2-Methylpropan-2-ol	0,03	0,4

extrémně vysoká – rychlostní konstanty pro reakce druhého řádu s organickým substrátem dosahují hodnot $10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, (tab. III).

Organický polutant může být napaden třemi způsoby:

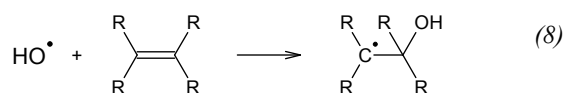
- atakem $\text{OH}\cdot$ doprovázeným přenosem protonu,
- atakem $\text{OH}\cdot$ ve smyslu elektrofilní adice,
- atakem $\text{OH}\cdot$ za současně probíhajícího přenosu elektronu.

Při ataku $\text{OH}\cdot$ doprovázeném přenosem protonu se z polutantu stává organický radikál, který dále reaguje s O_2 za vzniku peroxyradikálu:

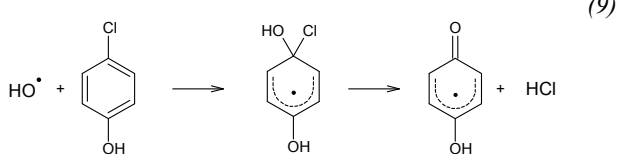


Následující řetězové reakce s radikálovým mechanismem vedou ke vzniku CO_2 , H_2O a anorganických solí.

Obsahuje-li polutant dvojnou vazbu, uplatňuje se elektrofilní adice:



Tímto mechanismem se vysvětluje např. dechlorace jinak obtížně odbouratelných chlorfenolů:



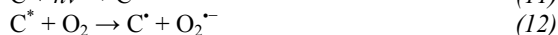
Kromě atomu vodíku může hydroxylový radikál z polutantu odtrhnout také elektron:



Tento mechanismus je upřednostněn, pokud molekula polutantu nemá dvojnou vazbu, obsahuje vazby C-X (kde X je halogen) nebo je stericky stíněna.

4. Perspektivy využívání AOP procesů při čištění průmyslových odpadních vod

Mnoho procesů AOP využívá UV záření, avšak sama fotooxidace UV/ O_2 je zpravidla účinná při použití ionizujícího (energie > 5 eV) nebo polychromatického UV záření. Organická molekula se při absorpci záření dostává do excitovaného stavu C^* , rovnice (11). Při reakci s O_2 probíhají rekombinace radikál-iontů, vznikají superoxidové radikál-anionty, rovnice (12) či dochází k homolýze vazeb R-X, rovnice (13) a reakci radikálů s kyslíkem, rovnice (14):



Homolýza vazby C-X u vysoce halogenovaných alifatických sloučenin vyžaduje vysoké dávky UV záření o energii převyšující 6,5 eV ($\lambda < 190 \text{ nm}$) pro vazbu C-F a 5,5 eV (225 nm) pro vazbu C-Cl.

Nízkotlaká rtuťová výbojka je zdrojem UV-C záření o vlnové délce 253,7 nm, které je samo pro odstranění většiny organických polutantů nedostatečně účinné. Proto je tento zdroj v praxi kombinován s H_2O_2 , O_3 a často ještě s katalyzujícími ionty Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} nebo TiO_2 . Úlohu oxidovačla přebírá radikál $\text{OH}\cdot$. Za těchto okolností lze z odpadní vody odstranit halogenovaná rozpouštědla (CCl_4 , $\text{CCl}_2=\text{CHCl}$, CCl_3CH_3 , CHF_3 , CHCl_3 , CHCl_2Br , CHClBr_2 , CHBr_3), ale také aromatické sloučeniny jako je chlorbenzen, 2,5-dichlorbenzen, 1,2,4-trichlorbenzen, 2-chlorfenol, 2,5-dichlorfenol, *m*-kresol, 2,5-dimethylfenol, 4-nitrofenol a mnoho dalších. Z výzkumu je přitom patrné, že pro odstranění halogenovaných látek jsou nejvhodnějšími zdroji UV-C speciální středotlaké rtuťové výbojky dopované sodíkem nebo nízkotlaké rtuťové výbojky s xenonem emitující záření $\lambda = 222 \text{ nm}$.

Energie záření UV-A a UV-B je pro odbourávání většiny organických látek přímou fotolýzou nedostatečná. Přesto existuje mnoho prací studujících možnost využití solární energie pomocí reaktorů s parabolickým kolektorem slunečního záření (CPC, compound parabolic collectors)⁶⁶ a některého z fotokatalytických systémů, (tab. III). Zajímavá je z tohoto pohledu např. práce popisující výsledky z pilotního projektu využívající reaktory s CPC pro odbourávání problematických pesticidů¹².

Mnoho prací popisuje úspěšné použití fotolýzy při aplikaci polychromatického záření, jakým je např. dostupná středotlaká rtuťová výbojka emitující záření v oblasti 254–400 nm. Toho lze využít jak pro generaci radikálů $\text{OH}\cdot$, tak pro přímou excitaci organických molekul absorbujících v této oblasti spektra, jako jsou např. benzen, toluen, xylen, dinitrotoluen nebo 2-chlorfenol.

Při studiu prací využívajících pro vytvoření radikálů $\text{OH}\cdot$ Fentonovu reakci nebo nějakou z jejich četných modifikací lze dospět k závěru, že proces AOP patří v praxi mezi nejvyužívanější. Je to dáno především dostupností potřebných chemikálií a nízkými investičními náklady. Výsledná účinnost závisí na několika klíčových faktorech.

Tabulka IV

Příklady využití procesů AOP při čištění odpadních vod z průmyslu a zemědělství

Oblast aplikace	Polutant / koncentrace [mg l^{-1}]	Reakční systém	Oxidovadlo; katalyzátor/ koncentrace [mg l^{-1}]	pH	Účinnost [%]	Lit.
Farmaceutický a chemický průmysl	2-fenyl-2-methylglycin (500)	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$	H_2O_2 (200–500) Fe^{2+} (2–20)	6–7,5	95	56
	Metronidazol	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-UV-C}$	H_2O_2 (850–3400)	4–6	5–41	59
	Prokain Penicilin G	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{3+}\text{-UV}$	H_2O_2 (850) Fe^{3+} (82)	cca 3	14–56	60
	Rhodamin B Methylenová modř Akridinová oranž	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$ $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{3+}\text{-UV}$	H_2O_2 (25) Fe^{3+} (5)	2,7–6	80–99	57
Textilní a barvářský průmysl, odbarvování odpadních vod	Reactive Blue 160 (7)	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-UV-C}$	H_2O_2 (680)		92–95	43
	Reactive Yellow 84	$\text{TiO}_2\text{-UV-A}$	H_2O_2 (150)	3–11	80–95	43
	Reactive Yellow 138:1 (15)		TiO_2 (1000)		69–75	
	Reactive Blue 4 (30)	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-UV-C}$ $\text{TiO}_2\text{-UV-A}$ $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$	H_2O_2 (680) Fe^{2+} (6)	3,6	30–52	45
	Reactive Red 45	$\text{UV-H}_2\text{O}_2\text{-O}_3$	H_2O_2 (350)	3–11	61	46
	Reactive Yellow 14	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$ $\text{TiO}_2\text{-UV-A}$ $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ $\text{H}_2\text{O}_2\text{-UV-C}$	H_2O_2 (170-850) TiO_2 (4000) Fe^{2+} (28)	3–5	42–97 91 35–97 88	44
Pesticidy Herbicidy	Kyselina (2,4,5-trichlorfenyl) octová (53-266 ppm)	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$	H_2O_2 (500–1800) Fe^{2+} (28–110)	2–4	95–99 47–67	58
	Endosulfan (10) Thiodan (10) Formetanate (10)	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$	Fe^{2+} (14–28)	2,8	>80	61
	Dicorzol Pyrimethanil Scala Acrinatrín Rufast Lufenuron Match Abamectin Vertimec	$\text{TiO}_2\text{-UV-O}_2$	H_2O_2 (510) TiO_2 (200)	2,7– 3,1	>90	41
	Imidacloprid Confidor Oxamyl Vydate Propamocarb	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-UV-C}$ $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$ $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{3+}\text{-UV}$	H_2O_2 (306) Fe^{2+} (0,5) Fe^{3+} (0,5)	2–4 5	85 87 57 90	11
Sanace ropý a ropných látek z moře a odpadních vod	Nafta	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-UV}$	H_2O_2 (170–6800) Fe^{2+} (0,55–55)	3	99	62 30
	Surová ropa (32 g l^{-1}) Ropné látky	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$	H_2O_2 (13–136 g l^{-1}) Fe^{2+} (2,7–27 g l^{-1})	2–6	>97	63–66

pH reakčního prostředí

Jsou-li všechny reaktanty ve vodě rozpuštěny a jako zdroj železa použit $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 nebo ve vodě rozpustný organický komplex železa, je proces neúčinnější při pH v rozmezí 2–4. V méně kyselém prostředí rapidně klesá jak rychlost, tak i účinnost oxidace. Současně se v závislosti na koncentraci Fe iontů začíná při pH 3,7–6,2 vylučovat $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a peroxid vodíku se rozkládá na vodu a kyslík. Volba vyššího pH 6–7 se pro oxidaci modifikovanou Fentonovou reakcí v literatuře objevuje méně a souvisí s použitím kovového železa anebo Mohrovy soli $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

Forma katalyzátoru

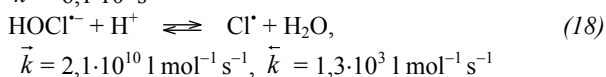
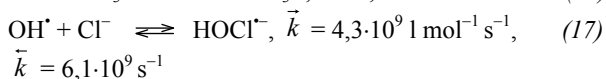
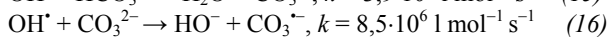
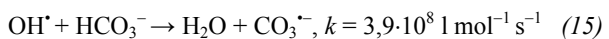
Při homogenním uspořádání jsou zdrojem železnatých iontů jednoduché anorganické soli, vzácněji železo vázané v komplexech. Při heterogenním procesu je železo převážně v pevné fázi – např. ve formě oxidů nebo v imobilizované formě na nosiči či ve formě hoblin, třísek nebo prášku.

Poměr $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$

Reakční rychlost oxidace polutantu má tendenci růst se zvyšující se koncentrací peroxidu vodíku, který je zdrojem radikálu OH^\cdot . Železo plní roli katalyzátoru. Z toho vyplývá, že oxidace nastává, je-li koncentrace železnatých iontů menší než koncentrace peroxidu vodíku. Pokud by koncentrace železa použitého pro reakci přesáhla koncentraci H_2O_2 , oxiduje se nejprve železo za vzniku Fe^{3+} a při vhodném pH koaguluje $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Ionty Fe^{2+} nemají vliv jen na tvorbu hydroxylových radikálů, ale podílí se také na jejich zachytávání. Poměr $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ tedy ovlivňuje jak rychlost vzniku, tak i záchyt hydroxylových radikálů. V praxi se tento poměr obvykle volí v rozpětí 1/5 až 1/10.

Koncentrace lapačů OH^\cdot

Rychlost rozkladu polutantu Fentonovým činidlem klesá za přítomnosti určitých aniontů, které zachycují hydroxylové radikály, nebo tvoří s $\text{Fe}^{(III)}$ nereaktivní komplexy. Za určitých podmínek tak mohou působit např. anionty HCO_3^- , CO_3^{2-} či Cl^- :



5. Závěr

Přes výše uvedené technické problémy a omezení procesy AOP pronikají stále více do sanačních technologií. Z tab. IV je patrné, že se s nimi můžeme v praxi setkat při odbarvování odpadních vod z výroben textilních barviv a pigmentů, z barviren a z provozů textilního a kožedělného průmyslu. Další možné využití představuje čištění odpadních vod z chemických a farmaceutických provozů, likvidace úniků ropných látek do vodoteče nebo odbourávání agrochemikálií, vyplavených ze zemědělské půdy.

Seznam zkratk

AOP	pokročilé oxidační procesy (advanced oxidation processes)
ČOV	čistírna odpadních vod
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
TOC	celkový organický uhlík (total organic carbon)
BSK	biochemická spotřeba kyslíku
CHSK _{Cr}	chemická spotřeba kyslíku stanovená dichromanem draselným
TSK	teoretická spotřeba kyslíku
PCB	polychlorované bifenyly

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT VZ 0021627502.

LITERATURA

- Vácha R., Horváthová V., Vysloužilová M., Čechmáneková J.: Chem. Listy 101, 811 (2007).
- Hendricks D.: *Water Treatment Unit Processes*. CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton 2006.
- Matějů V. (ed.): *Kompendium sanačních technologií*. Vodní zdroje Ekomonitor s. r. o., Chrudim 2006.
- Pitter P.: *Hydrochemie*. 3.vydání. VŠCHT, Praha 1999.
- ČSN EN ISO 9888: Jakost vod – Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí – Statická zkouška (Zahn-Wellensova metoda) (březen 2000).
- ISO 8245:1999 Water quality – Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
- TNV 75 7520: Jakost vod – Stanovení chemické spotřeby kyslíku dichromanem (CHSK_{Cr}) (1998) – odvětvová technická norma vodního hospodářství.
- Gajdo L., Munka K., Karácsonyová M., Dercó J.: Chem. Listy 101, 480 (2007).
- Legrini O., Oliveros E., Braun A. M.: Chem. Rev. 93, 671 (1999).
- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta R.: Catal. Today 53, 51 (1999).
- Badawya M.I., Ghalyb Y., Gad-Allaha T. A.: Desalination 194, 166 (2006).

12. Malato S., Blanco J., Vidal A., Alarc D., Maldonado M. I., Caceres J., Gernjak W.: *Sol. Energy* 75, 329 (2003).
13. Kubal M., Janda V., Beneš P., Hendrych J.: *Chem. Listy* 102, 493 (2008).
14. Gogate R. P., Pandit A. B.: *Adv. Environ. Res.* 8, 501 (2004).
15. Modirshahla N., Behnajady M.A., Ghanbary F.: *Dyes Pigm.* 73, 305 (2007).
16. Muruganandham M., Swaminathan M.: *Dyes Pigm.* 63, 315 (2004).
17. Lucas M.S., Peres J. A.: *Dyes Pigm.* 71, 236 (2006).
18. Liu R., Chiu H.M., Shiao Ch. S., Yeh R. Y., Hung Y.: *Dyes Pigm.* 73, 106 (2007).
19. Xu X. R., Li H.B., Wang W. H., Ji-Dong Gu: *Chemosphere* 57, 595 (2004).
20. Kavitha V., Palanivelu K.: *J. Photochem. Photobiol., A* 170, 83 (2005).
21. Ghiselli G., Jardim W. F., Litter M. I., Mansilla H.: *J. Photochem. Photobiol., A* 167, 59 (2004).
22. Lu M. Ch., Lin Ch. J., Liao Ch. H., Juany R., Ting W.: *Adv. Environ. Res.* 7, 667 (2003).
23. Riga A., Soutsasb K., Ntampeglotisa K., Karayannisa V., Papapolymeroua G.: *Desalination* 211, 72 (2007).
24. Piereza M., Torradesa F., Domenechb X., Peralb J.: *Water Res.* 36, 2703 (2002).
25. Merkofer M., Kissner R., Hider R. C., Brunk F.T., Koppenol W.H.: *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1263 (2006).
26. Kušič H., Božič A.L., Koprivanac N.: *Dyes Pigm.* 74, 380 (2007).
27. López-Cueto G., Ostra M., Ubide C., Zuriarrain J.: *Anal. Chim. Acta* 515, 109 (2004).
28. Flores Y., Flores R., Gallegos A.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* 281, 184 (2008).
29. Anotaiia J., Lub M., Chewpreecha P.: *Water Res.* 40, 1841 (2006).
30. Millioli V. S., Freire D., Cammarotaa M.C.: *J. Hazard. Mater., B* 103, 79 (2003).
31. Jiříček M., Ondra R., Janda V.: *Chem. Listy* 101, 176 (2007).
32. Minero C., Pelizzetti E., Malato S., Blanco J.: *Chemosphere* 26, 2103 (1993).
33. Turchi C.S., Ollis D.F.: *J. Catal.* 122, 178 (1990).
34. Bauer R., Fallmann H.: *Res. Chem. Intermed.* 23, 341 (1997).
35. Kiwi J., Pulgarin C., Peringer P.: *Appl. Catal., B* 335 (1994).
36. Pignatello J. J.: *Environ. Sci. Technol.* 26, 944 (1992).
37. Safarzadeh A. A., Bolton J.R., Cater S.R.: *J. Adv. Oxid. Technol.* 1, 18 (1996).
38. Tang W.Z., Huang C.P.: *Environ. Sci. Technol.* 17, 1371 (1996).
39. Pignatello J.J., Liu D., Huston P.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 1832 (1999).
40. Kusic H., Koprivanac N., Srsan L.: *J. Photochem. Photobiol., A* 181, 195 (2006).
41. Malato S., Blanco J., Vidal A., Richter Ch.: *Appl. Catal., B* 37, 1 (2002).
42. San N., Hatipoglu A., Koçtürk G., Çınar Z.: *J. Photochem. Photobiol., A* 146, 189 (2002).
43. Alatona I. A., Balcioglu I. A., Bahnemann D. W.: *Water Res.* 36, 1143 (2002).
44. Muruganandham M., Swaminathan M.: *Sep. Purif. Technol.* 48, 297 (2006).
45. Duran A., Monteagudo J.M.: *Water Res.* 41, 690 (2007).
46. Peternel I., Koprivanac N., Kusic H.: *Water Res.* 40, 525 (2006).
47. Dominguez J.R., Beltrán J., Rodríguez O.: *Catal. Today* 101, 389 (2005).
48. Ruppert G., Bauer R.: *Chemosphere* 28, 1447 (1994).
49. Lipczynska-Kochany E., Sprah, G., Harms S., 1995.: *Chemosphere* 30, 9 (1995).
50. Lu, M. C., Chen, J. N., Chang, C. P.: *Chemosphere* 35, 2285 (1997).
51. Mahmoodia N.M., Arami M., Limaee N. Y., Gharanjig K., Ardejani F. D.: *Colloids Surf., A* 290, 125 (2006).
52. Wu Ch. H.: *Dyes Pigm.* 77, 24 (2008).
53. Flox Ch., Ammar S., Arias C., Brillas E., Zavala V. V., Abdelhedi R.: *Appl. Catal., B* 67, 93 (2006).
54. Andreozzi R., Caprio V., Insola A., D'Amore M.G.: *Water Res.* 26, 917 (1992).
55. Andreozzi R., Caprio V., D'Amore M.G., Insola A.: *Environ. Technol.* 16, 885 (1995).
56. Oller I., Malato S., Sanchez-Pérez J. A., Gernjak W., Maldonado M. I., Pérez-Estrada L. A., Pulgarin L. A.: *Catal. Today* 122, 150 (2007).
57. Tao X., Sua J., Wang L., Chenc J. F.: *J. Mol. Catal., A: Chem.* 280, 196 (2008).
58. Boye B., Morieme D. M., Brillas E.: *J. Electroanal. Chem.* 557, 135 (2003).
59. Johnson M. B., Mehrvar M.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 6525 (2008).
60. Alaton A., Gurses F.: *J. Photochem. Photobiol., A* 165, 165 (2004).
61. Fallmann H., Krutzler T., Bauer R., Malato S., Blanco J.: *Catal. Today* 54, 309 (1999).
62. Amélia S., Galvão O., Mota L.N., Douglas N. S., Moraes J. CH., Nascimento A. O., Chiavone-Filho O.: *Sci. Total Environ.* 367, 42 (2006).
63. Watts R. J., Kong S., Dippre M., Barnes W. T.: *J. Hazard. Mater.* 41, 105 (1994).
64. Watts R. J., Foyer M.K., Kong S. H., Teel A. L.: *J. Hazard. Mater., B* 69, 229 (1999).
65. Watts R. J., Haller D.R., Jones A.P., Teel A.L.: *J. Hazard. Mater., B* 76, 73 (2000).
66. Goswami D. Y., Böer K. W. (ed.): *Advances in Solar Energy*, s. 165. American Solar Energy Society, USA 1995.

L. Dušek (*Institute of Environment Protection, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*):
Purification of Wastewater Using Chemical Oxidation Based on Hydroxyl Radicals

This paper reviews advanced oxidation processes (AOP) such as Fenton, Fenton-like, photo-assisted Fenton processes, photocatalysis and photolysis process. All AOP

are characterised by exploiting the highly reactive OH^\bullet , which are suitable for degradation of organic pollutants. The organic radicals are generated by photolysis of the organic matrix or by reaction with OH^\bullet . These radical intermediates subsequently react with dissolved molecular oxygen to afford peroxy radicals and peroxides, which speed up the overall degradation process, and lead to total mineralization.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ SPEKTROSKOPIE NIR V MASNÉM PRŮMYSLU

JIŘÍ MLČEK^a, OTAKAR ROP^a, KVĚTOSLAVA ŠUSTOVÁ^b, JANA SIMEONOVÁ^b a ROBERT GÁL^a

^a Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Náměstí T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín,

^b Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
mlcek@ft.utb.cz

Došlo 9.7.09, přepracováno 26.1.10, přijato 12.2.10.

Klíčová slova: spektroskopie NIR, chemické složení masa, kvalita masa

Obsah

1. Úvod
2. Stanovení chemického složení masa
3. Schopnost techniky NIR predikovat kvalitu masa
 - 3.1. Technologické charakteristiky
 - 3.2. Senzorické charakteristiky
 - 3.3. Kategorizace do tříd kvality
4. Výhody a nevýhody spektroskopie NIR
5. Závěr

1. Úvod

Blízká infračervená spektroskopie (NIRS) je analytická technika, která využívá zdroj emitujícího záření známé vlnové délky (obvykle 800–2500 nm, tj. 12500–4000 cm⁻¹) a umožňuje získat kompletní obraz organického složení analyzovaného materiálu¹. Principem metody je pohlcování, nebo reflexe různých vlnových délek dopadajícího záření, které závisí na chemickém složení analyzovaného vzorku. Spektroskopie v NIR oblasti se v potravinářství a zemědělství jako jediných oborech uplatňuje již od 60. let minulého století (stanovení obsahu vody, proteinů, tuků a sacharidů). Další uplatnění našla ve farmacii, petrochemii, medicíně a při sledování životního prostředí². Aplikace spektroskopie NIR je však mnohem širší a zahrnuje i stanovení senzorických a fyzikálně chemických parametrů³.

Blízká infračervená spektroskopie je velmi používána v oblasti masného průmyslu, kde se aplikuje ke zjišťování kvantitativních znaků (obsah vody, tuku, bílkovin atd.), ale také se spektroskopie NIR uplatňuje při posuzování kvality masa z hlediska technologických a senzorických znaků.

2. Stanovení chemického složení masa

V mase existují silné inverzní vzájemné vztahy mezi tukem a obsahem vody, kde koeficient determinace (R^2) = 0,99. Menší, avšak stále významný je vzájemný vztah mezi tuky a proteiny (R^2 = 0,87). Suma těchto tří komponent je konstantní, obvykle mezi 97–99 % v mase. Proto není překvapivé, že právě tyto komponenty představují velký stupeň rozdílu ve vlastnostech masné kvality. Technika NIR umožňuje měření všech těchto tří složek najednou⁴.

Technika NIR byla poprvé použita v kvantitativní analýze masa Karlem Norrisem a jeho kolegy v Instrumental Research Laboratory, USDA v Beltsvillu v roce 1968 (cit.⁵). Používali Cary 14 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA) s monochromatickým skenováním. Pro stanovení tuku a vlhkosti v homogenizovaném mase našli nejvhodnější oblast mezi 1500–1850 nm. Byly měřeny rozdílné druhy masa, jak syrové, tak vařené. Analýza NIR predikovala tuky a bílkoviny se směrodatnou chybou ± 21 a ± 14 g kg⁻¹.

Ve dvou dalších dekadách bylo publikováno mnoho dalších zpráv o technice NIR ve stanovování hlavních složek masa. Přehled o těchto studiích vypracoval Hildrum a spol.⁶ Martens a spol.⁷ použili přístroj InfraAlyzer 400, Technicon pro analýzu syrového, homogenizovaného hovězího a vepřového masa a získali SEP (směrodatná odchylka predikce) pro tuky, proteiny a vodu 5,7–11,4 g kg⁻¹. Lanza používal přístroj Neotec 6350, Pacific Scientific v měření reflektance i transmitance pro vepřové a hovězí maso⁸. Obě techniky byly vhodné pro měření vlhkosti, avšak pro měření tuku a bílkovin byla vhodnější technika reflektance. Složení tří typů masných produktů (uzené párky, masové nářezy a masové paštiky) od 24 různých výrobců bylo analyzováno v režimu transmitance⁹. Použili vlnovou délku 850–1050 nm a pro bílkoviny a tuky získali SEP v rozsahu 3,8–8,8 g kg⁻¹. Predikce sacharidů byla méně uspokojivá. Isaksson a spol. porovnávali reflektanci NIR (přístroj InfraAlyzer 500, 1100–2500 nm) s transmitancí (přístroj Infratec, Foss Group, Hillerod, Denmark, 850–1050 nm) v analýze homogenizovaného hovězího masa. Dospěli k názoru, že obě techniky jsou vhodné pro analýzu a měření přes transparentní obaly (polyamid/polyethylen) dává nesignifikantní nárůst chyby predikce¹⁰. I další autoři získali podobnou chybu predikce pro syrové homogenizované vepřové a hovězí maso jako výše uvedení autoři¹¹. Cozzolino a spol. měřili neporušené a mleté drůbeží maso. Dosáhli relativně vysokých korelačních koeficientů, chyba predikce byla však překvapivě vysoká pro mleté vzorky (2–7 g kg⁻¹)¹². Mnoho dalších autorů se zabývá stanovením základních složek v různých druzích masa. Dnes jsou již vytvořeny početné kalibrace pro chemické složení hovězího masa^{13–16}, vepřového ma-

sa^{17,18} a drůbežího masa^{19–21}, ale i králičího masa²² a jehněčího masa²³.

Znalost složení masa z pohledu mastných kyselin je velmi atraktivní pro výživáře a konzumenty, protože nadbytek nasycených mastných kyselin se jeví jako nežádoucí. Windham a Morrison používali spektroskopii NIR ke stanovení jednotlivých a celkových mastných kyselin v hovězím mase (svalu *Longissimus dorsi*). Skenovali více než 300 vzorků systémem NIRSystem 6500 (Foss NIR-System, Silver Spring, MD) v rozsahu vlnových délek 400–2498 nm. Celkové mastné kyseliny byly touto metodou naměřeny v rozsahu 432–620 g kg⁻¹ pro nasycené a 383–562 g kg⁻¹ pro nenasyčené mastné kyseliny. Použili metodu PLS (metoda částečných nejmenších čtverců) a získali tyto výsledky SEP = 11,0 g kg⁻¹ a $R^2 = 0,77$ pro nasycené mastné kyseliny a SEP = 11,3 g kg⁻¹ a $R^2 = 0,77$ pro nenasyčené mastné kyseliny. Predikce výsledků pro kyselinu olejovou a palmitovou byly na stejné úrovni jako výše uvedené výsledky, zatímco jiné mastné kyseliny ve studii byly predikovány s menší přesností²⁴. Mezi další autory, kteří se zabývali stanovením mastných kyselin, patří Ripoché a Guillard²⁵, Gonzales-Martin a spol.²⁶ ve vepřovém mase a Molette a spol.²⁷ v husích játrech.

Přesnost technologie NIRS pro stanovení mastných kyselin v průmyslových odvětvích a laboratořích je ve srovnání se základními složkami menší, ale z důvodu rychlosti a nižších nákladů (v porovnání např. s plynovou chromatografií) ji lze použít pro orientační stanovení.

Hydroxyprolin je důležitou strukturální složkou proteinu kolagenu a želatiny (obsah je asi 12 %). Ve většině bílkovin je jeho obsah nízký. Obsah hydroxyprolinu v masných výrobcích proto koreluje s obsahem použitých méně kvalitních surovin, např. kůže²⁸. Berg a Kolar stanovovali kolagenní proteiny v hovězím a vepřovém mase. Jako referenční metoda byla použita kolorimetrická analýza hydroxyprolinu. Publikované výsledky pro stanovení obsahu kolagenu v mase metodou NIRS byly špatné, což mohlo být způsobeno slabou citlivostí techniky NIRS k minoritním složkám a spolehlivostí referenční metody¹¹. Isaksson a Hildrum publikovali uspokojivé výsledky pro obsah kolagenu v mase. Nicméně predikce kolagenu v nových, neznámých vzorcích prokázaly neuspokojivé výsledky pro nedostatečnou robustnost kalibrace. Vysvětlení je pravděpodobně takové, že spektrum NIR kolagenu není rozdílné od myofibrilárních proteinů ve svalech, které jsou přítomny ve svalech v 10× vyšší koncentraci. Obsah kolagenu v mase obvykle nepřekročí 20 až 30 g kg⁻¹. Tzn., že spolehlivý interval predikční chyby bude v podstatě kryt tímto celým rozsahem⁹. Young a spol. se zabývali stanovením kolagenu a kolagenové rozpustnosti v ovčím mase, nedosáhli však také uspokojivých výsledků²⁹.

Výsledky různých studií poukazují na rychlé možnosti orientační kontroly NIRS pro odhalování falešných praktik v procesu výroby masných výrobků a rovněž nižší náklady (v porovnání např. s kapalinovou chromatografií).

3. Schopnost techniky NIR predikovat kvalitu masa

3.1. Technologické charakteristiky

Změny v spektrech NIR po tepelné úpravě masa souvisejí s denaturovanými proteiny masa a se změnami stavu vody obklopující proteiny. Tato skutečnost svědčí o tom, že spektroskopie NIR může být použita ke zjišťování, zda je maso vhodně tepelně ošetřeno. To může být použito především ve zkoušení proteinově bohatých produktů, kde můžeme očekávat otravy z potravin. Studium techniky NIR pro stanovení maximální teploty záhřevu u hovězího masa se věnoval Ellekjaer a Isaksson³⁰. Použili techniku reflektance a transmitance k predikci tepelného ošetření s chybou měření 2,0 °C v intervalu teplot 50–85 °C. Podobné studie byly publikovány Chenem a Marksem^{31,32}. Použití dvoudimensionální UV/NIR techniky pro studii tepelného ošetření kuřecího masa se zabýval Liu a spol.³³. Další výzkumy se zabývají schopností spektroskopie NIR stanovit např. vaznost^{18,34,35}, barvu^{35–37}, nebo hodnotu pH (cit.^{35,38}) masa.

Uveřejněné výsledky poukazují na omezené možnosti spektroskopie NIR pro hodnocení technologických charakteristik masa v porovnání s běžnými technikami. Zlepšením všech faktorů, které mohou ovlivnit spektrální data a přesnost referenčních metod, však mohou zlepšit výkon modelů NIR.

3.2. Senzorické charakteristiky

V hovězím mase je křehkost obvykle považována za jednu z nejdůležitějších vlastností pro konzumenty. Problém křehkosti masa dal podnět k vývoji nových účinných metod, které by byly spolehlivé, rychlé, ale také nedestruktivní. Běžné metody, senzorické stanovení, mechanické stanovení Warnerovy-Bratzlerovy (WB) střížné síly jsou metody destruktivní, pomalé a nevedou k usnadnění tohoto stanovení³⁹. Blízká infračervená spektroskopie má schopnost odhalit změny ve stavu vody a vodíkových vazeb vzájemně ovlivňované v potravinách. Takové změny se evidentně objevují během zrání hovězího masa a spektroskopie NIR může být právě ta metoda pro toto stanovení. Bengera a Norris⁴⁰ byli první, kteří vyzkoušeli možnost spektroskopie NIR predikovat křehkost hovězího masa, ale nezískali dobrou kalibraci užitím jednotlivých vlnových délek. Mitsumoto a spol.⁴¹ použili NIRSystem 6500 v rozsahu 680–2500 nm a získali vysoké korelační koeficienty (R) pro WB střížnou sílu ($R = 0,8–0,83$) v šesti různých svalech z jedenácti jatečně upravených těl. Nicméně v této práci nebyla provedena žádná validační stanovení. Hildrum a spol.^{6,42} studovali predikci stanovení křehkosti hovězího masa použitím InfraAlyzer 500. Bylo použito 120 vzorků ze 40 jatečně upravených těl a byly analyzovány jak čerstvé vzorky, tak vzorky rozmražené. Referenční metodou byla metoda senzorická a měření WB střížné síly. Korelační koeficient pro senzorickou tvrdost

a křehkost byl 0,70–0,74. Mnoho spekter však muselo být odstraněno, což indikovalo na různý světelný rozptyl ve vzorcích. Byrne a spol.⁴³ používali NIRSystem 6500 s optickou sondou mezi 750–1098 nm na stanovení dvou skupin vzorků masa z jalovic. Korelační koeficient pro senzoričnou křehkost pro první skupinu vzorků byl 0,82 a pro druhou skupinu vzorků 0,73. Když byly tyto skupiny sloučeny dosáhlo se $R = 0,61$. Výsledky z techniky NIR byly velmi podobné výsledkům z referenční analýzy, tedy WB střížné síly. Venel a spol.⁴⁴ studovali predikci senzoričnou vlastností a WB střížnou sílu u hovězího masa (75 zvířat) starých 14 dní, použili krátké vlnové délky 750–1100 nm. Celkové výsledky však nebyly uspokojivé. Výsledky byly zlepšeny, když vzorky byly rozlišeny podle stáří, pohlaví zvířete, pH a dne vykostění. Tornberg a spol.⁴⁵ používali NIRSystem 6500 pro stanovení různých fyzikálně chemických parametrů, včetně WB střížné síly. Vysvětlují fakt, že spektroskopie NIR má jen malou spojitost k fyzikálně chemickým parametrům. Park a spol.⁴⁶ stanovovali křehkost hovězího masa u 600 jatečně opracovaných těl použitím NIRSystem 6500 s vlnovou délkou 1100–2498 nm a dosáhli průměrných výsledků. Rødbotten a spol.³⁹ studovali podobné téma s InfraAnalyzerem 500, který měřil spektra od 2 h do 14 dní starého hovězího masa. Zjistil, že spektrální změny NIR během *rigor mortis* nebyly stejné k stáří ani křehkosti. Korelační koeficienty mezi spektra NIR a WB střížnou silou byly nízké (0,47 až 0,55), a to značí, že měření spekter po porážce není vhodné, protože neumožňuje predikovat konečnou křehkost. Některé studie se také zabývají stanovením jiných senzoričnou vlastností, jako je např. šťavnatost⁴⁷, žvýkatelnost³⁹, chuť, textura a přijatelnost⁴³.

Souhrnně, smyslové charakteristiky jsou komplexem znaků ovlivněné subjektivitou hodnotitelů, dokonce i když jsou dobře trénováni. Proto, nízká předpověditelnost techniky NIR pro senzoričnou atributy je pravděpodobně díky subjektivitě a nepřesnostem hodnotitelů, tedy vysoce proměnlivým výsledkům.

3.3. Kategorizace do tříd kvality

Některé práce se také zabývají možností spektroskopie NIR klasifikovat maso a masné produkty na základě kvality, tj. rozlišením mezi různými vlastnostmi.

Downey a Beauchene⁴⁸ studovali rozlišovací schopnost spektroskopie NIR mezi čerstvým a rozmraženým masem u hovězího masa. 32 vzorků masa bylo analyzováno po 7 dnech uchování v chladu (4 °C) a po třikrát po sobě zmraženém a rozmraženém mase. Každý cyklus byl 5denní a teplota zmrazení byla –18 °C. Spektra byla měřena optickou sondou v rozsahu 650–1100 nm a kalibrace byly vytvářeny diskriminační analýzou. Modely tedy byly založeny na 4 různých skupinách masa – čerstvé, jedenkrát, dvakrát a třikrát zmražené s porovnáním se 2 skupinami masa (čerstvé a mražené). Nejlepší výsledky byly dosaženy metodou mnohonásobné korekce rozptylu (MSC). Autoři dosáhli výborných výsledků, žádné zmražené maso

nebylo identifikováno jako čerstvé, pouze 3 vzorky čerstvého masa byly rozpoznány jako vzorky jedenkrát zmražené (tab. I).

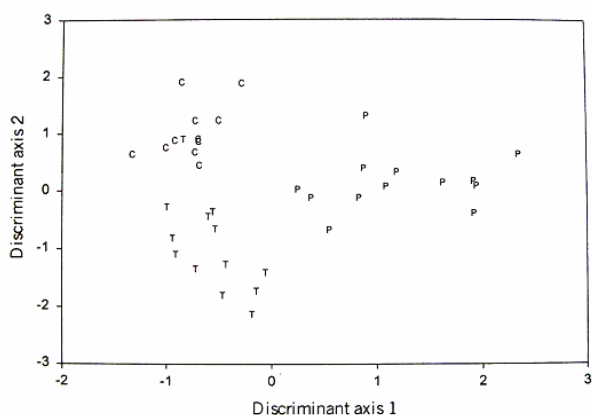
Podobným výzkumem se zabývali také Thyholt a Isaksson⁴⁹, kteří používali diskriminační analýzu k rozlišení tří skupin vzorků: čerstvého, mraženého a znovu zmraženého masa. Windham a spol.⁵⁰ sledovali 600 vzorků kuřecího masa zmražených v různých teplotách (–18, –12, –3, 0 a 4 °C) a v různých časových periodách. Prsní filety zbavené kůže byly měřeny v režimu reflektance při 400–2500 nm přístrojem NIRSystem 6500. Výsledky však přinesly mnoho nejasností mezi mraženým a nemraženým masem, protože chemometrický nástroj je nedokázal optimálně oddělit. French a spol.⁵¹ studovali rozdílnost masa pocházející od skotu z pastvy a skotu krmného kukuřičnou siláží. Vzorky byly měřeny na přístroji NIRSystem 6500, celkem bylo použito 60 vzorků masa. Podobnou práci se také zabýval Cozzolino a spol.⁵².

Detegovat různé přísady v mase můžeme vizuálně, ale pouze v případě celého masa nebo kousků masa. V případě mletého masa toto nelze použít. Tento typ přípravy masa je používán k produkci tzv. „hotových“ mas a rozpoznání je velmi obtížné a často vede k falšování mas jinými přísadami nebo záměnou jednoho masa druhým nebo jeho části. Spray a spol.⁵³ hodnotili vzorky jehněčího, vepřového, kuřecího a krůtího masa skenováním v oblasti 1100–2500 nm přístrojem Perstorp Analytical, Silver Spring, MD v reflektančním módu před a po záhřevu. Analýza hlavních komponentů rozdělila vzorky masa, ale kvůli nízkému počtu vzorků z každé skupiny ($n = 3$) je metoda autorů velmi limitována. Rannou a Downey⁵⁴ stanovovali rozdílnosti mezi homogenizovanými kuřecími prsy ($n = 24$), krůtími prsy ($n = 25$) a vepřovým masem. Vzorky byly změřeny NIRSystem 6500 ve vlnových délkách 400–2500 nm v polyethylenových sáčcích ve skleněné kyvetě. Nejlepší výsledky získali v oblasti 400–1100 nm. Všechny vzorky byly kalibrací správně klasifikovány a pro validaci autoři získali poměr úspěšnosti 91,9 % (34 vzorků z 37) (obr. 1).

Podobnou práci se zabývali autoři McElhinney a spol.⁵⁵, kteří diskriminační analýzou posuzovali 5 různých vzorků masa – hovězí, jehněčí, kuřecí, krůtí a vepřo-

Tabulka I
Diskriminační analýza u vzorků čerstvého a mraženého masa s použitím MSC⁴⁸

	Čerstvé	1 krát zmražené	2 krát zmražené	3 krát zmražené
Čerstvé	13	3	0	0
1 krát zmražené	0	11	4	1
2 krát zmražené	0	3	6	7
3 krát zmražené	0	1	4	11



Obr. 1. Diskriminační analýza pro homogenizovaná kuřecí (C), krůtí (T) a vepřová (P) masa⁵⁴

vé. Stejní autoři⁵⁶ v roce 1999 stanovovali rozdíly mezi homogenizovaným hovězím, jehněčím a přidávkem 5, 10 a 20 % jehněčího masa do masa hovězího. Použili metodu PLS a měření probíhalo v UV, NIR a MIR spektrální oblasti. Vytvořili kalibrace pro jednotlivé druhy masa a také jednu kalibraci pro všechny druhy masa. Získali SEP = 0,91 % (0–20 % rozsah v obsahu jehněčím) a 4,1 % (0–100 %) rozsah v jehněčím.

Mnoho studií v poslední dekádě poukazují na to, že spektroskopie NIR je silný pracovní nástroj pro kategorizaci masa a masných produktů na základě kvality. Procenta správně zhodnocených vzorků jsou ve většině případů mezi 80 a 100. Technika NIR byla schopna klasifikovat úspěšně hovězí a drůbeží maso podle křehkosti^{46,47,57}, vepřové maso podle vaznosti^{34,58} a šunku podle textury a barvy⁵⁹.

4. Výhody a nevýhody spektroskopie NIR

Tradiční metody pro stanovení kvality masa a jeho hlavních složek jsou relativně pomalé a dosti drahé. Mezi přednostmi spektroskopie NIR řadíme rychlost, simultánnost, nedestruktivní měření vzorků, velký potenciál pro on-line analýzu, snadnost obsluhy, možnost měřit přes transparentní obaly a to vše bez použití chemikálií. V případě stanovování obsahových složek ve vzorcích je však nutné provést přesnou kalibraci spektrometru NIR pomocí vhodného souboru kalibračních standardů o známém složení, pomocí vhodných analytických metod známých jako referenční metody. Po té je však již vlastní stanovení jednoduché a navíc jedno spektrum NIR vzorku lze použít ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení řady parametrů.

Hlavní nevýhoda metody NIR je její závislost na referenčních metodách, vyšší pořizovací ceny přístrojů, slabá citlivost k minoritním složkám, u některých typů spektrometrů omezený převod kalibrací mezi různými přístroji a složitý výklad spektrálních dat^{2,60}.

5. Závěr

Nedávné vývoje přístrojů NIR zvýšily vhodnost spektroskopie NIR pro měření kvality masa ve výrobě. První aplikace spektroskopie NIR v průmyslových podmínkách byla provedena pro odhad tuku, vlhkosti a bílkovin v malých pomletých vzorcích hovězího masa použitím difuzního spektroskopického nástroje NIR upevněného na masový mlýnek⁶¹. Potom další autoři^{17,62} přiblížili toto pojetí k měření chemického složení hovězího a vepřového masa v průmyslu v částečně zmraženém syrovém masu. Později byla tato aplikace široce užívána v průmyslu. Anderson a Walker⁶³ měřili úspěšně obsah tuku v mletém hovězím masu, které se pohybovalo na dopravním pásu. Z toho vyplynulo, že i přes nerovný povrch pohybujícího masa, technika spektroskopie NIR může měřit obsah tuku on-line v průmyslových podmínkách, což je někdy problém během monitorování mletého hovězího masa na dopravním pásu. Downey a Hildrum⁴ uvádějí, že hlavní příčinou chyb při online měření NIR je skutečnost, že záření pronikne jen pár milimetrů do masa, a proto jen část z celého masa může být sledována. Když je provedeno více měření, pak predikce NIR pro celé šarže masa je více reprezentativní.

Nástroje NIR s diodovým polem byly užívány pro online monitorování přibližného složení hrubě mletého hovězího masa na dopravním pásu⁶⁴ a jsou schopny skenovat všechny vlnové délky v několika milisekundách, a to dovoluje měření i přes velké plochy povrchu masa v průmyslových podmínkách. Řada autorů^{18,37,44,65,66} využívala sondu s vláknovou optikou pro jatečně opracovaná těla k měření chemických, technologických a senzoricích znaků. Navzdory k tvrdým podmínkám prostředí na jatkách s měnicími se teplotami a vlhkostí, sondy s vláknovou optikou významně zlepšily schopnost techniky NIR monitorovat a kontrolovat tyto procesy. Z toho plyne, že technika NIR může vhodně předpovídat současně početné kritéria kvality masa na lince v průmyslových podmínkách.

Spektroskopie NIR má značný potenciál předpovídat současně několik chemických vlastností masa a kategorizovat maso do tříd dle kvality. Proto NIR je vhodná alternativa k analytickému měření, které může být časově náročné, nákladné a někdy i riskantní pro zdraví nebo životní prostředí. Na druhou stranu spektroskopie NIR má jen omezené možnosti pro odhad technologických a smyslových atributů masa, hlavně kvůli heterogenitě masa (zvláště ty v nedotčené formě) a nízké přesnosti referenčních metod (např. WB střížné síle). Navíc, smyslové atributy získané hodnotitelským panelem jsou ovlivňovány subjektivitou hodnotitelů a jen extrémní vzorky (senzoricke skóre odchyľující se podstatně od průměru) mohou být jasně rozlišeny účastníky senzorickeho hodnoteni. Proto jsou vyžadovány stále lepší kalibrace NIR pro tyto technologické a smyslové charakteristiky. V současné době analytici hledají vlnové délky, ve kterých měření NIR jsou těsně spojeny s charakteristikami pro kvalitu masa. Vyhledáním těchto vlnových délek je možné získat více silných kalibrací a vyvinout jednoduché a úspěšné

nástroje, které by používaly jen tyto vlnové délky. Mimo to použití sondy s vláknovou optikou může zlepšit schopnost metody NIR monitorovat a kontrolovat maso během zpracování použitím vzdálených on/in line detekcí.

Seznam zkratk

MIR spektroskopie ve střední infračervené oblasti
 MSC metoda mnohonásobné korekce rozptylu
 NIR spektroskopie v blízké infračervené oblasti
 PLS metoda částečných nejmenších čtverců
 SEP směrodatná odchylka predikce

LITERATURA

- Van Kempen L.: *World's Poultry Sci. J.* 57, 29 (2001).
- Centner V.: *CHEMagazín* 9, 22 (1999).
- Rodriguez-Otero J. L., Hermida M., Centero J.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 2815 (1997).
- Roberts C. A., Workman J., Reeves J. B.: *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. ASA-CSSA-SSSA, Madison 2004.
- Williams P. C., Norris K.: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists, Minnesota 1990.
- Hildrum K. I., Ellekjaer M. R., Isaksson T.: *Meat Focus Int.* 4, 156 (1995).
- Martens H., Bakker A., Hildrum K. I.: *27th Eur. Meet. Meat Res. Workers.* 2, 561 (1981).
- Lanza E.: *J. Food Sci.* 2, 471 (1983).
- Isaksson T., Hildrum K. I.: *Proc. 3rd Int. Conf. On Near Infrared Spectrosc.*, Brussels. 2, 202 (1990).
- Isaksson T., Miller C. E., Naes T.: *Appl. Spectrosc.* 46, 1685 (1992).
- Berg H., Kolar K.: *Fleischwirtschaft* 71, 756 (1991).
- Cozzolino D., Murray I., Paterson R.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 4, 213 (1996).
- Eichinger H., Beck G.: *Archiv für Tierzucht* 35, 41 (1992).
- Cozzolino D., De Mattos D., Martins V.: *Anim. Sci.* 74, 477 (2002).
- Tøgersen G., Arnesen J. F., Nilsen B. N., Hildrum K. I.: *Meat Sci.* 63, 515 (2003).
- Alomar D., Gallo C., Castaneda M., Fuchslocher R.: *Meat Sci.* 63, 441 (2003).
- Tøgersen G., Isaksson T., Nilsen B. N., Bakker E. A., Hildrum K. I.: *Meat Sci.* 51, 97 (1999).
- Brøndum J., Munck L., Henckel P., Karlsson A., Tornberg E., Engelsen S. B.: *Meat Sci.* 55, 177 (2000).
- Valdes E. V., Summers J. D.: *Poultry Sci.* 65, 485 (1986).
- Renden J. A., Oates S. S., Reed R. B.: *Poultry Sci.* 65, 1539 (1986).
- Abeni F., Bergoglio G.: *Meat Sci.* 57, 133 (2001).
- Masoero G., Xiccato G., Zotte dalle A., Parigi Bini R., Bergoglio G.: *Zootec. Nutriz. Anim.* 20, 319 (1994).
- Cozzolino D., Murray I., Scaife J. R., Paterson R.: *Anim. Sci.* 70, 417 (2000).
- Windham W. R., Morrison W. H.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 6, 229 (1998).
- Ripoche A., Guillard A. S.: *Meat Sci.* 58, 299 (2001).
- Gonzales-Martin I., Gonzales-Peres C., Hernandez-Mendes J., Alavarez-Garcia N., Merino Lazaro S.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 10, 257 (2002).
- Molette C., Berzaghi P., Zotte A. D., Remignon H., Babile R.: *Poultry Sci.* 80, 1625 (2001).
- Velišek J.: *Chemie potravin*. I. OSSIS, Tábor 2002.
- Young O. A., Berker G. J., Frost D. A.: *J. Muscle Foods* 7, 377 (1996).
- Ellekjaer M. R., Isaksson T.: *J. Sci. Food Agric.* 59, 335 (1992).
- Chen H., Marks B. P.: *J. Food Sci.* 62, 753 (1997).
- Chen H., Marks B. P.: *J. Food Sci.* 63, 279 (1998).
- Liu Y., Chen Y. R., Ozaki Y.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 901 (2000).
- Geesink G. H., Schreutelkamp F. H., Frankhuizen R., Vedder H. W., Faber N. M., Kranen R. W., Gerritzen M. A.: *Meat Sci.* 65, 661 (2003).
- Meulemans A., Dotreppe O., Leroy B., Istasse L., Clinquart A.: *Sci. Aliments* 23, 159 (2003).
- Chan D. E., Walker P. N., Mills E. W.: *Trans. ASA-BE* 45, 1519 (2002).
- Leroy B., Lambotte S., Dotreppe O., Lecocq H., Istasse L., Clinquart A.: *Meat Sci.* 66, 45 (2003).
- Josell A., Martinsson L., Borggaard C., Andersen J. R., Tornberg E.: *Meat Sci.* 55, 273 (2000).
- Rødbotten R., Nilsen B. N., Hildrum K. I.: *Food Chem.* 69, 427 (2000).
- Bengera I., Norris K. H.: *J. Food Sci.* 33, 64 (1968).
- Mitsumoto M., Maeda S., Mitsuhashi T., Ozawa S.: *J. Food Sci.* 56, 1493 (1991).
- Hildrum K. I., Nilsen B. N., Mielnik M., Naes T.: *Meat Sci.* 38, 67 (1994).
- Byrne C. E., Downey G., Troy D. J., Buckley D. J.: *Meat Sci.* 49, 399 (1998).
- Venel C., Mullen A. M., Downey G., Troy D. J.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 9, 185 (2001).
- Tornberg E., Wahlgren M., Brøndum J., Engelsen S. B.: *Food Chem.* 69, 407 (2000).
- Park B., Chen Y. R., Hruschka W. R., Shackelford S. D., Koohmaraie M.: *J. Anim. Sci.* 76, 2115 (1998).
- Liu Y. L., Lyon B. G., Windham W. R., Realini C. E., Pringle T. D. D., Duckett S.: *Meat Sci.* 65, 45 (2003).
- Downey G., Beauchene D.: *Meat Sci.* 45, 353 (1997).
- Thyholt K., Isaksson T.: *J. Sci. Food Agric.* 73, 525 (1997).
- Windham W. R., Barton F. E., Lyon B. G., Lyon C. E.: *Proceedings of the 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy held in Montreal, Canada on 6-11 August 1995*, (Davies A.M.C., Williams P., ed.), str. 596–600.
- French P., O'Riordan E. G., Monahan F. J., Caffrey P. J., Money M. T., Troy D. J., Moloney A. P.: *Meat Sci.* 57, 379 (2001).

52. Cozzolino D., Murray I.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 10, 37 (2002).
53. Spray M. J., Scotter C. N. G., Hall M. N.: *Tech. Mem. Campden Food and Drink Research Association*, UK, 1990, str. 585.
54. Rannou H., Downey G.: *Anal. Commun.* 34, 401 (1997).
55. McElhinney J., Downey G., O'Donnell, C.: *J. Food Sci.* 64, 587 (1999).
56. McElhinney J., Downey G., Fearn T.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 7, 145 (1999).
57. Meullenet J. F., Jonville E., Grezes D., Owens C. M.: *J. Texture Stud.* 35, 6 (2004).
58. Savenije B., Geesink G. H., Van der Palen J. G. P., Hemke G.: *Meat Sci.* 73, 1 (2006).
59. Garcia-Rey R. M., Garcia-Olmo J., De Pedro E., Quiles-Zafra R., De Castro M. D. L.: *Meat Sci.* 70, 2 (2005).
60. Büning-Pfaue H.: *Food Chem.* 82, 107 (2003).
61. Isaksson T., Nilsen B. N., Togersen G., Hammond R. P., Hildrum K. I.: *Meat Sci.* 43, 3 (1996).
62. Togersen G., Arnesen J. F., Nielsen B. N., Hildrum K. I.: *Meat Sci.* 63, 4 (2003).
63. Anderson N. M., Walker P. N.: *ASAE* 46, 1 (2003).
64. Hildrum K. I., Nilsen B. N., Westad F., Wahlgren N. M.: *J. Near Infrared Spectrosc.* 12, 6 (2004).
65. Forrest J. C., Morgan M. T., Borggaard C., Rasmussen A. J., Jespersen B. L., Andersen J. R.: *Meat Sci.* 55, 1 (2000).
66. Hoving-Bolink A. H., Vedder H. W., Merks J. W. M., De Klein W. J. H., Reimert H. G. M., Frankhuizen R.: *Meat Sci.* 69, 3 (2005).

J. Mlček^a, O. Rop^a, K. Šustová^b, J. Simeonovová^b, and R. Gál^a (^a *Department of Food Technology and Microbiology, Tomas Bata University, Zlin*, ^b *Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Potentials of NIR Spectroscopy in Meat Industry**

Near infrared spectroscopy (NIRS) uses the near infrared region of electromagnetic radiation (wavelength ca. 800–2500 nm). The present review describes various applications of the NIRS technique in the meat industry for quantitative characteristics of meat, but also in assessment of meat quality and technological and sensory parameters. The NIRS technique is superior to classical methods in the speed of analyses and possibility of simultaneous non-destructive measurements. This brings about a great potential for on-line analysis without using chemicals.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

POSOUZENÍ ČICHOVÉHO VNÍMÁNÍ PROSTŘEDNICTVÍM KOMERČNĚ DOSTUPNÉ SADY PACHŮ

**DOBROMILA LEITNEROVÁ, ZDEŇKA
PANOVSKÁ, ALENA VÁCHOVÁ a BARBORA
BOHÁČKOVÁ**

*Ústav chemie a analýzy potravin, Fakulta potravinářské a
biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
dobromila.leitnerova@vscht.cz*

Došlo 8.10.09, přepracováno 4.2.10, přijato 12.2.10.

Klíčová slova: čich, pach, poruchy čichu, práh detekce

Úvod

Čich je vývojově nejstarší smysl, přítomný v různé formě u všech živočišných skupin. Čichové chemoreceptory rozlišují nepatrné rozdíly ve struktuře molekul vyvolávajících pach. Citlivost k pachům se individuálně i mezi pohlavími značně liší. Pachem se podle normy ČSN ISO 5492 rozumí organoleptická vlastnost vnímaná prostřednictvím čichového orgánu při čichání určitých těkavých látek¹. Termín pro pach je citově neutrální, avšak někdy může být zaměňován s termínem zápach, kterým se označují nepříjemné čichové vjemy.

Čichové vnímání je ovlivněno mnoha faktory: kromě intenzity pachu ovlivňuje vnímání věk, pohlaví, prostředí, adaptace, kouření, užívání léků, ale i choroby čichového ústrojí či duševní choroby. Pokud je intenzita pachu příliš silná, jsou čichové buňky nasyceny a tím je zabráněno vnímat další podněty². Významným faktorem ovlivňujícím čichové vnímání je věk, s rostoucím věkem klesá citlivost čichových receptorů. U osob mladších 65 let se poruchy čichu vyskytují u 1–2 % populace, ve věkovém rozmezí 65–80 let je poškození u 60 % a u osob starších 80 let je postiženo poruchou čichu 80 % populace³. Na vnímání pachů má vliv také pohlaví. Ženy jsou schopny vnímat některé pachy mnohem citlivěji než muži⁴. Větší citlivost žen byla pozorována u pachů jako je formylacetát, fenylethylalkohol, mošus, androstenon a dalších na bázi steroidů⁵. Dalším z faktorů ovlivňujícím čichové vnímání je adaptace na čichový podnět. Při adaptaci postupně dochází ke ztrátě schopností vnímat nízké koncentrace látky. Bylo

pozorováno, že rovněž kouření snižuje citlivost čichových buněk, avšak ve srovnání s rostoucím věkem je vliv kouření zanedbatelný⁶. Vliv na čichové vnímání mají i choroby horních cest dýchacích, choroby zubů a další. Je rovněž známa řada poruch čichu a jeho vnímání. Příčinou poruch mohou být různé alergie, virové infekce i užívání některých léků (převážně antibiotik). Poruchy čichu jsou často spjaté s dalšími chorobami, např. osoby trpící depresí mohou mít sníženou schopnost čichového vnímání. Trvalou či přechodnou ztrátu čichu mohou způsobit i některé páry chemikálií (kyselina sírová, formaldehyd)⁷. Choroby čichového vnímání mohou být trvalé či dočasné nebo úplně či specifické. Poruchy čichu jsou klasifikovány jako „-osmie“. Anosmie je ztráta čichového vnímání. Hyperosmie je definována jako zvýšená citlivost na pachy, hyposmie je naopak snížená schopnost rozpoznat pach. K parosmii dochází, když je vjem pachové látky vnímán jako vjem jiné pachové látky, dochází tak ke zkreslení čichového vnímání. Pokud je vnímání pachů zkreslené a navíc je pachová látka vnímána nepříjemně, jedná se o kakosmii. Čichový vjem bez podnětu je označován za phantosmii, jedná se o čichové halucinace^{8,9}. Udává se, že výskyt hyposmie nebo anosmie může indikovat začátek Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby¹⁰.

Pro každé senzoričké hodnocení je nezbytný panel hodnotitelů. Pro výcvik posuzovatelů panelu při zjišťování a rozlišování pachů se postupuje podle normy ČSN ISO 5496. V normě jsou uvedeny tři možné způsoby přípravy pachových látek a to pro posuzování pachů v nádobkách, na čichacích papírcích a v kapslích. Při posuzování pachů v nádobkách se pachová látka vybere ze seznamu pachových látek uvedených v normě nebo se vhodně podle zaměření zvolí a nanese se přímo na vatou nebo filtrační papír v nádobce. Jako nádobku lze použít širokohrdlé láhve se zábrusovou zátkou o vhodném objemu a nebo kádinky, které lze zakrýt hodinovým sklem. Jako čichací papírek se volí filtrační papír o proměnlivé poréznosti ohraničený značkou na spodním konci 5–10 cm od okraje. Čichací papírek se krátce namočí do roztoku dané pachové látky po značku a potom se na několik vteřin ponechá osušit, aby došlo k odpaření rozpouštědla. Pach z čichacího papírku je uvolňován pouze omezenou dobu v závislosti na vybrané pachové látce. Pod termínem pachové látky v kapslích se rozumí především komerčně dostupné pachy na papírových nosičích, které se uvolňují např. škrábáním¹¹.

Existuje celá řada komerčně dodávaných testů pro určování pachů a posouzení poruch čichu. V USA je nejpožívanější test vyvinutý na Univerzitě v Pensylvánii nazvaný „Smell Identification Test“ (UPSIT), který je někdy označován jako test „scratch and sniff“ („seškrábej a přičichni“). Obsahuje čtyři sady připomínající brožury, v každé sadě je 10 pachů. K uvolnění pachu, který je umís-

těn na papírovém nosiči, dojde po seškrábání. Vnímání pach je vybrán ze čtyř předtištěných deskriptorů. Čich v pořádku mají ti, kteří v UPSIT testu dosáhnou ze 40 odpovědí 34 správných (jedná-li se o ženy) nebo 33 správných odpovědí (jedná-li se o muže). Slabá hyposmie je považována při počtu 31–33 správných odpovědí u žen nebo při počtu 30–32 odpovědí u mužů. O mírnou hyposmii se jedná při počtu 26–30 správných odpovědí u žen nebo při 26–29 správných odpovědích u mužů. Silná hyposmie je při počtu správných odpovědí 19–25 u žen nebo 19–25 odpovědí u mužů. Úplná anosmie je definována při 6–18 správných odpovědích^{12–14}. Dalším rozšířeným testem je CCCRC („The Connecticut Chemosensory Clinical Research Center Test“), který se skládá ze dvou sad: jedna je zaměřena na určování pachů a druhá na stanovení prahu detekce pro butan-1-ol trojúhelníkovou zkouškou. Pro prah detekce se používá 8 lahviček se vzrůstající koncentrací butan-1-olu v neionizované vodě, pach se uvolní po stlačení rozprašovače na lahvičce. Nejvyšší koncentrace butan-1-olu je 4 % ve vodě, další lahvičky jsou postupně naředěny v poměru 1:3. Pro určování pachů se používá 8 lahviček s různými pachovými látkami a vybírá se z 16 předtištěných deskriptorů, které jsou společné pro všechny pachové látky¹⁵. Test rozšířený převážně v Německu nazvaný „Sniffin´ Sticks Test“ zaměřený na rozpoznávání pachů, určení prahu detekce butan-1-olu trojúhelníkovou zkouškou a rozlišení vůní trojúhelníkovou zkouškou¹⁶. Ve Švýcarsku je používán test „Smell Diskettes Test“, který se skládá z 8 destiček obsahujících rozdílné pachy. Po otevření destičky dojde k uvolnění pachu. Vnímání pach se zaznamenává do formuláře, kde je na výběr ze tří možností, které jsou znázorněny obrázkem. Všechny 8 nebo i 7 správně určených pachů znamená, že čich je v pořádku, při počtu 6 a méně správných odpovědí se usuzuje na poruchu čichu zvanou hyposmie, při počtu 3 a méně odpovědí se usuzuje na anosmii, která se potvrdí tím, že hodnotitel není schopen rozpoznat prah detekce pro vanilku o koncentraci 15,04 ng l⁻¹ (cit.¹⁷) „Sniff Magnitude Test“ (SMT) je další z testů, který je možno využít ke klinickému testování čichového smyslu člověka. Tato metoda je založena na skutečnosti, že člověk s dobrým čichem stahuje nosní dírky v případě, že jeho čichové buňky zachytí podnět pachové látky. Když má člověk z nějakého důvodu neúplný čich, pak nosní dírky v přítomnosti pachové látky nestahuje. Hodnotitel má v každé nosní dírce umístěnou tenkou trubičku a pomocí speciálního softwaru je sledován pohyb nosních dírek v závislosti na tlaku vyvíjeného na trubičku. Změny tlaku jsou rozdílné při čichání čistého vzduchu od vzduchu obsahujícího pachovou látku^{18,19}. Jedním z jednoduchých testů je „Alcohol Sniff Test“ (AST) obsahující jako pachovou látku isopropanol. Při tomto testu je jako vzorek používán vatový tampón obsahující 70% roztok isopropanolu ve vodě. Testovaná osoba je nejdříve seznámena s pachem isopropanolu, potom zavře oči, tampón s pachovou látkou je jí přibližován ze vzdálenosti 30 cm od nosu, až do vzdálenosti, kdy ucítí pach isopropanolu. S každým nadechnutím je tampón přibližován zhruba o jeden centimetr blíž k nosu. Tento test

slouží jako rychlý test k odhalení anosmie²⁰. Nedávno představila společnost Unilever sadu „Common Flavour Language“ (CFL), která obsahuje 54 fixů s pachy, s kterými se lze setkat v potravinářství. Každý z pachů je dále doplněn o asociace – např. u pachu vývaru jsou uvedeny asociace jako maggi a bujón v kostce. Stabilita sady je minimálně 6 měsíců²¹.

Vzhledem k velkému množství komerčně dostupných sad jsme vyzkoušeli sadu pro určování pachů nazvanou Sniffin´ Sticks. Jak je patrné z názvu, jedná se o fixy s tím rozdílem, že tělo fixy obsahuje tampón s určitou pachovou látkou. K uvolnění pachu dochází po otevření víčka fixy. Tuto sadu jsme použili k otestování studentů prvního až třetího ročníku bakalářského studia na fakultě potravinářské a biochemické technologie na VŠCHT v Praze. Cílem bylo také zjistit, zda někdo ze sledované skupiny studentů netrpí některou z poruch čichového vnímání. Výhodou použití této sady je jednoduchá manipulace i skladování a rovněž odpadá i příprava vzorků, proto by se mohla uplatnit i pro výcvik hodnotitelů v různých potravinářských podnicích, kde se uplatňuje hodnocení pachů.

Experimentální část

Materiál a metody

Sada Sniffin´ Sticks, dodávaná výrobcem Burghart Medizintechnik-Německo, se skládá ze tří částí: rozpoznávání pachů, určení prahu detekce a rozlišení pachů prostřednictvím trojúhelníkové zkoušky.

První testovací sada je zaměřena na rozpoznávání pachů, skládá se z 12 fixů s rozdílnými pachovými látkami. Formulář dodávaný výrobcem k sadě obsahuje pro každou fixu čtyři předepsané pachy, z kterých hodnotitel nucenou volbou zvolí jeden pach. Před tím než hodnotitelé obdrželi formulář s předtištěnými deskriptory, měli za úkol vlastními slovy popsat vnímaný pach každé fixy metodou vlastního popisu. Správné odpovědi při rozpoznávání pachů byly hodnotitelům sděleny až při dalším sezení, v kterém rozpoznávali pachy nucenou volbou. Druhá a třetí testovací sada je sestavena jako trojúhelníková zkouška. Každá obsahuje 16 trojic fixů. Nucenou volbou je vybrán vždy jeden fix z trojice, který se od zbývajících dvou liší. Druhá sada zaměřená na prah detekce obsahovala fixy se stoupající koncentrací butan-1-olu, z trojice pouze jedna obsahovala butan-1-ol. Hodnotitel začínal fixou označenou číslem 16 s nejnižší koncentrací butan-1-olu. Pokud dvakrát po sobě správně určil v trojici butan-1-ol, test byl ukončen. Hodnota pro prah detekce byla spočítána jako aritmetický průměr hodnot dvou správně určených čísel fixů. U třetí sady byly dvě pachové látky stejné a jedna rozdílná, úkolem bylo vybrat z trojice pachovou látku, která je rozdílná.

Podmínky při hodnocení

Protože byly fixy v druhé a třetí sadě barevně označeny podle svého obsahu, měli hodnotitelé při čichání zakry-

té oči. Testovanému vždy musela asistovat ještě další osoba. Asistující osoba zaznamenávala výsledky testu a dbala na to, aby zkouška správně probíhala. Při čichání hodnotitelé přidržovali fixy ve vzdálenosti 2 cm od nosních dírek po dobu 3–4 sekund. Fixy byly vždy uzavřeny odpovídajícím víčkem a hodnotitelé byli požádáni, aby se hrotů fix nedotýkali.

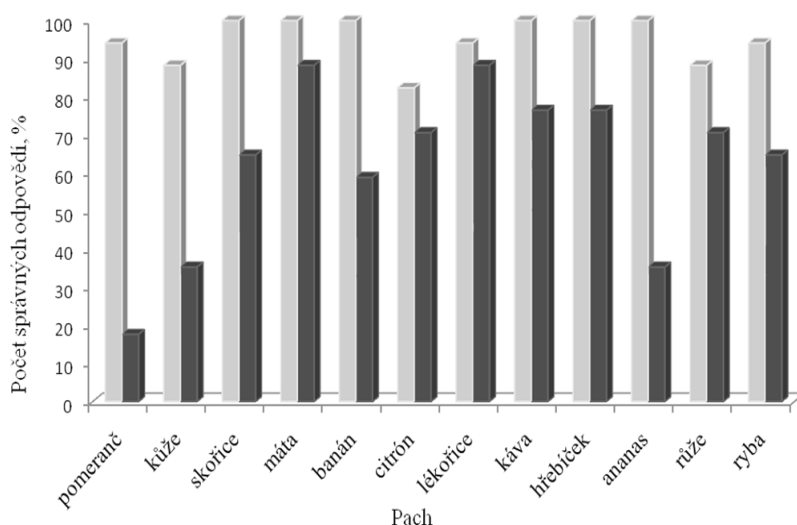
Místnost, ve které bylo prováděno hodnocení, byla vybavena podle normy ISO 8589. Hodnocení se zúčastnilo celkem 127 studentů (86 % žen a 14 % mužů) prvního až třetího ročníku bakalářského studia a čtvrtého ročníku magisterského studia z Fakulty potravinářské a biochemické technologie na VŠCHT v Praze ve věku 20–26 let. Všichni studenti absolvovali cvičení i přednášky v rámci

předmětu Senzorická analýza potravin. Studenti byli vybíráni tak, aby se jednalo o nekuřáky a zdravé jedince bez alergií či nachlazení.

Výsledky a diskuse

Určování jednotlivých pachů metodou volného popisu a nuceného výběru (první sada Sniffin' Sticks)

Na obr. 1 je znázorněno procentuální zastoupení správných odpovědí u první sady při volném popisu, tak i při použití formuláře s předtištěnými deskriptory. Ukázka



Obr. 1. Počet správných odpovědí při určování jednotlivých pachů; ● metodou volného popisu, ● nucenou volbou z předtištěných deskriptorů

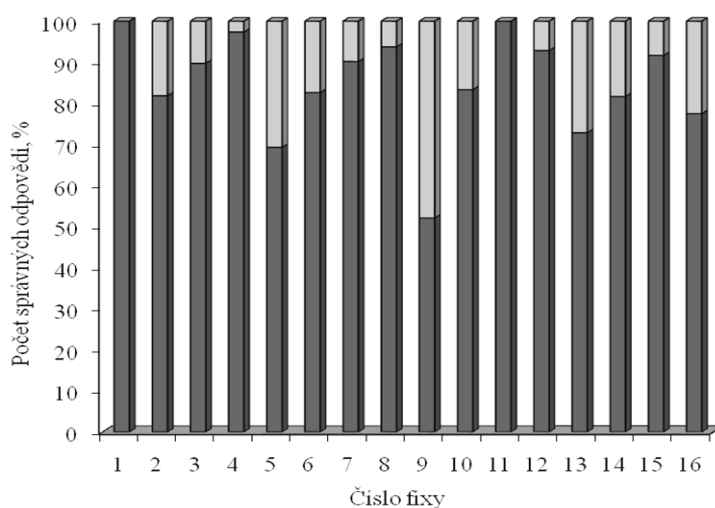
Tabulka I
Seznam předtištěných deskriptorů pro jednotlivé fixy

Číslo fixy	Pach			
Fix č. 1	pomeranč	ostružina	jahoda	ananas
Fix č. 2	kouř	lepidlo	kůže	tráva
Fix č. 3	med	vanilka	čokoláda	skořice
Fix č. 4	pažitka	máta	jedle	cibule
Fix č. 5	kokos	banán	vlašský ořech	třešeň
Fix č. 6	broskev	jablko	citrón	grapefruit
Fix č. 7	lékořice	třešeň	máta	sušenky
Fix č. 8	cigareta	káva	víno	kouř
Fix č. 9	hřebíček	pepř	skořice	hořčice
Fix č. 10	hruška	švestka	broskev	ananas
Fix č. 11	heřmánek	maliny	růže	třešeň
Fix č. 12	chléb	ryby	sýr	šunka

formuláře s předtištěnými deskriptory je uvedena v tab. I. Při použití metody volného popisu bylo pro hodnotitele obtížné určit pach pomeranče, kůže a ananasu. U formuláře s předtištěnými deskriptory se jako nejjednodušší při rozpoznávání jevil pach skořice, máty, banánu, kávy, hřebíčku a ananasu. Obtížné bylo určit citrón, kůži a růži.

Určování prahu detekce butan-1-olu (druhá sada Sniffin' Sticks)

Prostřednictvím druhé sady byl určován práh detekce. Vzhledem k tomu, že výrobce neudává koncentrace butan-1-olu v jednotlivých fixách, zjistí se pouze číslo, které je průměrem po sobě jdoucích dvou správně určených fixů s butan-1-olem. Toto číslo se vypočítá pro každého hodno-



Obr. 2. Počet správných odpovědí při rozlišování pachů trojúhelníkovou zkouškou; • správné odpovědi, ◐ špatné odpovědi

Tabulka II

Popis jednotlivých pachů u třetí sady

Číslo fixy	Rozdílný pach	Shodné pachy
1	2-ethylhexyl-acetát (ovocná, po pomeranči, po jasmínu)	skořicový aldehyd (kořeněná, po skořici)
2	butan-1-ol (žluklá, nasládlá)	2-fenylethan-1-ol (slabě květinová vůně)
3	3-methyl-1-butyl acetát (banánová)	anethol (bylinná, po anýzu),
4	anethol (bylinná, po anýzu),	eugenol (hřebíček)
5	geraniol (růže)	2-ethylhexyl-acetát (ovocná, po pomeranči, po jasmínu)
6	2-fenylethan-1-ol (slabě květinová vůně)	3-methyl-1-butyl acetát (banánová)
7	(R)-(+)-limonen (svěží, citrusová, po pomerančích)	(D)-(+)-fenchon (kafr)
8	(R)-(-)-karvon (máta)	(S)-(+)-karvon (kmín)
9	(S)-(-)-limonen (terpentýn)	citronellal (bylinná, výrazná citrónová vůně)
10	2-fenylethan-1-ol (slabě květinová vůně)	(+)-menthol (silná, chladivá, máta)
11	(S)-(+)-karvon (kmín)	geraniol (růže)
12	butan-1-ol (žluklá, nasládlá)	(S)-(-)-limonen (terpentýn)
13	citronellal (bylinná, výrazná citrónová vůně)	linalool (levandule)
14	pyridin (rybina)	(S)-(-)-limonen (terpentýn)
15	eugenol (hřebíček)	skořicový aldehyd (kořeněná, skořice)
16	1,8-cineol (kafr)	α -jonon (květinová, fialky)

titele. Průměrná hodnota čísla pro práh detekce byla 10,07 z celkového počtu 16 fixů.

Rozlišování pachů trojúhelníkovou zkouškou (třetí sada Sniffin' Sticks)

U třetí sady určovali hodnotitelé vždy rozdílný pach z dané trojice. V tab. II jsou uvedeny jednotlivé pachové látky, v závorce je uveden slovní popis pachu odpovídající jednotlivým látkám.

Na obr. 2 je znázorněno procentuální zastoupení správných a špatných odpovědí u této trojúhelníkové zkoušky při rozlišování pachů. Z grafického znázornění je patrné, že hodnotitelé neměli problémy s určováním pachů u fixů s číslem 1 a 11. Naopak nejobtížnější bylo rozpoznat pach z trojice u fixy označené číslem 9 obsahující citronellal a (S)-(-)-limonen.

Určení čísla TDI a DI

Pro zjištění poruch čichu (převážně hyposmie a anosmie) je výrobcem doporučeno vypočítat čísla TDI a DI. Číslo TDI (zkratka je odvozena z počátečních písmen anglických slov threshold, discrimination, identification) se vypočítá tak, že se sečtou správné odpovědi při určování pachů nucenou volbou s číslem pro práh detekce a s počtem správných odpovědí při rozlišování pachů trojúhelníkovou zkouškou. Číslo DI (zkratka je odvozena z počátečních písmen anglických slov discrimination, identification) se zjistí jako součet čísla pro práh detekce s počtem správných odpovědí při určování pachů nucenou volbou. Výrobcem je dodáván manuál pro interpretaci vypočtených čísel. Pokud je číslo TDI vyšší než 30, pak lze říci, že čich hodnotitele je v pořádku. Je-li TDI menší než 30, pak lze říci, že hodnotitel má poruchu čichu zvanou hyposmie. Pokud je číslo DI menší než 15, pak se jedná o poruchu čichu zvanou anosmie.

Pro každého hodnotitele byla vypočtena hodnota DI. Z vypočtených hodnot DI byla minimální 22 a maximální 28. V programu STATISTICA (verze 8) byly dále vypočítány

statistické charakteristiky souboru a to: spodní kvartil, horní kvartil, modus, medián, průměr a směrodatná odchylka. Tato data jsou uvedena v tab. III. Zjištěné hodnoty DI byly pro všechny hodnotitele vyšší než 15, tedy nebyla zjištěna u žádného ze studentů anosmie. Zda získaný soubor dat vykazuje normální rozdělení hodnot, bylo ověřováno prostřednictvím testu Kolmogorova-Smirnova. Tímto testem nebylo potvrzeno na hladině pravděpodobnosti 90 %, že se jedná o normální rozdělení. Dále byla vypočtena hodnota TDI, která u dvou studentek byla 27,5 a 28,5, což je nižší než limitní hodnota 30. Lze tedy říci, že pouze u dvou studentek byla zjištěna porucha čichu zvaná hyposmie. U ostatních hodnotitelů byla hodnota TDI vyšší než 30 (maximální hodnota byla 40,5), tedy jejich čich byl v pořádku. Ve věkovém rozmezí 20–26 let byla zjištěna porucha čichu u 2 studentek (tedy u 1,6 % ze sledovaného souboru), což je v souladu s údaji uvedenými v literatuře. Statistické charakteristiky hodnot TDI jsou rovněž uvedeny v tab. III. Podle testu Kolmogorova-Smirnova pro hodnoty TDI nebylo potvrzeno na hladině pravděpodobnosti 95 %, že se jedná o normální rozdělení.

Závěr

Komerčně dostupná sada Sniffin' Sticks vedla u sledovaného vzorku studentů k rychlému odhalení poruch čichu. Porucha čichu ve věkovém rozmezí 20–26 let byla zjištěna u 2 studentek, což je 1,6 % z celkového počtu hodnotitelů. Vzhledem k tomu, že sledovaný vzorek se skládal z velkého množství žen a nízkého počtu mužů, nebylo statisticky vyhodnocováno, zda ženy jsou k vnímání pachů citlivější, jak uvádí autoři Hari a spol. Pro výcvik hodnotitelů se jako nejjednodušší jeví první sada Sniffin' Sticks pro určování jednotlivých pachů prostřednictvím nucené volby, která se velmi snadno a rychle vyhodnocuje. Výhodou je rovněž připravená druhá sada o různých koncentracích pro určení prahu detekce, ale i různorodé zastoupení pachů v třetí sadě. Nevýhodou kromě ceny je omezená stabilita celé sady (výrobcem je garantována stabilita pachů jeden rok).

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu (projekt MSM 6046137305).

Tabulka III
Statistické charakteristiky získané u hodnot DI a TDI

Statistická charakteristika	DI	TDI
Minimum	22	27,5
Maximum	28	42,5
Spodní kvartil	24	32,5
Horní kvartil	26	37,5
Modus	24	34,5
Medián	25	34,5
Průměr	24,46	34,25
Směrodatná odchylka	1,52	2,84

LITERATURA

1. ČSN ISO 5492: Senzorická analýza – Slovník (1999).
2. Dalton P., Wysocki C.: *Percept. Psychophys.* 58, 781 (1996).
3. Griffith H. W., Domino F. J.: *The 5-minute Clinical Consult*, str. 1174, 16. vyd. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007.
4. Hari C. K., Wang L., Jacob T. J. C.: *Chem. Senses* 26, 790 (2001).
5. Brewer W., Castle D., Pantelis C., Doherty P.: *Olfaction and the Brain*, str. 185, 1. vyd. Cambridge

- University Press, Cambridge 2006.
6. Venstrom D., Amoore J. E.: *J. Food Sci.* 33, 264 (2006).
 7. Bromley S. M.: *Am. Fam. Physician* 61, 427 (2000).
 8. Comeau T. B., Epstein J. B., Midas C.: *Support Care Cancer* 9, 575 (2001).
 9. Seiden A. M., v knize: *Taste and Smell Disorders: Rhinology and Sinusology*, kap. 2. Thieme, New York 1997.
 10. Hawkes C. H., Shephard B. C., Daniel S. E.: *Q. J. Med.* 92, 473 (1999).
 11. ČSN ISO 5496: *Senzorická analýza – Metodologie – Zastřežení do problematiky a výcvik posuzovatelů pro zjišťování a rozlišování pachů* (1999).
 12. Mackay-Sim A., Doty R. L.: *Aust. J. Otolaryngol.* 4, 174 (2001).
 13. Doty R. L., Frye R. E., Agrawal U.: *Percept. Psychophys.* 45, 381 (1989).
 14. Briner H. R., Simmen D., Jones N.: *Clin. Otolaryngol.* 28, 417 (2003).
 15. Hummel T., Sekinger B., Wolf S. R., Paulis E., Kobal G.: *Chem. Senses* 22, 39 (1997).
 16. Hummel T., Kobal G., Gudziol H., Mackay-Sim A.: *Rhinology* 264, 237 (2007).
 17. Briner H. R., Simmen D.: *Rhinology* 37, 145 (1999).
 18. Frank R. A., Dulay M. F., Niergarth K. H., Gesteland R. C.: *Physiol. Behav.* 8, 475 (2004).
 19. Frank R. A., Dulay M. F., Gesteland R. C.: *Physiol. Behav.* 78, 195 (2003).
 20. Davidson T. M., Murphy C.: *Arch. Otolaryngol.* 123, 591 (1997).
 21. Valstar R., Bas F., Smit G.: *3rd European Conference on Sensory and Consumer Research: A Sense of Innovation, Hamburg, Germany, 7–10 September 2008*, Abstract Book (Elsevier, Oxford 2008), Poster no. P64.

D. Leitnerová, Z. Panovská, A. Váchová, and B. Boháčková (*Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Prague*) **Assessment of Olfactory Perception with a Commercially Available Set of Odours**

Humans are able to perceive thousands of different smells and to detect odours in very low concentrations. Numerous tests of assessment of olfaction were proposed. The aim of this review was to determine the olfactory threshold using sniffing sticks. The test included identification of odorants, a threshold test with butan-1-ol and distinguishing odours. None of the tested persons showed anosmia but two of them were hyposmic. Sniffing sticks are useful for identification and distinguishing of odours. Their advantages over traditional methods are simple use and transferability.

SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ OBSAHU NESTRUKTURNÍCH SACHARIDŮ A ŠKROBU V LISTECH VYŠŠÍCH ROSTLIN METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ ANTHRONOVÉHO ČINIDLA

PETRA TESLOVÁ^a, JIŘÍ KALINA^a a OTMAR
URBAN^b

^a Katedra fyziky, Fakulta Přírodovědecká, Ostravská Univerzita, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ^b CzechGlobe – Centrum pro studium dopadu globální změny klimatu, Laboratoř ekologické fyziologie rostlin, ÚSBE AV ČR, Poříčí 3b, 603 00 Brno
jiri.kalina@osu.cz

Došlo 6.2.09, přepracováno 16.9.09, přijato 29.10.09.

Klíčová slova: anthronové činidlo, spektrofotometrie, kalibrační faktor, nestrukturní sacharidy, škrob, smrk ztepilý, *Picea abies*, buk, *Fagus sylvatica*, oxid uhličitý.

Úvod

Metoda využívající anthronového činidla je založena na reakci vyšších sacharidů a škrobu s anthronem v kyselém prostředí, při které jsou tyto makromolekulární látky převedeny na šesti-uhlíkaté sacharidy. Vzniká zelený kondenzační produkt, který lze následně spektrofotometricky stanovit¹.

Této skutečnosti poprvé využil Dreywood ke stanovení sacharidů². Na práci Dreywooda navázala řada autorů, z nichž nejznámější a nejvíce citovaní jsou asi Yemm a Willis, kteří se ve své práci věnovali jak důkazu, tak stanovení standardů sacharidů běžně se vyskytujících v rostlinném materiálu¹. Od té doby je anthron hojně využíván jako účinné činidlo jak pro kolorimetrická stanovení sacharidů a škrobu v rostlinách, tak např. pro stanovení sacharidů v krvi, moči nebo míšním moku^{3,4}. Na základě našich znalostí však nikdo neuvádí možnost simultánního stanovení jak sacharidů, tak i škrobu z jednoho vzorku rostlinného materiálu.

Cílem této práce bylo: 1) použití metodik využívajících anthronového činidla pro účel vytvoření metodiky simultánního stanovení nestrukturních sacharidů a škrobu v listech vyšších rostlin, a 2) zhodnotit vliv zvýšené koncentrace CO₂ na akumulaci nestrukturních sacharidů a škrobu v asimilačním aparátu dvou druhů dřevin – smrku ztepilého (*Picea abies*) a buku lesního (*Fagus sylvatica*).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Rostliny smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) a buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) (stáří 8 let) byly v průběhu vegetační sezóny 2008 aklimovány v lamelových kultivačních sférách v lokalitě Bílý Kříž (Moravskoslezské Beskydy; 49° 30' S, 18° 32' V, 908 m.n.m., Česká republika), v atmosféře s přirozenou koncentrací CO₂ (385 μmol(CO₂) mol⁻¹) a zvýšenou (dvojnásobnou) koncentrací CO₂ (700 μmol(CO₂) mol⁻¹). Podrobný popis experimentu je uveden v publikaci⁵.

Odběr a stanovení obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu bylo provedeno v září 2008 na plně vyvinutých slunných listech buku a jehlicích smrku (C-1, jehlice roku 2007). Vzorky listů a jehlic (cca 0,1 g) byly odebrány během poledních hodin (11:00–15:00 LEČ). Po určení čerstvé hmotnosti vzorků byla stanovena i jejich projekční plocha⁶. Vzorky byly vystaveny na 10 min ozáření 1000 μmol m⁻² s⁻¹, zmrazeny kapalným dusíkem, vloženy do Dewarovy nádoby (Voyageur 12, Air Liquide, Francie) a při teplotě blízké 77 K převezeny do laboratoře a uchovávány až do doby vlastního zpracování.

Kalibrační přímka

Obsah nestrukturních sacharidů byl stanovován metodou kalibrační přímky sestavené z naměřených hodnot absorpance roztoků směsi standardů D-fruktosy (Roth, Karlsruhe, Německo) a D-glukosy (Penta, Chrudim, ČR) v poměru 9:1 o hmotnostních koncentracích 0; 0,012; 0,024; 0,048; 0,075 a 0,15 mg ml⁻¹ destilované vody. Směrnice kalibrační přímky odpovídá kalibračnímu faktoru v ml mg⁻¹ cm⁻¹ směsi fruktosy a glukosy⁷.

Množství škrobu bylo stanoveno pomocí kalibrační přímky sestavené z naměřených hodnot absorpance roztoků D-glukosy o hmotnostních koncentracích 0; 0,012; 0,024; 0,048; 0,075 a 0,15 mg ml⁻¹ destilované vody. Směrnice kalibrační přímky odpovídá kalibračnímu faktoru v ml mg⁻¹ cm⁻¹ glukosy.

Anthronové činidlo

Anthronové činidlo bylo připraveno rozpuštěním 0,2 g anthronu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) v 8,3 ml 95% ethanolu (Tanda, Olomouc, ČR) a ve 20 ml destilované vody. Poté bylo k roztoku postupně přidáno 100 ml 96% kyseliny sírové (Lachema, Brno, ČR). Roztok je nutné chladit ledem, jelikož se při reakci uvolňuje velké množství tepla. Anthronové činidlo se nedoporučuje používat úplně čerstvé, je lepší ho nechat 3 hodiny stát⁷⁻⁹.

Metodika

Vzorky rostlinného materiálu (cca 0,1 g, viz výše) byly v třecí misce homogenizovány s malým množstvím

MgCO₃ a 2 ml 95% ethanolu. Obsah třecí misky byl převeden do centrifugační zkumavky, třecí miska byla ještě dvakrát promyta 1,5 ml 95% ethanolu a vše bylo převedeno do centrifugační zkumavky. Homogenát byl centrifugován 5 min při 3000 rpm. Takto připravený supernatant lze následně použít např. pro stanovení UV-absorbujících látek a fotosynteticky aktivních pigmentů.

K sedimentu byly přidány 2 ml destilované vody, obsah centrifugační zkumavky byl protřepán a znovu centrifugován 5 min při 3000 rpm. Do odměrné zkumavky byl odlit supernatant obsahující nestrukturní sacharidy. Z důvodu reextrakce nestrukturních sacharidů je třeba zopakovat alespoň ještě jednou předcházející krok.

K sedimentu byl přidán 1 ml 1M roztoku chloralhydrátu (Mach Chemikálie, Ostrava, ČR), obsah centrifugační zkumavky byl protřepán a převeden do teflonových centrifugačních zkumavek o objemu 10 ml (FEP, Nalgene, USA). Zkumavky byly umístěny na 15 min do vroucí vodní lázně, tím došlo k rozpuštění amyloplastů a uvolnění škrobu do roztoku. Po následné centrifugaci (5 min, 3000 rpm) bylo pipetou odebráno 0,5 ml supernatantu obsahujícího škrob, který byl zředěn destilovanou vodou v poměru 1:9.

Při vlastní reakci bylo k 0,5 ml roztoku nestrukturních sacharidů (resp. kalibračního roztoku) přidáno 5 ml anthronového činidla. Vzorky bylo nutné chladit ledem, aby se produkt reakce nerozkládal. Poté byly vzorky zahřívány ve vodní lázni přesně 7,5 min při teplotě 92 °C. Po vyjmutí z vodní lázně byly zchlazeny ledem, promíchány na třepače (IKA MS3 digital, USA) a ponechány při pokojové teplotě.

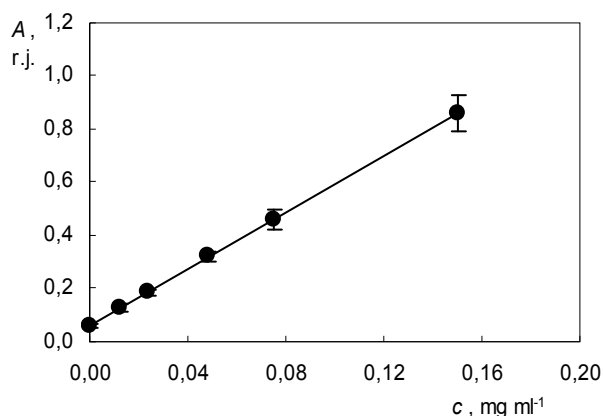
Podobně bylo postupováno při reakci škrobu s athronovým činidlem s tím rozdílem, že k 1 ml roztoku škrobu byly přidány 3 ml anthronového činidla a vzorky byly ponechány ve vroucí vodní lázni 5 min.

Jakmile vzorky dosáhly pokojové teploty, byla změřena jejich absorbance při vlnové délce 625 nm (cit.⁸). K měření absorbance byl použit dvoupraprskový spektrofotometr UV 550 (Unicam, Anglie) a skleněné kyvety (Helma, Německo) o tloušťce 10 mm. Spektrální šířka šterbiny činila 2 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí bylo na základě kalibrační křivky směsi fruktosy a glukosy (9:1), resp. kalibrační křivky glukosy stanoveno množství nestrukturních sacharidů, resp. škrobu v použitém rostlinném materiálu. Vypočtené výsledky byly vztaženy na čerstvou hmotnost a projekční plochu vzorků.

Výsledky a diskuse

Pro stanovení nestrukturních sacharidů byla vytvořena závislost absorbance na koncentraci směsi standardů (obr. 1). Vypočítaný koeficient determinace ($R^2 = 0,999$) plně dovoluje uvedenou kalibrační přímkou využít pro analytické účely stanovení nestrukturních sacharidů z listů vyšších rostlin. Vzhledem k možnosti používat jako referenční vzorek destilovanou vodu není absolutní člen

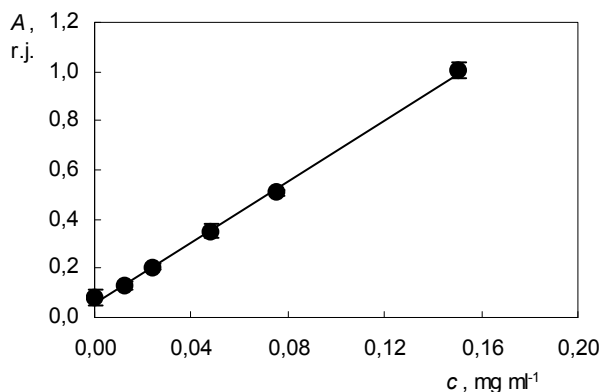


Obr. 1. Kalibrační přímka sestavená z naměřených hodnot absorbancí (A) koncentrační řady směsi standardů D-fruktosy a D-glukosy (v poměru 9:1) o hmotnostních koncentracích 0,150; 0,075; 0,048; 0,024; 0,012 a 0 mg ml⁻¹. Kalibrační faktor v ml mg⁻¹ cm⁻¹ je vyjádřen směrnicí lineární regresní přímky. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=3$), $y = 5,307x + 0,062$, $R^2 = 0,999$

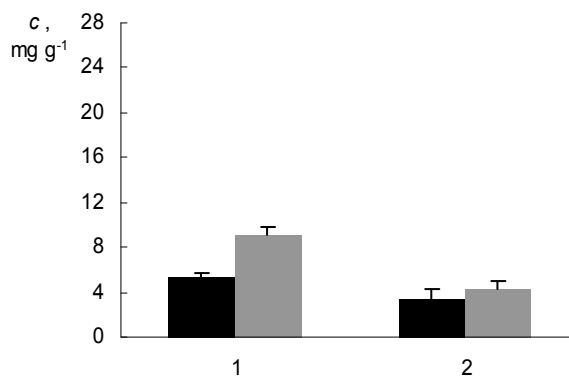
v kalibrační rovnici roven nule, ale nabývá hodnoty +0,052. Tuto hodnotu je nutno odečíst od stanovené absorbance pro neznámý vzorek. Zjištěný kalibrační faktor (5,306 ml mg⁻¹ cm⁻¹), resp. jeho převrácená hodnota (0,18846 mg cm ml⁻¹) dovoluje po vynásobení změřenou absorbancí pro neznámý vzorek určit množství nestrukturních sacharidů v 1 ml extraktu. Po vynásobení celkovým objemem extraktu a dělením hodnotou čerstvé hmotnosti, resp. projekční plochy listů získáme obsah nestrukturních sacharidů v těchto vztažných jednotkách mg g⁻¹, resp. g m⁻². Námí získaná hodnota kalibračního faktoru odpovídá hodnotám uvedeným v dřívějších pracích⁷. Kalibrační přímka byla sestavena i pomocí jednoduššího, jednopaprskového spektrofotometru Specol 220 (Carl Zeiss Jena, Německo) s větší spektrální šířkou šterbiny (3 nm) s obdobným výsledkem (data neuvedena). Pro stanovení nestrukturních sacharidů je tedy možné využít i levnější přístroje. Doporučujeme však možnost takového použití ověřit změřením kalibrační přímky tak, jak je uvedeno výše.

Podobně jako pro stanovení nestrukturních sacharidů byla i pro stanovení škrobu vytvořena závislost absorbance na koncentraci standardu (obr. 2). Vypočítaný koeficient determinace ($R^2 = 0,998$), absolutní člen (+0,059) a kalibrační faktor (6,213 ml mg⁻¹ cm⁻¹), resp. jeho převrácená hodnota (0,16095 mg cm ml⁻¹), dovoluje po vynásobení změřenou absorbancí pro neznámý vzorek určit množství škrobu v 1 ml extraktu a následně i obsah škrobu vztažený na čerstvou hmotnost, resp. projekční plochu listů. Námí získaná hodnota kalibračního faktoru odpovídá hodnotám uvedeným v dřívějších pracích¹⁰.

Tento článek si neklade za cíl vysvětlit příčiny výsledného působení zvýšené koncentrace oxidu uhličitého



Obr. 2. Kalibrační přímka sestavená z naměřených hodnot absorbance (A) koncentrační řady standardu D-glukosy o hmotnostních koncentracích 0,150; 0,075; 0,048; 0,024; 0,012 a 0 mg ml⁻¹. Kalibrační faktor v ml mg⁻¹ cm⁻¹ je vyjádřen směrnici lineární regresní přímky. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=4$); $y = 6,213x + 0,059$, $R^2 = 0,998$

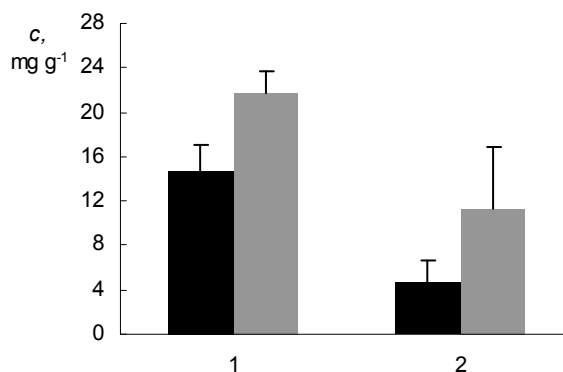


Obr. 3. Obsah nestrukturních sacharidů (1) a škrobu (2) ve slunných jehlicích smrku ztepilého (*Picea abies*), ročník 2007; tmavé sloupce znázorňují rostliny vystavené okolní koncentraci CO₂, světlé sloupce rostliny vystavené zvýšené koncentraci CO₂. Výška sloupců udává průměrné hodnoty, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky ($n=8$)

na asimilační aparát. Má pouze dokumentovat použití našeho přístupu ke stanovení množství nestrukturních sacharidů a škrobu v asimilačním pletivu, jelikož ta významně ovlivňují výslednou fyziologickou odezvu rostlin k působení zvýšené koncentrace CO₂. Použití uvedené metodiky uvádíme na následujících dvou případech, kdy jsme z 0,1 g navážky čerstvé hmotnosti listů simultánně stanovili jak obsah nestrukturních sacharidů, tak i škrobu, a to pro stálezelený smrk a buk. Stanovené a uváděné hodnoty koncentrací řádově odpovídají koncentracím nestrukturních sacharidů a škrobu uváděných v dřívějších pracích pro jiné rostliny^{7,11,12}.

Jak bylo uvedeno výše, výsledky byly vztaženy na čerstvou hmotnost a projekční plochu listů. Vzhledem k tomu, že trend reakce obsahu/koncentrace na zvýšenou koncentraci CO₂ je stejný, uvádíme pouze výsledky koncentrací vztažené na čerstvou hmotnost. Obsah asimilátů byl stanovován v září 2008 u slunných jehlic smrků kultivovaných v přirozené a zvýšené koncentraci CO₂ (obr. 3). Smrky kultivované ve zvýšené koncentraci CO₂ vykazují nárůst jak obsahu nestrukturních sacharidů (o 70 %), tak i obsahu škrobu (o 26 %). Tento výsledek je v dobré shodě s dřívějšími studii zabývajícími se působením zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na asimilační aparát^{11,13}. Akumulace sacharidů a škrobu v rostlinném pletivu pak může být jednou z příčin zpětnovazebné limitace rychlosti fotosyntézy (např. přehledný článek¹⁴).

Ve stejném období bylo provedeno stanovení nestrukturních sacharidů a škrobu ve slunných listech buku, který byl rovněž kultivován v přirozené a zvýšené koncentraci CO₂ (obr. 4). I v tomto případě byl pozorován nárůst obsahu nestrukturních sacharidů (o 49 %) i škrobu (o 145 %). Podobný výsledek byl získán při kultivaci dvou druhů klonů topolů v přirozené a zvýšené koncentraci oxidu uhličitého¹².



Obr. 4. Obsah nestrukturních sacharidů (1) a škrobu (2) ve slunných listech buku lesního (*Fagus sylvatica*); tmavé sloupce znázorňují rostliny vystavené okolní koncentraci CO₂, světlé sloupce rostliny vystavené zvýšené koncentraci CO₂. Výška sloupců udává průměrné hodnoty, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky ($n=8$)

Z výše uvedeného můžeme soudit, že námi použitý přístup, kdy jsme spojili dvě metodiky v jednu simultánní, je možné využít pro stanovení jak nestrukturních sacharidů, tak i škrobu, a to z minimálního množství vzorků (0,1 g čerstvé hmotnosti). Uvedenou metodiku lze navíc aplikovat za použití jednodušších a levnějších spektrofotometrů.

Závěr

Tato práce je zaměřena na vytvoření metodiky pro simultánní stanovení obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu v rostlinném pletivu vyšších rostlin. Obě metody jsou založeny na spektrofotometrické analýze zeleného kondenzačního produktu (s maximem absorpance při vlnové délce 625 nm), který vzniká zahříváním sacharidů s anthronem v kyselém prostředí. Byly vytvořeny kalibrační přímky sestavené z průměrných hodnot absorpance čtyř nezávislých měření koncentrační řady roztoků směsi D-fruktózy a D-glukózy (v poměru 9:1) (pro stanovení nestrukturních sacharidů) a D-glukózy (pro stanovení škrobu) v rozmezí hmotnostních koncentrací 0–0,150 mg ml⁻¹. Směrnice kalibrační přímky odpovídá kalibračnímu faktoru. Hodnota kalibračního faktoru činila 5,306 ml mg⁻¹ cm⁻¹ (pro stanovení nestrukturních sacharidů) a 6,213 ml mg⁻¹ cm⁻¹ (pro stanovení škrobu). Vypočítaný koeficient determinace $R^2 = 0,999$, resp. $R^2 = 0,998$, plně dovoluje uvedenou kalibrační křivku využít pro analytické účely stanovení nestrukturních sacharidů, resp. škrobu, v listech vyšších rostlin.

Vytvořená metodika byla aplikována v experimentu studujícím vliv zvýšené koncentrace CO₂ na asimilační aparát buku a smrku. Množství sacharidů a škrobu ve vzorcích buku a smrku bylo vypočteno z příslušných regresních rovnic. Získané hodnoty byly vztaženy na čerstvou hmotnost v mg g⁻¹, resp. projekční plochu listů v g m⁻². Metodika využívající anthronového činidla poskytovala výsledky srovnatelné s literaturou a je tudíž aplikovatelná pro stanovení obsahu sacharidů a škrobu v listech vyšších rostlin.

Tato práce byla vypracována v rámci projektu GA ČR č. 522/06/0930 „Změny aktivity a obsahu enzymu Rubisco při působení zvýšené koncentrace CO₂“ a projektu MŠMT NPVII („INTERVIRON“, 2B06068).

LITERATURA

1. Yemm E. W., Willis A. J.: *Biochem J.* 57, 508 (1954).
2. Dreywood R.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 18, 499 (1946).
3. Roe J. H.: *J. Biol. Chem.* 208, 889 (1954).
4. Zweens J., Bouman P. R.: *Diabetologia* 4, 278 (1968).
5. Urban O., Janouš D., Pokorný R., Marková I., Pavelka

- M., Fotík Z., Šprtová M., Kalina J., Marek M. V.: *Photosynthetica* 39, 395 (2001).
6. Kalina J., Slovák V.: *Ecology (Bratislava)* 3, 163 (2004).
7. Gloser V., Košovcová M., Gloser J.: *Biologia* 59, 179 (2004).
8. Grospietsch M.: *Symposium o metodách používaných v Česku a na Slovensku při studiu rostlin, Vranovská Ves u Znojma, 3.-6. listopadu 1997*, Sborník příspěvků (Petrášek J. ed.), str. 39. Společnost experimentální biologie rostlin a Ústav experimentální botaniky AVČR, 1997.
9. Teslová P.: *Bakalářská práce*. Ostravská Univerzita, Ostrava 2008.
10. Ghosh A., Charalampous F., Sison Y., Borer R.: *J. Biol. Chem.* 253, 2522 (1960).
11. Zhao D., Reddy K. R., Kakani V. G., Read J. J., Sullivan J. H.: *Plant, Cell Environ.* 26, 771 (2003).
12. Kalina J., Ceulemans R.: *Photosynthetica* 33, 51 (1997).
13. Marek M. V., Kalina J., Matoušková M.: *Photosynthetica* 31, 209 (1995).
14. Urban, O.: *Photosynthetica* 41, 9 (2003).

P. Teslová^a, J. Kalina^a, and O. Urban^b
^aDepartment of Physics, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava, ^bCzechGlobe – Center for Global Climate Change Impacts Studies, Laboratory of Ecological Physiology of Plants, Institute of Systemic Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno): **Simultaneous Determination of Non-Structural Saccharides and Starch in Leaves of Higher Plants Using Anthrone Reagent**

This review is focused on development of simultaneous determination of non-structural saccharides and starch in leaves of higher plants. The method is based on spectrophotometric analysis of the condensation product obtained by heating saccharides or starch with anthrone in acid solution. The determination was calibrated using D-fructose and D-glucose ($R^2 = 0.999$ and 0.998). The method was used for the determinations in leaves of European beech and in needles of Norwegian spruce cultivated under ambient conditions at elevated CO₂ concentrations. The found contents were comparable with the literature values.

CHARAKTERIZÁCIA VLASTNOSTÍ A KRYŠTALIZÁCIA MALÁTDEHYDROGENÁZY *Streptomyces coelicolor A3 (2)*

DARINA MIKULÁŠOVÁ, MICHAELA
KOHÁRYOVÁ, PETRA ŠTEFANKOVÁ
a MARTA KOLLÁROVÁ

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská
dolina CH1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
mikulaso@fns.uniba.sk, koharyova@fns.uniba.sk,
kollarm@fns.uniba.sk

Došlo 28.1.01, prijaté 10.2.10.

Kľúčové slová: malátdehydrogenáza (MDH), *Streptomyces coelicolor*, kryštalizácia

Úvod

Veľká časť bakteriálnych malátdehydrogenáz (MHD) je špecifická na koenzým NADH. Výnimku tvorí MDH *Corynebacterium glutamicum*¹ a niektorí zástupcovia z rodu *Bacillus*². MDH zo *Streptomyces aureofaciens* vykazuje vysokú špecifitu pre koenzým NAD(H) a s koenzým NADP(H) je takmer neaktívna³. Pre lepšie porozumenie koenzýmovej špecifity v NAD-závislej MDH z *Thermus flavus* AT-62 (tMDH) bola vyriešená jej kryštalová štruktúra v komplexe s NADP(H) s rozlíšením 1,65 Å. Táto štruktúra je takmer rovnaká ako v komplexe s NADH. NADP(H) sa viaže na tMDH v opačnej orientácii, kde adenín obsadzuje pozíciu vedľa katalytického miesta a nikotínamid sa viaže do adenín-viažuceho miesta komplexu tMDH-NADH. Toto bol prvý dôkaz alternatívne viažuceho nikotínamidového koenzýmu s tzv. pseudosymetriou v jeho štruktúre⁴.

Štúdium malátdehydrogenáz z ríše Archaea poukázalo na variabilitu ich koenzýmovej špecifity. Špecifitou voči obom koenzýmom – NAD(H) aj NADP(H) sa vyznačuje MDH z hypertermofilnej metanogénnej archaeobaktérie *Methanothermobacter fervidus*⁵. Vyššia afinita ku koenzýmu NADP(H) bola preukázaná tiež stanovením aktivity MDH pochádzajúcej z *Methanococcus jannaschii*. Táto preferencia je vysvetľovaná prítomnosťou glycinu (Gly33) v kofaktor-viažúcom mieste, kde sa väčšinou u iných NAD-závislých malátdehydrogenáz nachádza konzervovaný aspartát alebo glutamát⁶.

Eukaryotické malátdehydrogenázy sú NAD(H)-závislé s výnimkou chloroplastovej svetlom aktivovanej NADP(H)-závislej MDH⁷. Muslin a spol. zamenili dve aminokyseliny v NAD(H)-závislej MDH z *E. coli* za cysteíny, čím vytvorili redox-senzitívny enzým. Oxidáciou cysteínov v uzamknutej doméne mutantného enzýmu tak

fahko napodobnili inaktiváciu tmou redox-senzitívnej chloroplastovej dehydrogenázy⁸.

Predpokladáme, že vyriešenie 3D kryštalovej štruktúry MDH zo *Streptomyces coelicolor A3(2)* umožní definovať koenzýmovú špecifitu tejto grampozitívnej baktérie. Z tohto dôvodu sme pristúpili k príprave nadproduckého kmeňa MDH a k stanoveniu podmienok kryštalizácie tohto proteínu.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene, plazmidy a kultivačné podmienky

Spóry kmeňa *Streptomyces coelicolor A3 (2)* sme získali darom od prof. D. A. Hopwooda. Spóry boli kultivované podľa Hopwooda a spol.⁹ a použité na purifikáciu MDH. Na klonovanie génu *mdh* boli použité bakteriálne kmene *E. coli* MM294 (F⁺, endAJ, hsd17 (rk⁻, mk) supE44, thi⁻¹), ktoré boli kultivované podľa Ausubel a spol.¹⁰. Na klonovanie a expresiu bol použitý plazmid pET-15b (Novagen, USA) s *T7lac* promótorom a *N*-terminálnou His.Tag sekvenciou s následným štiepnym miestom pre trombín. Pre nadexpresiu MDH bol použitý kmeň *E. coli* BL21 (DE3) (F⁻, omp T, hsd_B, (r⁻_B), gal, dcm (DE3)) (Novagen, USA). Bunky *E. coli* obsahujúce plazmid pET-15b rástli na LB médiu s 100 µg ml⁻¹ ampicilínom.

Amplifikácia, klonovanie a expresia

Gén *mdh* zo *S. coelicolor* bol amplifikovaný reakciou PCR použitím genómovej DNA *S. coelicolor A3(2)* ako templátu, izolovanej podľa protokolu Hopwood a spol.⁹ Na reakciu boli navrhnuté oligonukleotidové primery 5'-ggattccatgatgactgcactcccgtaa-3' a 5'-cgcgatcctcagatgagccgagaccgcg-3'. Primery boli navrhnuté tak, aby obsahovali restriktčné miesta NdeI a BamHI (podčiarknuté) umožňujúce priame klonovanie PCR produktu do príslušného miesta nachádzajúcom sa na plazmide pET-15b (Novagen). Rekombinantným plazmidom pET-15b-*mdh* boli transformované bunky *E. coli* BL21(DE3). Tento kmeň, použitý na nadproduckiu MDH bol označený *E. coli* IB831. Kultúra buniek narastená do OD₆₀₀ 0,5–0,7 bola indukovaná IPTG (izopropyl-β-tiogalaktosid) do výslednej koncentrácie 1mM. Indukcia trvala 3 hodiny pri teplote 37 °C. Bunky boli usadené centrifugáciou a pelety uskladnené pri teplote –20 °C.

Purifikácia rekombinantnej malátdehydrogenázy a odštiepenie His.Tag sekvencie

Pelety buniek *E. coli* IB831 boli rozsuspendované v roztoku obsahujúcom 100 mM Tris-HCl pH 8,0 a 2 mM EDTA a sonikované použitím Soniprep 150 (MSE, Crawley, UK). Cytoplazmatickú frakciu s nadproduckovanou MDH sme získali po ultracentrifugácii pri 39 000 g použi-

tím ultracentrifúgy Beckman L8-50M/E (Beckman PA, CA, USA). Supernatanty boli aplikované na špecifické chelatačné kolóny His.Bind Resin (Novagen, USA). Po vyplavení nešpecifických proteínov a zvyšovaním koncentrácie imidazolu v rozmedzí od 100 do 400 mM boli postupne eluované rekombinantné bielkoviny. Všetky frakcie boli analyzované na 12% SDS-PAGE géloch a farbené Coomassie Brilliant Blue R-250 (cit.¹¹) alebo striebrom¹². His.Tag sekvencia rekombinantnej MDH bola odštiepená biotinylovaným trombínom (Novagen) pri teplote 20 °C (1 ml reakčnej zmesi obsahoval 800 µg rekombinantného proteínu a 1U biotinylovaného trombínu v tlmivom roztoku). Biotinylovaný trombín bol odstránený streptavidín agarózou a MDH bez His.Tag sekvencie bola izolovaná opäť použitím kolóny His.Bind Resin (Novagen). Takto sme pripravili vzorku MDH s koncentráciou 8 mg ml⁻¹, ktorú sme predialyzovali do kryštalizačného roztoku zloženého z 10 mM Tris-HCl pH 7,5 a 1 mM DTT.

Purifikácia MDH z kmeňa *S. coelicolor* A3(2)

Všetky manipulácie boli vykonávané pri teplote 4 °C. Celkovo 70 g buniek *S. coelicolor* A3 (2) bolo rozsuspenzovaných v 100 ml tlmivého roztoku A obsahujúcom: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 50 mM 2-merkaptóetanol, 0,05 mM PMSF, disruptovaných použitím Soniprep 150 (MSE, Crawley, UK). Zvyšky buniek z homogenátu boli odstránené centrifugáciou 10 min pri 2000 g a supernatant bol centrifugovaný 15 min pri 10 000 g. Nukleové kyseliny boli precipitované z hrubého extraktu pomalým pridávaním čerstvo pripraveným 20% (w/v) streptomycín sulfátom do celkovej koncentrácie 0,75 % (w/v). Po 1 hodinovom zrážaní bola zrazenina odstránená 20 min centrifugáciou pri 10 000 g. Všetky nasledujúce centrifugácie boli prevedené rovnako. Pevný síran amónny bol pridaný k supernatantu do 30% nasýtenia. Po 30 minútovom zrážaní sa zrazenina odstránila centrifugáciou a ďalší síran amónny bol pridaný do 80% (w/v) nasýtenia. Po 30 minútovom zrážaní boli proteíny usadené centrifugáciou. Pellet, ktorý obsahoval MDH, bol rozsuspenzovaný v tlmivom roztoku B obsahujúcom: 20 mM fosfátový tlmivý roztok pH 7,0; 1 mM EDTA; 50 mM 2-merkaptóetanol a dialyzovaný cez noc oproti 2 l tohto roztoku. Vzorka po dialýze bola nanosená na kolónu DE-AE celulózy DE-52 (Whatman, 2×20 cm) ekvilibrovanú tlmivým roztokom B. Proteíny boli eluované 150 ml gradientom 20–500 mM fosfátovým tlmivým roztokom B. Aktívne frakcie boli zbierané a dialyzované cez noc oproti 1 l tlmivého roztoku C obsahujúcom 10 mM fosfátový tlmivý roztok pH 6,8 a 25% síran amónny. Frakcie s aktivitou pre MDH boli nanosené na kolónu Phenyl Sepharose CL 4B (Pharmacia, 0,7×17 cm) ekvilibrovanú tlmivým roztokom C. Proteíny boli eluované 50 ml lineárnym gradientom s obsahom 0–50 % etylénglykolu v tlmivom roztoku C. Aktívne frakcie boli dialyzované cez noc oproti 250 ml tlmivého roztoku D (20 mM fosfát sodný pH 7,2). Dialyzovaný extrakt bol nanosený na kolónu Matrex Red

A (Sigma, 0,7×15 cm) ekvilibrovanú tlmivým roztokom D. Všetky frakcie boli analyzované 12% SDS-PAGE elektroforézou a farbené Coomassie Brilliant Blue R-250 (cit.¹¹) alebo striebrom¹². Spojené aktívne frakcie boli zakonzentrované do kryštalizačného tlmivého roztoku (10 mM Tris-HCl pH 7,5 a 1 mM DTT) na koncentráciu 8 mg ml⁻¹.

Stanovenie aktivity malátdehydrogenázy

Jednotka aktivity malátdehydrogenázy zodpovedá oxidácii 1 µmol NAD(P)H za minútu meraním v 1ml kvete obsahujúcej reakčnú zmes: 100 mM Tris-HCl tlmivý roztok pH 8,0, 765 µM kyselina oxaloctová, 230 µM NADH alebo 200 µM NADPH a príslušné množstvo MDH. Oxidácia NAD(P)H bola sledovaná pri 30 °C na spektrofotometri HITACHI U-2001.

Kryštalizácia

Kryštály oboch malátdehydrogenáz boli získané kryštalizáciou vo visiacej kvapke pri 19 °C. Na kryštalizáciu boli použité dva komerčne dostupné skriningové sety (Hampton Research Screen 1, Hampton Research screen 2) a laboratórne pripravené kryštalizačné zmesi.

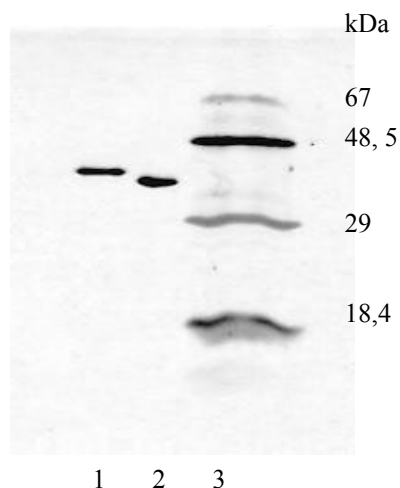
Výsledky a závery

Z rekombinantného kmeňa *E. coli* IB831 bola izolovaná MDH *S. coelicolor* A3(2). Izolovaná rekombinantná MDH so sekvenciou His.Tag bola použitá na predbežný kryštalizačný skrining v dvoch komerčne dostupných setoch. Vo visiacej kvapke nenarástli žiadne kryštály na rozdiel od natívneho proteínu, čoho príčinou mohla byť His.Tag sekvencia na proteíne. Preto sme sa rozhodli túto sekvenciu z MDH odstrániť biotinylovaným trombínom (obr. 1) a zopakovať kryštalizačný skrining. Účinnosť purifikácie je znázornená v tab. I.

Ihličkovité kryštály narástli vo visiacej kvapke bez koenzýmu v roztoku obsahujúcom 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,6; 0,2 M octan amónny; 80 µM kyseliny oxaloctová a 27% (w/v) PEG 4000 (obr. 2A), štvorcové kryštály narástli vo visiacej kvapke v roztoku obsahujúcom 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,4; 0,2 M octan amónny, 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH (obr. 2B) a v roztoku obsahujúcom 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny, 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH (obr. 2C). Rôznorodé kryštály vznikli v troch roztokoch: 1) v 0,1 M Na-citrátovom tlmivom roztoku pH 6,0; 0,2 M octane amónnom; 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADPH, 2) 0,1 M Na-citrátovom tlmivom roztoku pH 6,0; 0,2 M octane amónnom; 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH a 3) 0,1 M Na-citrátovom tlmivom roztoku pH 6,0; 0,2 M octane amónnom; 23% (w/v) PEG 4000 bez koenzýmu (obr. 2D–F).

Tabuľka I
Purifikácia rekombinantnej MDH *S.coelicolor* A3(2) bez His.tag sekvencie

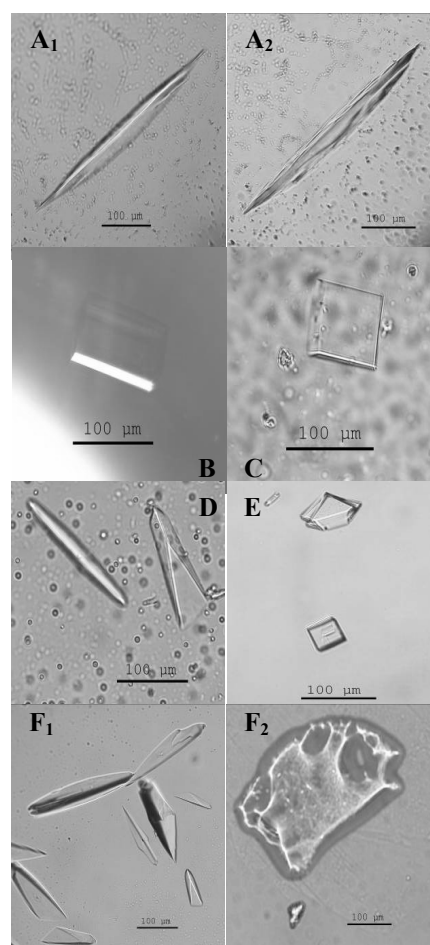
Frakcia	Objem [ml]	Proteíny celkovo [mg]	Celková aktivita [U]	Špecifická aktivita [U mg ⁻¹]	Výtťažok [%]	Purifikačný faktor
Bunkový extrakt	11.5	27.6	4335	157	100	1
MDH bez His.Tag sekvencie	14	2.5	2465	986	57	6.3



Obr. 1. Purifikácia rekombinantnej MDH *S.coelicolor* A3(2) bez His.tag sekvencie. SDS-PAGE (12 % w/v). Dráha č. 1: rekombinantná MDH po izolácii na kolóne His.Bind Resin, dráha č. 2: rekombinantná MDH po odstránení His.Tag sekvencie, dráha č. 3: proteínové štandardy: hovädzi sérum albumín (M_r 67 000), fumaráza (M_r 48 500), anhydráza kyseliny uhličitej (M_r 29 000), β -laktoglobulín (M_r 18 400)

Ihličkovité kryštály starli (obr. 2A₁, A₂), boli nestabilné a dochádzalo k ich rozpúšťaniu a postupnej degradácii (obr. 2F₂). Preto sme sa rozhodli izolovať a kryštalizovať MDH z natívneho kmeňa *S. coelicolor* A3(2). Účinnosť purifikácie je znázornená v tab. II. V porovnaní s izoláciou MDH z nadprodukčných kmeňov je izolácia z pôvodného kmeňa použitím streptomycínsulfátového zrážania menej efektívna, ale ionomeničová chromatografia na DEAE celulóze DE-52 a hydrofóbne interakcie na kolóne Phenyl Sepharózy CL4B zvyšujú purifikačný faktor. Homogénna MDH bola získaná po afinitnej chromatografii na Red 120 agaróze (obr. 3) a použitá na kryštalizačný skríning.

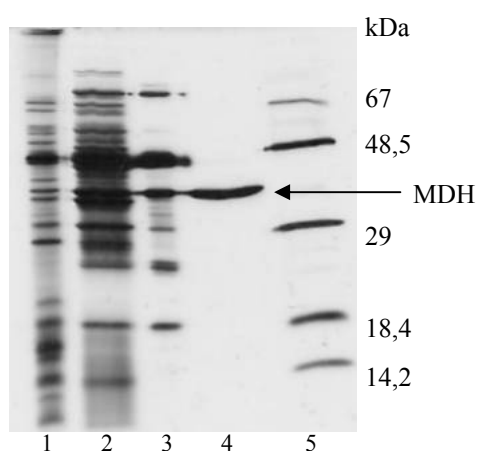
Stanovili sme optimálne podmienky pre kryštalizáciu natívnej MDH zo *S. coelicolor* A3(2). Ihličkovité kryštály narástli vo visiacej kvapke obsahujúcej 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 4,8; 0,2 M octan amónny; 27% (w/v) PEG 4000 a s/bez 100 μ M kyseliny oxaloctovej (obr. 4). Ako vidieť z obr. 5, zvyšovanie pH tlmivého roztoku spôsobuje zmenu tvaru kryštálov (0,1 M Na-



Obr. 2. Kryštály rekombinantnej MDH bez His.Tag sekvencie narastené vo visiacej kvapke; A 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,6; 0,2 M octan amónny; 80 μ M kyselina oxaloctová; 27% (w/v) PEG 4000; A₁ dvojdňové kryštály; A₂ osemdňové kryštály; B 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,4; 0,2 M octan amónny; 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH; C 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny; 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH; D 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny; 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADPH; E 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,4; 0,2 M octan amónny; 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH; F 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny; 23% (w/v) PEG 4000; F₁ pred otvorením kvapky; F₂ po otvorení kvapky

Tabuľka II
Purifikácia MDH z kmeňa *S.coelicolor A3(2)*

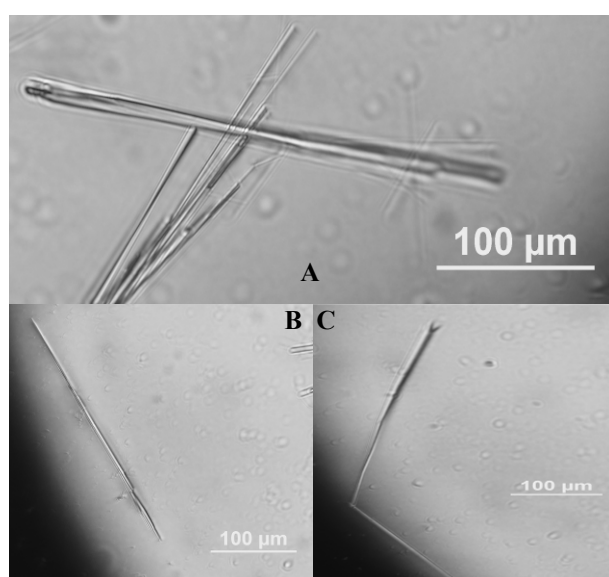
Frakcia	Objem [ml]	Celkové proteíny [mg]	Celková aktivita [U]	Špecifická aktivita [U mg^{-1}]	Výtťažok [%]	Purifikačný faktor
Homogenát	225	448	10 573	24	100	1
30–80 % (w/v) frakcionácia síranom amónnym	39,5	222	8887,5	40	84	1,6
DEAE celulóza DE-52	63	70	4764	68	45	2,8
Phenyl Sepharóza CL 4B	25	20	4315	216	41	9
Matrex Red A	14	2,5	2529	1012	24	42



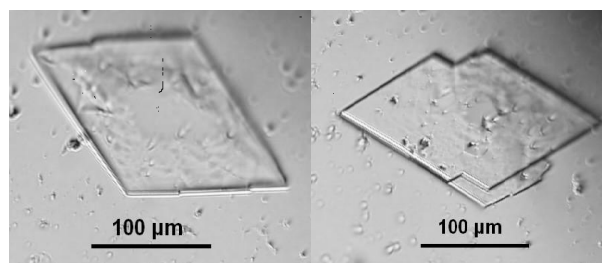
Obr. 3. Purifikácia MDH z kmeňa *S.coelicolor A3(2)*. SDS-PAGE (12 % w/v). Dráha č. 1: spojené frakcie po chromatografii na DEAE celulózy, dráha č. 2: spojené frakcie po chromatografii na Phenyl Sepharóze, dráha č. 3: spojené frakcie po chromatografii na kolóne Matrex Red A, dráha č. 4: proteínové štandardy: hovädzi sérum albumín (M_r 67 000), fumaráza (M_r 48 500), anhydráza kyseliny uhličitej (M_r 29 000), β -laktoglobulín (M_r 18 400) a α -laktalbumín (M_r 14 200)

citrátový tlmivý roztok pH 5,6; 0,2 M octan amónny; 27% PEG 4000 s koenzýmom NADH). Kryštály natívnej MDH izolovanej z kmeňa *S. coelicolor A3(2)* boli stabilné a nedochádzalo k ich rozpúšťaniu a postupnej degradácii v porovnaní s kryštálmi rekombinantnej MDH bez His.Tag sekvencie a budú vhodnejšie pre následné experimenty.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu "BIOMAKRO1 ITMS:26240120003", "BIOMAKRO2 ITMS:26240120027", na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantu VEGA 1/0371/09."



Obr. 4. Kryštály MDH z kmeňa *S.coelicolor A3(2)* vo visiacej kvapke; A, B 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 4,8, 0,2 M octan amónny, 27% (w/v) PEG 4000; C 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 4,8, 0,2 M octan amónny, 100 μM kyselina oxaloctová, 27% (w/v) PEG 4000



Obr. 5. Kryštály MDH z kmeňa *S.coelicolor A3(2)* vo visiacej kvapke; podmienka: 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,6, 0,2 M octan amónny, 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH

LITERATÚRA

1. Wynne S. A., Nicholls D. J., Scawen M. D., Sundaram T. K.: *Biochem. J.* 317, 235 (1996).
2. Genda T., Nakamatsu T., Ozaki H.: *J. Bioscience and Bioeng.* 95, 562 (2003).
3. Mikulášová D., Kollárová M., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J.-P., Kutejová E., Mernik N., Együdová I., Musrati R., Horecká T.: *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 299 (1998).
4. Tomita T., Fushinobu S., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 613 (2005).
5. Honka E., Fabry S., Niermann T., Palm P., Hensel R.: *Eur. J. Biochem.* 188, 623 (1990).
6. Lee B. I., Chang Ch., Cho S.-J., Eom S. H., Kim K. K., Yu Y. G., Suh S. W.: *J. Mol. Biol.* 307, 1351 (2001).
7. Ruelland E., Miginiac-Maslow M.: *Trends Plant Sci.* 4, 136 (1999).
8. Muslin E. H., Li D., Stevens F. J., Donnelly M., Schiffer M., Anderson L. E.: *Biophys. J.* 68, 2218 (1995).
9. Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M., Schrepf H.: *Genetic manipulation of Streptomyces – A laboratory manual*. John Innes Institute Norwich, 1985.
10. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. O., Seidmann J. S., Smith J. A., Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York 1987.
11. Laemli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
12. Blum H., Beier H., Gross H. J.: *Electrophoresis* 8, 93 (1987).
13. Issakidis E., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J.-P., Crétin C., Gadal P.: *J. Biol. Chem.* 267, 21577 (1992).

D. Mikulášová, M. Koháryová, P. Štefanková, and M. Kollárová (*Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Characterization, Properties and Crystallization of Malate Dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor***

Malate dehydrogenase (MDH) isolated from *Streptomyces coelicolor*, A3(2) strain, electrophoretically homogenous, was crystallized in the absence or in the presence of NADH or NADPH coenzymes by the hanging-drop vapor-diffusion method. For simple isolation in a sufficient yield, the above MDH was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Recombinant MDH with His-tag sequence did not crystallize whereas that without His-tag sequence crystallized using the above method. The crystals were grown in a mixture of 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.6), 0.2 M ammonium acetate, 27% (w/v) poly(ethylene glycol) 4000, and 5 mM NADH coenzyme or in a mixture of 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.8), 0.2 M ammonium acetate, 100 μ M oxaloacetic acid, and 27% (w/v) poly(ethylene glycol) 4000.

ZNÍŽENIE EMISÍ PRI SPAĽOVANÍ BIOMASY V TEPL VodNOM KOTLY

JANA MULLEROVÁ^a, SERGEJ HLOCH^b
a JAN VALÍČEK^c

^aŽilinská univerzita, Žilina, ^bFakulta výrobných technológií TU v Košiciach so sídlom v Prešove, Bayerova 1, 080 01 Prešov, ^cInstitut fyziky, Hornickogeologická fakulta, ul. 17 listopadu, VŠB-TU Ostrava Poruba
sergej.hloch@tuke.sk

Došlo 26.1.09, prepracované 16.2.09, prijaté 24.6.09.

Kľúčová slová: teplovodný kotol, biomasa, spaľovanie, emisie

Úvod

Využitie biomasy ako paliva pre priame spaľovanie je do značnej miery určené jej chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami. Biomasa vykazuje najmä široké rozpätie obsahu vody. Vysoký obsah vody v palive pritom pri procese spaľovania predstavuje väčšie nároky na spotrebu energie, ktorá je potrebná na odparovanie vody. Vyššia vlhkosť biopalív nepriaznivo vplyva i na tvorbu klenby v zásobníkoch paliva, na objem spalín a množstvo vodnej pary v spalinách, na nárast teploty rosného bodu spalín a na zvýšené nebezpečenstvo vzniku korózie niektorých častí spaľovacieho zariadenia. Toto sa prejavuje i v konštrukcii spaľovacích zariadení.

Prvkové zloženie biomasy sa príliš nelíši. Najväčší podiel v sušine zaujímajú uhlík, vodík a kyslík. Na rozdiel od fosílnych palív obsahuje biomasa približne dvojnásobné množstvo kyslíka (O₂) a menšie množstvo uhlíka (C). Obsah vodíka (H₂) je pri fosílnych palivách a biomase približne rovnaký. Okrem uvedených chemických prvkov biomasa obsahuje i malé množstvo prvkov, ktoré pri spaľovaní ovplyvňujú produkciu škodlivých látok. Sem patrí síra (S), chlór (Cl), a dusík (N₂) (cit.³). Jednotlivé palivá sa odlišujú obsahom látok s vplyvom na produkciu emisií. Napríklad obsah dusíka v suchom dreve predstavuje podiel cca 0,1 až 0,2 %, v suchej slame je dusík obsiahnutý asi 0,5 %. Pritom dusík obsiahnutý v palive sa pri spaľovaní podieľa na tvorbe oxidov dusíka v spalinách. V porovnaní s fosílnymi palivami vykazuje biomasa vo všeobecnosti veľmi nízky obsah síry, čo má vplyv pre vznik absolútne minimálneho množstva oxidu siričitého, ktorý spôsobuje najmä vznik kyslých dažďov a smogových situácií. Chlór, ktorý sa pri spaľovaní podieľa na tvorbe kyseliny chlorovodíkovej (HCl) a dioxínov (PCDD/PCDF), sa objavuje hlavne v slame obilnín a sene, čo je dané hlavne používaním hnojív v poľnohospodárstve^{4,5}. V biomase sa nachádza ešte veľa ďalších, tzv. stopových anorganických prv-

kov, ktoré nepriamo ovplyvňujú spaľovací proces, vznik škodlivých látok, tvorbu nánosov a pod. Medzi ne patrí olovo (Pb), draslík (K), sodík (Na), vápnik (Ca), kremík (Si), mangán (Mn), bór (B), meď (Cu), železo (Fe), nikel (Ni), horčík (Mg), zinok (Zn) atď.

Rovnako ako pri spaľovaní fosílnych palív, i pri spaľovaní biomasy sa do ovzdušia uvoľňujú produkty horenia – emisie. Ich množstvo a zloženie závisí najmä od vlastností paliva a podmienok spaľovania. Spaliny zo spaľovania biomasy pozostávajú z produktov horenia, tzn. oxidu uhličitého a vodnej pary, zo zložiek nespáleného vzduchu (dusíka, kyslíka) a emisií. Priemerná produkcia popola pri spaľovaní drevenej biomasy predstavuje cca 0,4 až 0,7 % popola z hmotnosti spaľovaného dreva a cca 1,5 až 3 % popola z hmotnosti spálenej kôry. Pri spálení drevenej hmoty o objeme 1 m³ tak vznikne 3 až 5 kg popola^{1,2}. Popoloviny v kúrenisku sa pri teplotách pod hodnotou 1 100 °C nespekajú a popol vo forme sypkej hmoty môže byť použitý ako prírodné hnojivo, pretože obsahuje oxidy vápnika, draslíka, horčíka a fosforu. Bezpečné spaľovanie biomasy v teplovodných kotloch má veľký vplyv na bezpečnosť a ochranu zdravia osôb⁷.

Teplovodný kotol MA 23

Teplovodný kotol MA 23 patrí medzi splyňovacie kotle na spaľovanie suchého dreva (obr. 1). Je určený predovšetkým pre vykurovanie rodinných domov, chát, kancelárskych budov a malých objektov s požiadavkami na maximálny tepelný výkon 23 kW.

Kotol pracuje na princípe splyňovania paliva. Teplovodný kotol je vyrobený z oceleového plechu. V spodnej časti spaľovacieho priestoru je spaľovacia komora, v ktorej sa nachádza žiarobetonový deflektor. Prívod spaľovacieho vzduchu je realizovaný pomocou radiálneho ventilátora. Okrem toho, že spaľovanie v teplovodných kotloch musí



Obr. 1 Teplovodný kotol MA 23

byť bezpečné, musí byť aj nízkoemisné, pričom minimálny tepelný výkon nesmie byť väčší ako 30 % menovitého tepelného výkonu teplovodného kotla. Pri teplovodných kotloch s ručným dodávaním paliva môže byť minimálna hodnota tepelného výkonu vyššia. Vtedy musí výrobca v technickej dokumentácii určiť, aké množstvo generovaného tepla je potrebné rozptýliť.

Experimentálna procedúra

Predmetom výkonových, emisných a bezpečnostných prevádzkových skúšok bol teplovodný kotol na splyňovanie dreva MA 23 o menovitom tepelnom výkone 23 kW (obr. 1). Kotol je vybavený vlastným elektronickým regulátorom teploty a vymedzovačom bezpečnej teploty. Stav kotla a jeho zariadenia boli odskúšané v súlade s bežne dodávanou technickou dokumentáciou.

Počas skúšok sa experimentálne overoval vplyv podmienok spaľovania paliva na produkciu emisií, odolnosť proti tepelnému preťaženiu kotla a zariadenie pre odvod prebytku tepla, pričom skúšobným palivom bolo smrekové drevo o vlhkosti 20 % a výhrevnosti $15,266 \text{ MJ kg}^{-1}$. Teplota okolitého vzduchu v skúšobnej miestnosti bola medzi $15 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Odťahové hrdlo teplovodného kotla $\varnothing 150 \text{ mm}$ bolo pripojené na merací úsek spalín a spojené s vonkajším prostredím prostredníctvom komína $\varnothing 300 \text{ mm}$ dĺžky 6 m. Pri určení tepelného výkonu, účinnosti kotla, času horenia, zloženia spaľovacieho plynu a teploty vystupujúcich spalín bol kotol počas skúšky prevádzkovaný pri tepelnom výkone v jeho výkonovom rozsahu.

Všetky skúšky teplovodných kotlov sa uskutočnili na Katedre energetickej techniky Strojníckej fakulty ŽU v Žiline, ktorá disponuje zodpovedajúcou skúšobnou miestnosťou a moderným prístrojovým vybavením. Tepelná účinnosť skúšaných teplovodných kotlov bola vyhodnotená na základe priamej metódy. Hmotnostný tok paliva bol meraný digitálnou váhou JANIŠ JVT s rozsahom 0 až 500 kg a odchýlkou 10 g. Prietok vykurovacej vody bol meraný ultrazvukovým prietokomerom Kamstrup DN 25 (300 impulzov na liter) s teplotným rozsahom 0 až $130 \text{ }^\circ\text{C}$ a nominálnym prietokom $5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Skúšanie teplovodných kotlov pozostáva zo skúšky menovitého a minimálneho tepelného výkonu a skúšky bezpečnej prevádzky spaľovacieho zariadenia, ktorou sa overuje odolnosť kotla proti tepelnému preťaženiu. Medzi hodnotiace skúšky ďalej patria skúšky účinnosti, emisií a funkčná skúška na zariadenie pre odvod prebytkového tepla teplovodného kotla. Spaľovanie v kotloch musí byť nízkoemisné, pričom minimálny tepelný výkon nesmie byť väčší ako 30 % menovitého tepelného výkonu.

Skúšaný teplovodný kotol sa uloží na váhu na meria potreby paliva. Hrdlo pre odvod spalín sa pripojí na izolovaný (minerálne vlákno hrúbky 40 mm) merací úsek spalín s odbermi pre meranie teploty spalín (komínová teplota), prevádzkového ťahu (ťah komína), zloženia spalín (oxid uhličitý, kyslík, oxid uhoľnatý, oxid dusnatý a ostatné

NO_x , vzorka na meranie tuhých nečistôt. Konštantný ťah komína je zabezpečený ventilátorom pre odvod spalín, ktorého otáčky sa regulujú frekvenčným meničom. Teplota spalín sa meria snímačom teploty, ktorý je umiestnený vo vnútri sondy pre odsávanie spalín. Táto sonda musí mať tri odberné otvory o priemere $2,5 \pm 0,5 \text{ mm}$, pričom jeden otvor je umiestnený v strede dymovodu. Ostatné dva otvory sa nachádzajú v jednej štvrtine vzdialenosti priemeru dymovodu od bočných stien meracieho úseku spalín. Na meranie statického tlaku sa použije rúrka s vnútorným priemerom 6 mm. Zloženie spalín bolo merané spektrálnym analyzátorom spalín PHOTON, ktorý koncentrácie oxidu uhoľnatého (CO), oxidu uhličitého (CO_2), oxidu dusnatého (NO), oxidu siričitého (SO_2) vyhodnocuje technológiou NDIR (nedisperzívna infračervená metóda) a na vyhodnotenie koncentrácií kyslíka (O_2) a oxidu dusičitého (NO_2) využíva elektrochemický senzor.

Namerané koncentrácie boli prepočítané na normálne stavové podmienky (tlak 1013,25 Pa, teplota 273,15 K) a na referenčný obsah kyslíku (u kotlov spaľujúcich biogénne palivo je to 11 %). Stredná hodnota objemových častí emisií [ppm] sa prepočítala do jednotiek hmotnosti [mg m^{-3}], pričom na prepočet sa použili nasledujúce vzťahy: $P_{\text{CO}} = 1,25 \text{ kg (n)}\text{m}^{-3}$, $P_{\text{NO}_2} = 2,05 \text{ kg (n)}\text{m}^{-3}$. Meranie tuhých látok sa uskutočnilo pomocou aparatury typu Isostack. Isostack Basic je automatický systém na vzorkovanie tuhých emisií z potrubí alebo komínov. Obsah tuhých látok v spalínach bol meraný a vyhodnocoval sa gravimetrickou metódou. Pri tejto metóde sa vychádza z rozdielu hmotnosti zachytávacieho filtra pred a po vzorkovaní.

Meranie emisií na splyňovacom kotly „MA 23“ s ručným dodávaním paliva sa uskutočnilo pri menovitom tepelnom výkone kotla. Analyzátor spalín vyhodnocoval objemové množstvá CO_2 , O_2 , CO, NO a NO_x , pričom oxid uhoľnatý a oxidy dusíka boli prepočítané na teplotu $0 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlak 1013 Pa. Gravimetrickou metódou bol určený obsah tuhých častíc v spalínach. Je potrebné uviesť, že meranie menovitého tepelného výkonu sa z hľadiska vysokej produkcie oxidu uhoľnatého muselo opakovať. Vysoká koncentrácia oxidu uhoľnatého v spalínach bola zapríčinená zlým prívodom spaľovacieho vzduchu do trysky spaľova-

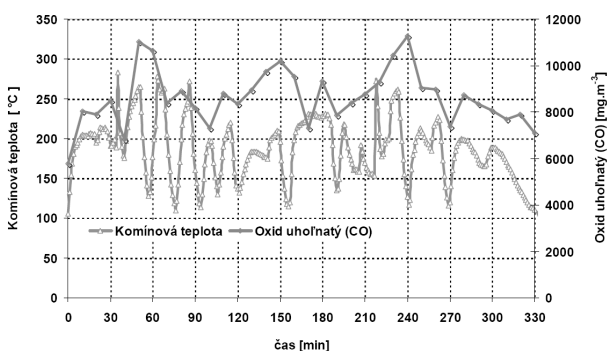


Obr. 2. Pôvodná tvarovka trysky

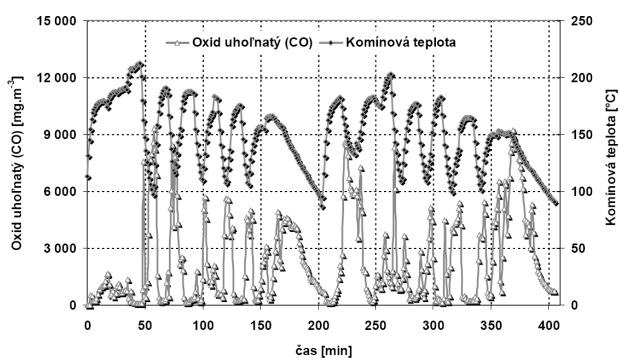
cej komory. Cez otvor prúdilo do trysky nedostatočné množstvo sekundárneho spaľovacieho vzduchu a oxid uhoľnatý v spaľovacej komore nevyhorel a unikal spoločne s ďalšími plynmi v spalinách. Pôvodná tvarovka trysky je uvedená na obr. 2.

Výsledky a diskusia

Záznam nameranej produkcie oxidu uhoľnatého pri prvom meraní menovitého tepelného výkonu splyňovacieho kotla je na obr. 3. Na grafickom zázname možno vidieť, že priemerná hodnota oxidu uhoľnatého (CO) počas dvoch dávok paliva bola takmer 8000 mg m^{-3} . Splyňovací kotol tak musel podstúpiť úpravu prívodu spaľovacieho vzduchu (obr. 4) do sekundárnej zóny spaľovania. V rámci týchto úprav bola navrhnutá aj nová tvarovka trysky (obr. 5) s otvormi pre prívod sekundárneho spaľovacieho vzduchu po dĺžke trysky. Týmto riešením tvarovky trysky sa jednak zvýšilo množstvo privádzaného sekundárneho spaľovacieho vzduchu a zároveň sa dosiahol jeho rovnomerné rozdelenie pozdĺž celej trysky, čo sa odrazilo vo výrazne nižších



Obr. 3. Množstvo oxidu uhoľnatého a komínová teplota počas skúšky menovitého tepelného výkonu teplovodného splyňovacieho kotla pri nedostatočnom množstve sekundárneho spaľovacieho vzduchu



Obr. 4. Množstvo oxidu uhoľnatého a komínová teplota počas skúšky menovitého tepelného výkonu teplovodného splyňovacieho kotla



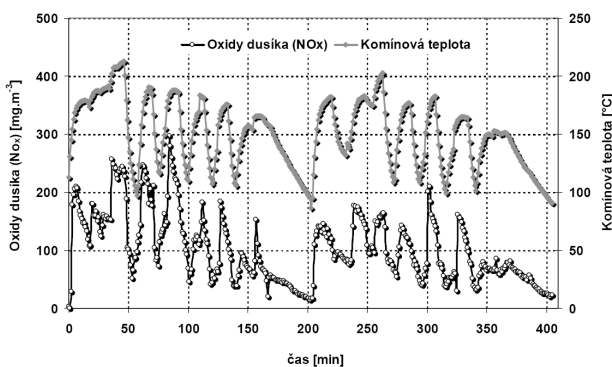
Obr. 5. Nová tvarovka splyňovacieho kotla

nameraných hodnotách oxidu uhoľnatého. Grafický záznam nameraných hodnôt oxidu uhoľnatého v spalinách je uvedený na obr. 4. Priemerná hodnota oxidu uhoľnatého počas dvoch dávok paliva bola 2350 mg m^{-3} .

Na obr. 6 je uvedený grafický záznam nameraného obsahu oxidov dusíka v spalinách. Priemerná hodnota oxidov dusíka pri skúške menovitého tepelného výkonu splyňovacieho kotla bola 102 mg m^{-3} . Priemerná komínová teplota pri menovitom tepelnom výkone bola 150 °C . Podmienka, že komínová teplota nesmie prekročiť izbovú teplotu o 160 °C , bola splnená. Z hodnôt nameraných počas celej doby skúšky menovitého tepelného výkonu splyňovacieho kotla boli vypočítané následné priemerné obsahy: $4,22 \%$ oxidu uhličitého (CO_2), $16,58 \%$ kyslíka (O_2), 70 mg m^{-3} oxidu dusnatého (NO). Meranie obsahu tuhých častíc v spalinách sa začalo na začiatku merania menovitého tepelného výkonu splyňovacieho kotla.

Prvá vzorka bola zo spalin odobraná bezprostredne po rozmiestnení paliva a uzatvorení plniacich dvierok. Priemerný obsah tuhých častíc $141,11 \text{ mg m}^{-3}$ sa určil zo štyroch polhodinových odberov, ktoré sú uvedené v tab. I.

Na teplovodnom kotle typu MA 23 boli uskutočnené merania podľa⁶. Počas skúšok bol meraný hmotnostný tok



Obr. 6. Množstvo oxidov dusíka a komínová teplota počas skúšky menovitého tepelného výkonu teplovodného splyňovacieho kotla po úprave otvorov trysky

Tabuľka I

Tuhé častice zo spalín pri skúške menovitého tepelného výkonu splyňovacieho kotla

Odber vzorky	Objem odobraných spalín za 30 minút [m ³]	Hmotnosť tuhých častíc [mg]	Teplota spalín na prietokomere [°C]	Koncentrácia TZL pri 0°C, 1013 hPa [mg m ⁻³]
1	0,034	4,3	25,3	142,51
2	0,32	4,1	25,8	144,61
3	0,034	4,15	26,3	137,99
4	0,035	4,3	27,2	139,31

paliva a ďalšie parametre potrebné na výpočet výkonu a účinnosti. Skúšky teplovodného kotla na splyňovanie dreva ukázali, že konštrukčné, výkonové a bezpečnostné parametre zodpovedajú norme STN EN 303-5. Počas skúšobných meraní nedošlo k deštrukcii žiadnej časti teplovodného splyňovacieho kotla. Testovaný teplovodný splyňovací kotol je vybavený spoľahlivým mikroprocesorovým regulátorom typu G-403-P02, ktorý zabezpečuje pomerne široký regulačný rozsah kotla v rozmedzí 40 až 100 % menovitého výkonu kotla, ako aj bezpečnostnú reguláciu celého kotla. Bezpečnostná batéria spoľahlivo odvieďa prebytočné teplo z kotla pri odpojení odberu tepla, pričom maximálna teplota dosiahla iba na hodnotu 95,6 °C. Na základe požiadaviek normy EN 303-5 na emisné limity a zo záznamu meraní emisných parametrov pri skúške menovitého a minimálneho tepelného výkonu teplovodného splyňovacieho kotla je možné konštatovať, že spaľovanie v testovanom teplovodnom splyňovacom kotly je nízkoemisné. Nameraná účinnosť teplovodného splyňovacieho kotla pri menovitom tepelnom výkone nie je pre triedu 3 nižšia ako nám hovorí norma (EN 303-5).

Záver

Zmyslom konštrukcie splyňovacích kotlov je čo najúčinnejšie a najdokonalejšie spálenie prchavej zložky (predovšetkým oxidu uhoľnatého) v sekundárnej zóne spaľovania. Nedostatočné množstvo spaľovacieho vzduchu v spaľovacej tryske vedie k vysokej produkcii emisií oxidu uhoľnatého. S oxidom uhoľnatým z kotla odchádza spáliteľná zložka, čím sa jednak znižuje účinnosť spaľovania a účinnosť kotla a taktiež sa zaťažuje ovzdušie jedovatou znečisťujúcou látkou. Emisné skúšky potvrdili, že pri konštrukcii a návrhu tvarovky spaľovacej trysky je potrebné brať do úvahy tento dôležitý faktor. Preto v prvej experimentálnej časti bol analyzovaný vplyv množstva spaľovacieho vzduchu a jeho prerozdelenie do primárnej a sekundárnej spaľovacej zóny na tepelno-technické parametre teplovodných kotlov, pri spaľovaní drevnej biomasy a na produkciu základných znečisťujúcich látok, vznikajúcich v procese horenia. U splyňovacieho teplovodného kotla MA 23 sa porovnávalo viacero konštrukcií tvarovky trysky z hľadiska prívodu spaľovacieho vzduchu hlavne do sekundárnej zóny spaľovania. Na základe novo vyvinutého vlastného riešenia tvarovky a teda aj prívodu vzduchu sme

dosiahli zníženie emisného zaťaženia a zvýšenie výkonu teplovodného kotla MA 23.

LITERATÚRA

1. Domanski M., Dzurenda L., Jablonski M., Osipiuk J.: *Drewno, jako material energetyczny*. 130 s. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2007.
2. Dzurenda L.: *Spaľovanie dreva a kôry*. 124 s. Vydavateľstvo Technickej univerzity vo Zvolene, Zvolene 2005.
3. Hartmann H., Thuncke K., Holdrich A., Rozmann P.: *Handbuch bioenergie - kleinanlagen*, FNR Mit Förderung des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2003.
4. Jandačka J., Malcho M., Mikulík M.: *Ekologické aspekty záměny fosilnych paliv za biomasu*. 228 s. Jozef Bulejčík, Žilina 2008.
5. Ochodek T., Koloničný J., Branc M.: *Ekologické aspekty záměny fosilnych paliv za biomasu*, VŠB TU, Ostrava 2007.
6. Norma STN EN 303-5.
7. Tomek M., Ondírková J., v: *Sborník přednášek VII. Ročník mezinárodní konference Bezpečnost a ochrana zdraví 2007*. s. 305-310. VŠB-TU, Ostrava 2007.

J. Mullerová^a, S. Hloch^b, and J. Valíček^c
^a University of Žilina, Slovak Republic, ^b Department of Technology Systems Operation, Faculty of Manufacturing Technologies of Technical University of Košice with the seat in Prešov, Slovak Republic, ^c Institute of Physics, Mining and Geological Faculty, VŠB-Technical University of Ostrava, Czech Republic): **Reducing Emissions from the Incineration of Biomass in the Boiler**

A method for reducing emission from combustion of biomass in the boiler MA 23 is described. The emissions are affected by the construction of the boiler. The effect is based on the secondary air distribution by application of special system of the secondary air supply system. The resulting effect is based on an even distribution of the secondary air. A special construction of the secondary air feeding is described. The improving effect results in a decrease of the carbon monoxide emissions and the NO_x emissions.

Společnost **ECOM spol. s r.o.**, významný výrobce kapalinových chromatografů, byla založena v říjnu roku 1991. V současné době máme kromě sídla v Praze také pobočku v Ostravě, což je výhodné zejména pro servisní činnost na Moravě.



V sortimentu naší firmy najdete vše od kompletních sestav chromatografických systémů až po laboratorní spotřební zboží jako jsou vialky, septa, víčka, kapiláry a další.

Vyrábíme izokratická vysokotlaká čerpadla s průtokem 10, 50 a 100 ml/min, gradientní čerpadla (nízkotlaký ternární gradient) s průtokem 10 a 50 ml/min, širokou škálu UV VIS detektorů od jednoduchých filtrových až po detektory na principu diode array pro sledování až 4 vlnových délek, dávkovací a přepínací ventily, kolonové termostaty, zařízení pro automatické dávkování a sběr frakcí a další.

Pro preparativní aplikace doporučujeme náš software Ecomac, pro analytické aplikace software Clarity. Oba software umožňují řízení našich chromatografických systémů.

Nepřehlédněte zvýhodněnou nabídku chromatografických sestav, na které je sleva 10% oproti ceně jednotlivých komponentů. Pro **školy a univerzity** nabízíme slevu, která je při koupi dvou sestav 20% a při koupi tří sestav 30%. Nadále platí sleva 5000 Kč při vrácení starých přístrojů. Tímto způsobem lze efektivně inovovat vybavení Vaší laboratoře. V případě zájmu o preparativní či analytický systém vám rádi zašleme cenovou nabídku na sestavu dle vašich požadavků.



Naším cílem je pracovat na vysoké úrovni v oblastech vývoje, výroby a aplikace. Nejde nám jen o to zboží zákazníkům prodat, ale staráme se o odborná zaškolení a následný servis tak, aby byl zákazník spokojen po celou dobu užívání našich přístrojů.

ISO certifikát dle normy **ISO 9001-2000** potvrzuje, že dosahujeme **nejvyšší možné kvality výrobků.**

Všichni naši zaměstnanci jsou informováni o všech procedurách dodržování kvality a jejich změnách tak, aby byli schopni optimálně plnit veškeré požadavky.

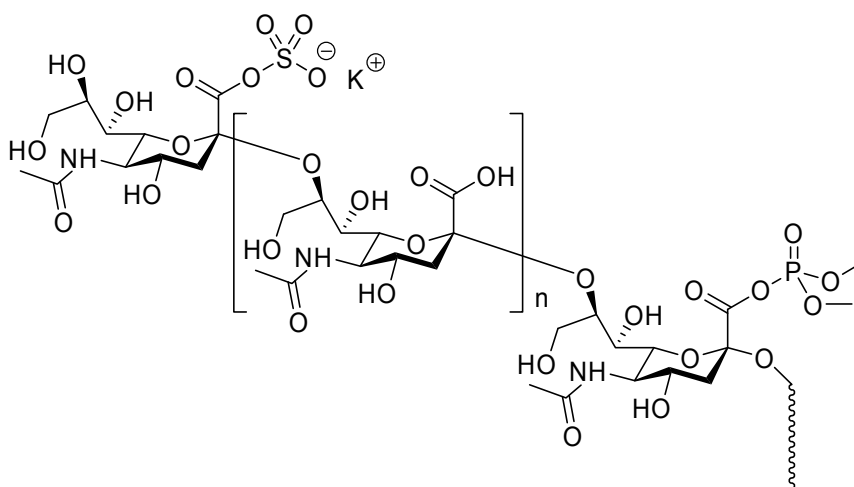
Pro podrobnější informace o firmě a našich produktech prosím neváhejte navštívit naše webové stránky www.ecomso.cz, kde kromě detailních popisů jednotlivých produktů jsou uvedeny i ceny.

V případě jakýchkoliv dotazů nás můžete kontaktovat buď elektronicky na adrese info@ecomso.cz nebo telefonicky na čísle **221 511 310**

Ústav chemie a technologie
sacharidů VŠCHT Praha



Česká společnost chemická



6th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience 2010

29.9.–1.10.2010
Novotného lávka 5, Praha 1

Vážení kolegové,

ve dnech 29.9. – 1.10. 2010 se koná pod patronátem České společnosti chemické a ve spolupráci s Ústavem chemie a technologie sacharidů z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze již šestá mezinárodní konference, která je věnována polysacharidům. Přestože jsou dlouhé řetězce polysacharidů složeny jen z úzkého výběru monosacharidů a na jejich struktuře se podílí jen velmi málo typů vazeb, tvoří pestrou skupinu vysokomolekulárních látek s celou řadou životně důležitých funkcí. Proto také konference s úplným názvem 6th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience zahrnuje řadu tematických celků a budou na ní předneseny zajímavé přednášky a prezentovány postery s širokým vědeckým nebo odborným záběrem.

Konference se zúčastní vědci, odborníci a mladí lidé z řady zemí a vědecký i organizační výbor věří, že všichni prožijí v Praze tři příjemné a zároveň podnětné dny.

Je třeba také zdůraznit, že naše konference je podporována řadou důležitých společností. Velký pocit uspokojení dává organizátorům skutečnost, že konference je jednou z aktivit skupiny Euroglycoforum, jež je součástí mezinárodní instituce European Science Foundation ve Štrasburku. Navíc jsme také uznáni mezinárodní organizací EuCheMS.

Všichni organizátoři konference 6th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience přejí všem účastníkům krásné podzimní dny v Praze a řadu informací a námětů užitečných v jejich práci.

Jana Čopíková a Evžen Šárka
za vědecký výbor konference

Organizátoři konference si dovoluují uvést na tomto čestném místě firmy a instituce, které pomohly tuto akci uskutečnit.



ESF EuroGlycoSciences Forum
Research Network Programme



Škrobárny Pelhřimov a.s.

Amylon®

CHROMSPEC

SPOL. S R.O.

MANEKO

NICOLET CZ

Thermo
SCIENTIFIC

Molecular Spectroscopy



Konference Polysaccharides-Glycoscience zařazená pod číslem 2609 je spolufinancována Evropskou vědeckou nadací (European Science Foundation), jde o aktivitu ESF „The Euroglycoscience Forum“ – Research Network Programme.

ISOLATION AND HIGH-THROUGHPUT SCREENING METHODS OF LEVANSUCRASE MUTANTS OF A PLANT PATHOGEN *Pseudomonas syringae* DC3000

KARIN MARDO, TRIINU VISNAPUU, and TIINA ALAMÄE

*Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, 51010 Tartu, Estonia
talamae@ebc.ee*

We optimized methods for mutagenesis and selection of levansucrase mutants. The gene encoding Lsc3 protein of *Pseudomonas syringae* DC3000 was randomly mutated and clones with changed activity and polymerization properties were selected using solid media-based as well as microplate-format approaches. Several mutations affecting levansucrase function were detected and assigned to protein structure.

AVENUES OF THE CONTEMPORARY GLYCO-SCIENCE: FROM GLYCOMIC TECHNOLOGIES TO DRUGS THAT ARE SWEET INSIDE AS WELL AS AT THE SURFACE

Invited lecture

KAREL BEZOUŠKA^{a,b}

^a *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University Prague, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, Czech Republic;* ^b *Institute of Microbiology v.v.i., Academy of Sciences of Czech Republic, Videnska 1083, 142 20 Praha 4, Czech Republic
bezouska@biomed.cas.cz*

Introduction. Changes in cell surface glycosylation accompanies diseases such as inflammation, rheumatoid arthritis, and malignant transformations. These changes are supposed to be monitored by carbohydrate receptors of lectin type on the surface of cells of the immune system. However, the exact nature of these receptors orchestrating such reactions remains elusive.

Methods. We used a panel of recombinant lectin-like receptors of killer lymphocytes, bioaffinity techniques, oligosaccharide arrays, and mass spectrometry to analyze the complete oligosaccharide profiles responsible for sensitivity of tumor cells for natural killing and apoptosis.

Results. Highly branched *N*-linked oligosaccharides recognized by NKR-P1 and NKG2D receptors were linked to sensitivity to natural killing. On the other hand, clustered *O*-linked oligosaccharides cross-linking CD69 receptors were able to cause the apoptotic death of the activated killer lymphocytes.

Conclusions. We were able to identify classes of surface oligosaccharides responsible for natural killing of tumor cells as well as for the ability of tumors to eliminate

the killer lymphocytes.

Supported by grants from Ministry of Education of Czech Republic (MSM 21620808 and 1M 4635608802), Czech Grant Agency (303/09/0477 and 305/09/H008), and by EU Spine 2 project (contract LSHG-CT-2006-03/220).

THE STUDY OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF YEAST GLYCOPROTEINS

MARTA BRLEJOVÁ, MILAN ČERTÍK, and EVA PETRÁŠIKOVÁ

*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
marta.brlejova@gmail.com*

This work was aimed at monitoring the impact of different culture conditions (heavy metals, light/dark, chemical growth modulators) on the production of cellular glycoproteins biosynthesized by yeast strains *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26, and on change in their composition and antioxidant properties. Generally, addition of growth modulators (biotin, pantothenic acid, hydrogen peroxide, ethanol) did not significantly effect on total amount and properties of glycoproteins. From the view of tested metals, the best antioxidant properties were detected in glycoproteins isolated from cells grown in media supplemented with copper and iron ions. It is noteworthy that cultivation under light induced antioxidant activity of cell glycoproteins detected by ABTS (suitable for proton-donating measurements) while antioxidant properties of cellular glycoproteins analyzed by FRAP method (appropriate for electron donating experiments) were stimulated under multiply shifting light/dark conditions.

The work was supported by grant VEGA No. 1/0747/08 from the Grant Agency of Slovak Ministry of Education.

THE INFLUENCE OF ENZYMATIC HYDROLYSIS ON MOLECULAR MASS OF WATER SOLUBLE ARABINOXYLANS

KRZYSZTOF BUKSA*, HALINA GAMBUŚ, and AGATA CHOWANIEC

*University of Agriculture in Kraków, Food Technology Department, Balicka 122, 30-149 Kraków, Poland
krzysiek_b@onet.eu*

The aim of this research was to study the influence of enzymatic hydrolysis on water soluble arabinoxylans.

Rye grain of variety Amilo was used as a material for

arabinoxylan isolation. Isolation was performed as described previously.

Preparation was modified by xylanase (*Thermomyces lanuginosus* strain) treatment. After hydrolysis molecular properties of both preparation unmodified and hydrolysed were determined by means of SEC analysis and intrinsic viscosity measurements and compared. In order to obtain more detailed information about molecular structure of arabinoxylan magnetic resonance ¹H-NMR was used.

The studies showed that the molecular mass of arabinoxylan dramatically decreased during hydrolysis. Moreover arabinoxylan particles of less than 5×10^4 g/mol, underwent the easiest hydrolysis. Obtained results showed that after enzymatic hydrolysis of arabinoxylan its solubility in water significantly increased.

This study was supported by Ministry of Science and Informatization grant N N312 440837.

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF MODIFIED WATER SOLUBLE PENTOSANS

KRZYSZTOF BUKSA*, ANNA NOWOTNA,
and MARIOLA WIERDAK

*University of Agriculture in Kraków, Food Technology Department, Balicka 122, 30-149 Kraków, Poland
krzysiek_b@onet.eu*

Rye flour contains water soluble fraction which is composed mainly of water soluble arabinoxylans.

The aim of this study was to investigate changes in molecular properties of arabinoxylan preparation after its modification and to compare those properties with unmodified arabinoxylan.

The structure of arabinoxylans was modified by enzymatic hydrolysis and following crosslinking induced by peroxidase – H₂O₂ treatment.

Used modification changed molecular properties of arabinoxylan preparation dramatically. Molecular mass decreased significantly over modification process what was confirmed by SEC analysis and intrinsic viscosity measurements. Moreover modified preparation was better soluble in water what is promising considering application of this preparation in bakery.

This study was supported by Ministry of Science and Informatization grant N N312 440837.

THE INFLUENCE OF OXIDATION ON MOLECULAR MASS OF WATER SOLUBLE ARABINOXYLANS

KRZYSZTOF BUKSA*, ANNA NOWOTNA,
and KAROLINA WRÓŃSKA

*University of Agriculture in Kraków, Food Technology Department, Balicka 122, 30-149 Kraków, Poland
krzysiek_b@onet.eu*

Due to ferulic acid presence in arabinoxylans it is possible to crosslink the molecules what leads to increase in molecular mass and viscosity of water solution of arabinoxylans.

The aim of this research work was to investigate of molecular mass changes caused by cross-linking of water soluble arabinoxylans.

Preparation of water extractable arabinoxylans was isolated from rye whole grain flour as described previously. Basic chemical composition of obtained preparation was determined. Crosslinking was done using peroxidase (*Horseradish*) and H₂O₂ system. Analysis of unmodified and the modified preparation was performed and its molecular properties were compared.

It was concluded, that the isolation procedure which has been applied, allowed to obtain a preparation containing 50,3 % of arabinoxylans. Cross-linked preparation of water-soluble arabinoxylans was characterized by a higher molecular mass, compared to unmodified preparation. The increase in molecular mass of arabinoxylans caused by cross-linking ranged from 20 % (determined by chromatography) to 14 % (identified on the basis of viscosity measurements) for not subjected to modification arabinoxylans.

This study was supported by Ministry of Science and Informatization grant N N312 440837.

ANTITUSSIVE AND BRONCHODILATORY EFFECTS OF *OPILIA* POLYSACCHARIDE

MARTINA ŠUTOVSKÁ^a, SOŇA FRAŇOVÁ^a,
ADRIATOU TOGOLA^b, BERIT S. PAULSEN^c,
and **PETER CAPEK^d**

^a Department of Pharmacology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Sklabinska 26, 037 53, Martin, Slovakia, ^b Département de Médecine Traditionnelle, Institut National de Recherche en Santé Publique, BP 1746, Bamako, Mali, ^c Section of Pharmacognosy, Department Pharmaceutical Chemistry, University of Oslo, P.O. Box 1068, Blindern, N-0316 Oslo, Norway, ^d Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dubravská 9, 845 38 Bratislava, Slovakia
chemcape@savba.sk

A pectin polysaccharide with high arabinose and uronic acid contents has been isolated from the leaves of *Opilia celtidifolia* by boiled water extraction¹. *Opilia* polysaccharide showed significant antitussive and bronchodilatory effects on chemically induced cough reflex and reactivity of airways smooth muscle *in vitro* and *in vivo* conditions in guinea pigs test system. Tests confirmed the dose-dependent cough suppressive effect of *Opilia* polysaccharide comparable with activity of narcotic codeine.

This work was supported by the VEGA Grant Nos. 2/0155/08 and 1/0073/08, and APVV Grant No. 0030/07.

REFERENCE

- Šutovská M., Fraňová S., Prisenžňaková L., Nosáľová G., Togola A., Diallo D., Paulsen B.S., Capek P.: *Int. J. Biol. Macromol.* 44, 236 (2009).

BIODISTRIBUTION OF RADIOLABELED HIGH-MOLECULAR-WEIGHT HYALURONAN AFTER INTRAVENOUS AND ORAL ADMINISTRATION TO RATS

DAGMAR ČOŽÍKOVÁ^{a,b}, MILAN LÁZNÍČEK^b, ALICE LÁZNÍČKOVÁ^b, and VLADIMÍR VELEBNÝ^a

^a *Contipro C a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní Dobrouč, Czech Republic,* ^b *Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralové, Czech Republic*
Cozikova@vcontipro.cz

The clinical use of hyaluronan (HA) in the treatment of joint diseases has led to an increased interest in exogenously administered HA. The current study was designed to compare procedures for labeling HA with radionuclides ¹²⁵I and ¹⁴C, and to determine the difference in the biodistribution pathways of radiolabeled HA in a rat model. The results of animal studies have shown, that orally administered high-molecular-weight hyaluronan is not distributed to connective tissues.

STUDY OF RESISTANT STARCH CONTENT IN PEAS AFTER HARVESTING TREATMENT

RADMILA DOSTÁLOVÁ^a, JIŘÍ HORÁČEK^b, RUDOLF TROJAN^c, and IVANA HASALOVÁ^c

^a *Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk,* ^b *Agritec, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk,* ^c *SEMO a.s., Smržice, Czech Republic*
dostalova@agritec.cz

Peas, garden peas especially (with high amylose content), is very good source of resistant starch (RS). Among selected 20 cultivars, significant differences of resistant starch content in seeds were not found. Content of RS varied between 7,04–7,48 % DM. Changes in resistant starch (RS) content were monitored in different terms of technological harvest in three productive pods. Values after lyophilization and drying (120–140 °C) of seeds differed statistically significantly and fluctuated in the range from 4,39 to 4,08 % in DM.

HYBRID STRUCTURES BASED ON MONTMORILLONITE/MODIFIED STARCH INTERCALATE

PETR DUCHEK^{a*} and MILENA ŠPÍRKOVÁ^b

^a *University of West Bohemia, Faculty of Mechanical Engineering, Univerzitní 20, 306 14 Plzeň;* ^b *Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, Czech Republic*
duchekpe@kmm.zcu.cz

Intercalates based on several commercial cationized starches with degree of substitution $D = 0.04–0.17$, and sodium montmorillonite were prepared. The XRD analyses of resulting organic/inorganic hybrids proved that modification in the starch structure leads to embedding the polycation into montmorillonite clay gallery. Lower degree of starch cationization results in a bigger enlargement of the interlayer space in the hybrid structure.

The authors wish to thank the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (project TIP No. FR - TII/566) and the Academy of Sciences of the Czech Republic (project No. IAX08240901) for financial support.

CHARACTERISATION OF WHEAT VARIETIES FOR PURPOSES OF BREAD-MAKING UTILISATION

LENKA DUCHOŇOVÁ, RENÁTA KOZÁKOVÁ, and ERNEST ŠTURDÍK

Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
lenuska.duchonova@gmail.com

The work was focused to determine the content of wheat grain components in different varieties, which are of dominant significance as regards nutritional and technological quality. Besides proteins, as well as gluten, we aimed to determine the content of the total starch, resistant

starch, amylose, amylopectin, and dietary fibre, which are the components with healthful properties. Part of work is devoted to sensory evaluation of the organoleptic characteristics of bread bake from selected species of wheat.

The obtained results suggest that the genotypes of Hybred and Torysa are particularly suitable for the production of bread-making product.

VARIABILITY OF NON-STARCH POLYSACCHARIDE CONTENT IN GRAIN OF SPRING BARLEY

EVA KLÍMOVÁ^a, PAVEL MACHÁŇ^a, JAROSLAVA EHRENBARGEROVÁ^a, SYLVIE BĚLÁKOVÁ^b, and KATEŘINA VACULOVÁ^c

^a Mendel University in Brno, Czech Republic, ^b Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Malting Institute Brno, Czech Republic, ^c Agricultural Research Institute, Kromeriz, Ltd, Czech Republic
ehren@mendelu.cz

This work deals with the determination of non-starch polysaccharides content and evaluation of the variability in selected lines and varieties of spring barley produced in the years 2007 and 2008 on the school farm Žabčice. The assay set contained hulled malting varieties Amulet, Bojos, Tolar, Sebastian, Prestige, Jersey, Malz, hull-less lines KM 2084, KM 2283, KM 1057 and non-malting hull-less variety AF Lucius (CZ) and Merlin (Canada). Grain samples evaluation was based on the content of two major non-starch compounds: beta-glucans and arabinoxylans. For determination of beta-glucan content FIA (Flow Injection Analysis) method was used, for determination of arabinoxylans was used method by Douglas.

Highest content of beta-glucan was determined in the Merlin variety (6.08 %), the lowest content was determined in the Bojos variety (3.31 %), what proves this variety suitable for production of the Czech Beer, which requires low amount of beta-glucan in the malt. The Merlin variety due to its higher beta-glucan content could be recommended for production of food with higher content of dietary fiber. The KM 1057 line contained the highest amount of arabinoxylans (5.46 %) in the assay set, the lowest amount was found in the AF Lucius variety (3.67 %) and in the Merlin variety (3.66 %).

Statistically significant differences in the arabinoxylan and beta-glucan content were between the varieties and lines found, therefore by choosing the right variety/line could be achieved desired amount of certain non-starch polysaccharides for different purposes of processing.

The study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Project CR No. 1M0570.

ADDITION OF DIETARY FIBRE, RESISTANT STARCH AND β -D-GLUCAN TO WHEAT FLOUR AND THEIR EFFECT ON TECHNOLOGICAL QUALITY, BAKING PROPERTIES OF WHEAT DOUGHS AND BREAD QUALITY

SOŇA GAVURNÍKOVÁ*, MICHAELA HAVRLENTOVÁ, ALŽBETA ŽOFAJOVÁ, MAGDALÉNA BIELIKOVÁ, and JOZEF GUBIŠ

*Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic
gavurnikova@vurv.sk*

The aim of our experimental work was to evaluate the effect of dietary fibre (oat – HF 401, apple – AFE 400), resistant starch (Hi-maizeTM 260, Hylon[®] VII) and β -D-glucan (BarlivTM barley betafiber) addition (all at the level 5 %) on the technological quality of wheat flour, rheological properties of wheat dough and bread quality including the sensory evaluation. The overall acceptable were breads with oat dietary fibre and both resistant starches addition.

The work was supported by Slovak Research and Development Agency under the contract No. VMSP-P-0047-09 and by the National Project of Research and Development “Biological and functional diversity of plant genetic resources for an increase of adding value of agricultural production” from Ministry of Agriculture, Slovak Republic.

CORN STARCH AS A PORE-FORMING AGENT AND MICROSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF POROUS CERAMICS BY IMAGE ANALYSIS

EVA GREGOROVÁ*, MICHAELA CHMELÍČKOVÁ, and WILLI PABST

*Institute of Chemical Technology, Prague, Department of Glass and Ceramics, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
Eva.Gregorova@vscht.cz*

Corn starch is used for producing porous oxide ceramics (composite ceramics from the alumina-zirconia system) by traditional slip casting and starch consolidation casting. In these processes starch acts as a pore-forming agent that burns out during firing. Image analysis is performed on starch-based porous microstructures using different techniques, and the differences are compared with respect to porosity, pore size and pore shape.

EFFECT OF MINERAL NUTRITION ON THE CONTENT OF β -D-GLUCAN IN OAT GRAIN**ANDREA HLINKOVÁ^{a,b,*}, MICHAELA HAVRLETOVÁ^a, DANIELA DVONČOVÁ^a, and ALŽBETA ŽOFAJOVÁ^a**^a Plant Production Research Centre Piešťany, Bratislavská cesta 122, SK-921 68 Piešťany, Slovak Republic;^b University of SS. Cyril and Methodius in Trnava, Faculty of Natural Sciences, Department of Biotechnologies, Námestie J. Herdu 2, SK-917 01 Trnava, Slovak Republic
hlinkova@yurv.sk

We evaluated the influence of year and various nitrogen and selenium amounts, respectively on β -D-glucan content in oat seeding. Our results showed the considerable influence of year on β -D-glucan content. Nitrogen with selenium variants increased β -D-glucan content only in two consecutive years. We found out significant interactions year x genotype and year x nutrition x genotyp.

The work was supported by the National Project of Research and Development "Biological and functional diversity of plant genetic resources for an increase of adding value of agricultural production" from Ministry of Agriculture, Slovak Republic.

MALTING QUALITY AND GRAIN YIELD OF SPRING BARLEY GENOTYPES**MICHAELA HAVRLETOVÁ^{a,*}, KLÁRA KRIŽANOVÁ^b, ALŽBETA ŽOFAJOVÁ^a, and JOZEF GUBIŠ^a**^a Plant Production Research Centre Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic,^b HORDEUM Ltd, Nový Dvôr 1052, 925 21 Sládkovičovo, Slovak Republic
havrlentova@yurv.sk

With the aim to evaluate grain yield and malting quality of 17 newly bred spring barley genotypes, field experiments were established in 2 different localities in SR in 2009. Significant effects of genotype, locality and their interaction were found in all traits (grain yield, protein, extract, β -D-glucan, and starch contents). The highest variability was found in β -D-glucan. The genotypes with high grain yield and good malting quality were detected.

The work was supported by Slovak Research and Development Agency under the contract No. VMSP-P-0047-09.

 β -GLUCAN FILMS SUBJECTED TO LOADING/ UNLOADING TESTS IN TWO CYCLES**ANNA HEJLOVÁ and JIŘÍ BLAHOVEC**Czech University of Life Sciences, 165 21 Praha 6, Czech Republic
hejlova@tf.czu.cz

$\beta(1-3),(1-6)$ -D-glucan films of microbial origin conditioned at different temperature and humidity levels were subjected to loading/unloading tensile tests. The tests were performed on an INSTRON testing machine (R33 4464) by constant rate 1mm/min and controlled by strain level. Mechanical parameters Young's modulus of elasticity, stress level, degree of elasticity, hysteresis losses and inelastic deformation obtained in two successive cycles were compared.

The paper was supported by the Grant Agency of Czech Republic project No. 525/09/1133.

AN ACCURATE DETERMINATION OF HYALURONAN MOLAR MASS AND POLYDISPERSITY**MARTINA HERMANNOVA*, TEREZA EHLOVA, VERONIKA LEIEROVA, LUCIE TROJTLEROVA, and VLADIMIR VELEBNY**Contipro C a.s., Dolní Dobruška 401, 561 02 Dolní Dobruška, Czech Republic
hermannova@contipro.cz

Physical and chemical properties of hyaluronan are closely related to the molar mass and its distribution. Multi-angle light scattering coupled to size-exclusion chromatography (SEC-MALS) requires knowledge of the specific refractive index increment (dn/dc) which has been evaluated under the same conditions as SEC-MALS sample analysis because only in this way very low deviations in Mw determinations are guaranteed. In addition, various SEC column systems have been investigated for hyaluronan separation to achieve an accurate determination of the biopolymer polydispersity.

ANALYSIS AND FRACTIONATION OF WHEAT GROATS FOR FERMENTATIVE ETHANOL PRODUCTION**KATARÍNA TOMŠÍKOVÁ, VIERA HORVÁTHOVÁ*, VLADIMÍR ONDÁŠ, ERNEST ŠTURDÍK**University of SS. Cyril and Methodius, Faculty of Natural Sciences, Department of Biotechnologies, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovak Republic
viera.horvathova@ucm.sk

Analysis and fractionation of 5 wheat cultivars were carried out in order to seek possibilities of making bioethanol production more efficient. In all experiments was also studied the impact of the amylose content. We found that the lowered amylose content in tested starches leads to their deeper hydrolysis and higher ethanol yield. The highest ethanol yield was obtained by the simultaneous saccharification and fermentation of non-fractionated wheat groats.

We gratefully acknowledge Slovak Research and Development Agency for supporting within the Project APVV LPP-0251-07.

FORMATION AND ISOLATION OF ACCIDENTAL DEGRADATION PRODUCTS OF HYALURONAN ACID HYDROLYSIS

JAROSLAV HRABICA*, **PETR KUSÝ**, **DANIELA ŠMEJKALOVÁ**, and **VLADIMÍR VELEBNÝ**

*Contipro C, a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní Dobrouč, Czech Republic
Hrabica@contipro.cz*

Several degradation fragments are formed during the acid hydrolysis of hyaluronan, which are not demanded in applications of low molecular weight hyaluronan. The current study was designed to compare some of the chromatographic techniques for the separation and isolation of these fragments, and also to develop simple procedure for removing of undesirable compounds from the final products. In addition, main four HPLC fractions were isolated in order to achieve the cytotoxicity testing, LC-MS characterization and ¹H NMR study.

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF POLYSACCHARIDES FROM THE SPELT GRAIN

ZDENKA HROMÁDKOVÁ*^a, **ANNA EBRINGEROVÁ**^a, **JÁN HIRSCH**, and **NADEŽDA VRCHOTOVÁ**^b

*^a Slovak Academy of Science, Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia, ^b Institute of Systems Biology and Ecology AS CR, v.v.i. Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic
chemhrom@savba.sk*

The scope of this work was to isolate and characterize the non-cellulosic components of secondary plant sources (bran, chaff) of the spelt (*Triticum spelta* L.) and evaluate the sequential extractions with respect to the yield, chemical composition and antioxidant activity of the obtained polysaccharide fractions isolated from the bran in comparison to those isolated from the chaff.

This work was financially supported by the EEA grant No. SAV-FM-EHP-2008-03-05, the Slovak Grant Agency VEGA, grant No. 2/0062/09 and COST FP0901.

COMMERCIAL WHEAT ROLLS QUALITY MONITORING

IVAN ŠVEC, **MARIE HRUŠKOVÁ**, and **JANA DVOŘÁKOVÁ**

*ICT Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic
Ivan.Svec@vscht.cz*

Quality of common wheat rolls bought in food supermarket was monitored in 3-week period. In total, five acquisitions were performed for quality assessment through one and three weeks. Specific volume was measured by the standard rapeseed displacement method, and crumb appearance by image analysis. Measured volumes ranged from 215 to 270 ml/100 g, mean cell area from 1.58 to 4.02 mm² at 7–23 cells/cm². Quality oscillation was higher during 3 weeks as presumed.

WHEAT/RICE COMPOSITE FLOUR FOR BREAD AND BISCUIT

MARIE HRUŠKOVÁ, **IVAN ŠVEC**, and **IVANA JURINOVA**

*ICT Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic
Marie.Hruskova@vscht.cz*

Changes of technological quality of wheat flour were studied in relation to partial replacement by white rice (WR) (0–30 % with step of 5 %). WR lowered water absorption up to 10 %, but multiplied dough stability in dependence on the level added. Probably due to smaller starch particles of WR in comparison to wheat one, amylo-graph maxima increased significantly. Worsen of cakes with WR was found commonly, but at the substitution of 5 % level specific volume increased about ca 10 %.

DEVELOPMENT OF NEW WINTER WHEAT LINES WITH STARCH WITHOUT AMYLOSE BY USE OF PCR-BASED MARKERS

MARTINA HUDCOVICOVÁ, **DANIELA MIKULÍKOVÁ**, **LENKA KLČOVÁ**, **SVETLANA ŠLIKOVÁ**, **VALÉRIA ŠUDYOVÁ***, **DANIEL MIHÁLIK**, and **JÁN KRAIC**

*Plant Production Research Centre Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic
sudyova@vurv.sk*

The aim of our study was to create new Slovak winter wheat lines with high starch content without amylose using PCR-based markers (MAS) in a classic hybridization - incorporation of null waxy alleles (loci *Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*) from two American lines NX04Y2107 and NX03Y2395 (coming from variety Kanto 107 and Bai-Huo) to Slovak wheat Veldava. We obtained 10 full waxy lines (homozygous in all 3 null alleles) from these cross-breeding.

This research was supported from Ministry of Agriculture of the Slovak Republic by project No. 100-004 Agrobiotechnology and molecular diagnostic of economically important crops' diseases.

EXPERIMENTS WITH GROWING *Phellinus* spp.

IVAN JABLONSKÝ

*Czech University of Life Sciences, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, 165 21 Prague 6 – Sichdøl, Czech Republic
i.jablonsky@seznam.cz*

Tens species of *Phellinus* are reported as medicinal mushrooms. Over thousands of years they have been utilized as traditional medicine in East Asia and they represent an essential part of traditional Chinese medicines. Polysaccharides and proteoglycans are most cited medicinal metabolites from *Phellinus* spp. being reported to have antitumor activities.

We cultivated *Phellinus igniarius*, *P. vaninii*, *P. punctatus*, *P. linteus*, *P. alni* and *P. chrysoloma* on beech and spruce sawdust as well as on wheat straw pellets. The substrates were filled into glass jars and lineal growth of mycelia was recorded. *Pleurotus ostreatus* strain 22 was used as a control. Best mycelial growth was observed both on sawdust and straw pellet substrates with *P. igniarius* and *P. vaninii*. The growth of other *Phellinus* spp. mycelia was substantially slower.

In the next experiment we followed primordia formation? and fructification of *Phellinus* species on different mixtures of sterilized, wetted and supplemented sawdust and straw pellet substrates. 2500 g blocks of the substrate colonized with mycelia were put into conditions of optimal temperature and relative humidity. However, no fruit bodies appeared on the blocks. Only a special form of mycelia (mycelial crust) appeared on surface of some blocks.

To compare some kind of chemical treatment as alternative to heat sterilization we cultivated 8 *Phellinus* species on beech logs. One part of the logs was wrapped into plastic bags, sterilized in autoclave and aseptically inoculated with mycelia. Other part of logs was dipped into 1% borax (sodium tetraborate) solution for 24 hours and holes were drilled into the dry logs.. Then the holes were

filled with plug spawn. Both treatments were compared after 11 months of wood colonization. Sterilized wood was much better colonized than the chemically treated one. Only of *Phellinus vaninii*, *P. punctatus* and *P. linteus* developed but only on sterilized wood.

This work was supported by NAZV Agency (Project QH 82173).

RESISTANT STARCH AND ITS HEALTH BENEFITS

Invited lecture

JAY-LIN JANE

*Department of Food Science and Human Nutrition, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA
jjane@iastate.edu*

An overview of resistant starch (RS), including Type 5 starch-lipid complex, will be presented. Recent advances on formation, production, structures, and properties of Types 2 and Type 5 RS will be reported, and effects of starch structures on the enzyme hydrolysis will be discussed. Health benefits of the RS on glycemic and insulin responses of human subjects and reduction in colon-cancer precursor developments of animals will be reported and discussed.

Acknowledgements: Dr. J. Hasjim, Dr. H. Jiang, Mr. Y. Ai, Dr. S. Hendrich, Dr. S.O. Lee, Dr. D. Birt, and Ms. Y. Zhou. Financial supports: Iowa Corn Promotion Board; PSI, ISU; and GIVF.

CHEMOMETRIC EVALUATION OF WHEAT QUALITY FOR BIOFUEL PRODUCTION

JANA JUROVATÁ^{a*}, HANA SÚKOPOVÁ^a, FILIP KRAIC^a, and FRANTIŠEK GAGO^a

*University of Ss. Cyril and Methodius, Faculty of Natural Sciences, Department of Biotechnologies, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovakia
jana.jurovata@gmail.com*

The paper deals with examining the possibilities of selected wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) for the production of fuel ethanol. In the wheat samples, the content of starch, amylose, amylopectin and total protein was determined. From the multivariate data analysis techniques used in this thesis especially the principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), correlation analysis (CCA) were applied.

This research was supported by the Slovak research and development agency in project APVV LPP – 025107.

THERMAL AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF STARCHES OBTAINED FROM POLISH WHEAT VARIETIES

LESŁAW JUSZCZAK^{a*}, MARIUSZ WITCZAK^b, DOROTA GALKOWSKA^a, TERESA FORTUNA^a, and GRAŻYNA JAWORSKA^c

^a Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, ^b Department of Engineering and Machinery for Food Industry, ^c Department of Raw Materials and Fruit and Vegetable Processing, University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl

The aim of the present work was to study the thermal and rheological properties of starches obtained from Polish wheat varieties. The DSC gelatinization temperatures (T_O , T_P , T_E) and enthalpy (ΔH) varied between 52.6–58.7, 61.1–66.7, 66.9–71.3 °C and 6.81–8.58 J g⁻¹, respectively. The intrinsic viscosities were in the range of 163–228 cm³ g⁻¹. All investigated starch pastes behave as a non-Newtonian fluid with tendency to yield stress. The starch gels were characterized by viscoelastic properties with domination of storage modulus (G').

RHEOLOGICAL PROPERTIES OF HIGH-METHOXY PECTIN GELS WITH MODIFIED POTATO STARCH

DOROTA GALKOWSKA, LESŁAW JUSZCZAK, and MAGDA DŁUGOSZ

Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland d.galkowska@ur.krakow.pl

The rheological properties of high-methoxy pectin gels (0.5 wt%) with sucrose (45 wt%) and modified potato starch (acetylated distarch phosphate; 2.5, 3.5, 4.5 wt%) were studied. The flow behaviour and viscoelastic properties of the gels were determined by steady-shear and oscillatory rheometry, respectively. The higher the starch concentration was, the more shear thinning behaviour the system showed. The presence of starch in the system modified also viscoelastic properties of the gels.

LEVAN PRODUCTION BY *Halomonas* sp.

HANDE KAZAK, ÖZLEM ATEŞ*, FARUK KUCUKASIK, KAZİM YALCİN ARGA, and EBRU TOKSOY ÖNER

Department of Bioengineering, Marmara University, Goztepe 34722, Istanbul, Turkey handekazak@marun.edu.tr, ozlem.ates@marmara.edu.tr, kucukasi@gmail.com, kazim.arga@marmara.edu.tr, ebru.toksoy@marmara.edu.tr

As a linear $\beta(2-6)$ -linked fructose polymer, levan is a water soluble, strongly adhesive and film-forming biopolymer with many valuable properties distinguishing it from other polysaccharides. However due to its high cost, levan has only been available in small quantities. Therefore, levan producing microbial systems have great industrial importance. Recently, *Halomonas* sp. has been reported as a high level levan-producer for the first time by our research group. Besides sucrose-based chemical media, high production yields were achieved when various agroindustrial wastes were used as fermentation substrate. Ongoing studies are focused on potential applications of levan as a bioflocculant and emulsifier agent, as an encapsulating agent in controlled drug release and DNA delivery systems, as a functional biofilm coating material. Moreover, by a systems-based approach, a genome-scale metabolic network was reconstructed and the *in silico* model is currently being used to improve the biopolymer yields and to elucidate the mechanism of levan synthesis in *Halomonas* sp.

Financial support for this research is provided by TUBITAK through project 108M193.

ISOLATION, STRUCTURE AND PROPERTIES OF PECTIC POLYSACCHARIDES FROM THE PUMPKIN (*Cucurbita pepo* L. var *Styriaca*) Invited lecture

ZUZANA KOŠŤÁLOVÁ*, ZDENKA HROMÁDKOVÁ, ANNA EBRINGEROVÁ, GABRIELA NOSÁĽOVÁ, and EUBICA PRISENŽŇÁKOVÁ

Slovak Academy of Sciences, Institute of Chemistry, Center for glycomics, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia Zuzana.Kostalova@savba.sk

A variety of extraction methods offered novel information on the extractability and properties of the non-cellulosic polysaccharides of the pumpkin biomass. The fractions were rich in pectic polysaccharides including partially esterified homogalacturonan and highly branched rhamnogalacturonan regions. The fractions were contami-

nated with protein and phenolic components and some of them exhibited antitussive and antioxidant activities.

This work was financially supported by the EEA grant No. SAV-FM-EHP-2008-03-05, the Slovak Grant Agency VEGA, grant No. 2/0062/09 and COST FP0901.

LC-MS CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF COMPOUNDS ORIGINATING IN AN ACID HYALURONAN HYDROLYSIS

PETR KUSÝ*, JAROSLAV HRABICA, DANIELA ŠMEJKALOVÁ, and VLADIMÍR VELEBNÝ

*Contipro C, a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní Dobrouč, Czech Republic
Kusy@contipro.cz*

Tandem mass spectrometry was utilized in identification and structural characterization of undesirable products causing coloration of hyaluronic acid in the course of acid degradation. Main four abundant isolated fractions with molecular weight less than 2 kDa were closely analyzed in order to elucidate elemental compositions. Fragmentation spectra were acquired to design anticipated chemical structures supported by theoretical models, reaction schemes and NMR spectra.

RESISTANT STARCH INTAKE IN CZECH REPUBLIC

DOBROMILA LEITNEROVÁ*, JANA DOSTÁLOVÁ, and ANETA ŠAFARÍKOVÁ

*Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
dobromila.leitnerova@vscht.cz*

The aim of this study was to estimate the intake of the resistant starch (RS) in the Czech population by analysis of RS in a range of typical foods representing the main sources of starch intake. Food consumption data were based on published results of the Czech Statistical Office. From the results, the estimated average intake of RS in Czech population was found to be 4.2 g/day. Main sources of RS were potatoes, legumes and pasta.

This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project No. MSM 6046137305).

DISCRIMINATION OF BARLEY VARIETES BY SPECTROSCOPIC AND STATISTICAL METHODS

EVA LHOTÁKOVÁ^a, FRANTIŠEK KVASNIČKA^b, KATEŘINA VACULOVÁ^c, JANA ČOPIKOVÁ^a, ANDRIY SYNYTSYA^a, and MICHAL VOLDŘICH^b

*^a Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, ^b Department of Food Preservation and Meat Technology, ICT Prague, Czech Republic, ^c Agricultural Research Institute Kroměříž, Ltd., Czech Republic
lhotakoe@vscht.cz*

The presented results confirm that barleys of different genetic origin can be quickly and reliably distinguished by multivariate analysis of vibration spectra of milled barley grains. A group of samples containing small amounts of β -glucan and relatively high amounts of pentosans was separated by FT-IR and FT-NIR combined with PCA and HCA. Using PLC algorithm calibration models were prepared for quantitative FT-IR and FT-NIR determination of “HTS”, starch, N-substances, β -glucans and pentosans. These models were confirmed by cross validation.

This study was supported by the project Nutrkval No: QH91053 (Ministry of Agriculture).

HASE TRANSITIONS OF MAIZE STARCHES OF DIFFERENT AMYLOSE/AMYLOPECTIN RATIOS IN GLYCEROL-WATER SYSTEMS

PENG LIU^a, FENGWEI XIE^b, MING LI^a, LONG YU^{a,c}, and PETER J. HALLEY^b

*^a Centre for Polymer from Renewable Resources, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China, ^b Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, St Lucia, Qld 4072, Australia, ^c CSIRO Materials Science and Engineering, Melbourne, Vic 3169, Australia
f.xie@uq.edu.au*

The phase transitions of maize starches of different amylose/amylopectin ratios were systematically studied by DSC with stainless steel high-pressure pan under temperature scanning up to 200 °C. The results showed that the distinct pattern of multiphase transitions of maize starch was not only determined by the amylose content, but also by glycerol–water mixture content and glycerol/water ratio. High temperature and long time storage all favor the starch-glycerol reaction.

RELEVANCE OF POLYSACCHARIDES IN AYURVEDIC DRUGS

**RENATE LOEPPERT^{a*}, WERNER PRAZNIK^a,
and MAYANK THAKUR^b**

^a *RG of Plant Carbohydrates, Department of Chemistry, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria,* ^b *Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité Universitätsmedizin Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm, Berlin, Germany*
renate.loepfert@boku.ac.at

Ayurveda (“knowledge about life”) – the traditional Indian medicine – recommends a number of plants, known as Ayurvedic Rasayana. Most of the Ayurvedic rasayana plants are found to be rich in specific polymer carbohydrates depending on their species, origin and appliance. The different carbohydrate populations might serve the purpose of being a medicinal agent themselves or as a biological carrier for the active secondary plant metabolites such as saponins, alkylamides etc. The lecture will present some of these effective polymer carbohydrates and their characterization.

EFFECT OF PALMITOYLCHITOSAN ON CHOLESTEROL HOMEOSTASIS IN RATS

**MILAN MAROUNEK, ZDENĚK VOLEK, EVA
SKŘIVANOVÁ, JAN TŮMA, and ANDRIY
SYNYTSYA**

Institute of Animal Science, 104 00 Praha 22, and Institute of Chemical Technology, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, 166 28 Praha 6, Czech Republic
Marounek.Milan@vuzv.cz

Female rats (6 per group) were fed diets supplemented with cholesterol at 10 g/kg for 4 weeks to evaluate the effect of chitosan and palmitoylchitosan at 20 g/kg on cholesterol homeostasis. Palmitoylchitosan significantly decreased concentration of cholesterol in serum and liver, and increased faecal output of neutral sterols and (to a lesser extent) also bile acids. Effects of chitosan were less pronounced.

SOIL POLYSACCHARIDES AND THEIR RELATIONSHIP TO OTHER FORMS OF SOIL CARBON

JANA KREJČOVÁ^{a} and ŠTĚPÁNKA
MATĚJKOVÁ^b**

^a *Amagro, s.r.o. Praha, 28. pluku 27/443, Praha 10,* ^b *Crop Research Institute, Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně, Czech Republic*
j.krejцова@amagro.com

This work presents a comparison of the relationship between polysaccharide content and soil organic carbon and the results of fractionation of soil organic matter – the commonly used parameters for assessment of soil types. It also made comparisons with the carbon content in the extracts with hot water and 1% potassium sulphate (in both prevail carbohydrates).

The results of analytical determinations were processed by regression analysis.

EXTRACTION, PURIFICATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDES OF GREEN ALGAE (*Ulva* sp. AND *Enteromorpha* sp.)

**GHAZI BENMESSAOUD, BARBARA ROGE,
and MOHAMED MATHLOUTHI^{*}**

Laboratoire de Chimie Physique Industrielle, UMR FARE 614, URCA/INRA- UFR Sciences, Bâtiment 18, Case 43, BP 1039 F-51687 Reims Cedex
**mohamed.mathlouthi@univ-reims.fr*

The excessive growth of some species of green algae such as *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. is responsible for the formation of actual green tides and the imbalance in the marine ecosystem. Typically green-tides are characterized by choking of waterways in the immediate area of the bloom and subsequent local wind and tide driven local deposition on the shore, and this can be destructive to coastal marine habitats and cause economic losses to marine industries.

The availability of this renewable biomass and its rich composition in polysaccharides are the main arguments in favor of its recovery. In this context, we have undertaken an investigation aiming at extracting, purifying and characterizing the major polysaccharide fractions namely ulvan and cellulose. The percentage of ulvan is respectively 14.67 % and 11.34 % for *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. The rheological properties of ulvan hydrogels were studied using a dynamic rheometer of ARES type. This water-soluble fraction shows a thixotropic behavior and a high hydrophilicity.

The surface properties of several celluloses (Avicel pH 101, and cellulose extracted from *Ulva* sp and *Entero-*

morpha sp) were characterized by Scanning Electron Microscopy. It was found that celluloses extracted from seaweeds show a porous surface. BET surface area analysis was applied. The structure of the cellulose powders was characterized by X-ray diffraction. Moisture uptake was directly related to the cellulose crystallinity and pore volume. Celluloses extracted from *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. showed an amorphous structure with crystallinity indexes respectively of 0.28 and 0.13 and specific areas of $5.74 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and $8.34 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

This work allowed characterizing of polysaccharides extracted from a renewable biomass. The structural rheological and hydration properties of these polysaccharides were found interesting enough to envisage their application in replacement of synthetic polymers.

CARRAGEENAN – LOCUST BEAN GUM COMPOSITE GELS

STANISŁAW MLEKO* and WALDEMAR GUSTAW

Department of Milk Technology and Hydrocolloids, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland
dairywhey@tlen.pl

Mixtures of hydrocolloids are commonly used to impart novel and improved rheological characteristics to food products. Kappa carrageenan and locust bean gum are known for their synergistic properties. Formation and rheological properties of mixed polysaccharide composites gels was studied. The composite gels obtained from mixture of κ -carrageenan with locust bean gum in a 4:1 in 0.1M NaCl ratio exhibited higher shear stress value at fracture in comparison to κ -carrageenan gel.

STRUCTURE REVERSIBILITY OF WHEY PROTEIN-I-CARRAGEENAN GELS

MARTA TOMCZYŃSKA-MLEKO and STANISŁAW MLEKO*

Department of Milk Technology and Hydrocolloids, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland
dairywhey@tlen.pl

Gelled structure is very important for food production. It shapes the product, prevents sedimentation or coalescence, extends new products spectrum. Shear forces destroy gel structure, which in some cases can be rebuilt. Research was focused on rehealing of the structure of the gels obtained from whey protein-i-carrageenan mixtures. Protein and carrageenan concentration were important factors for the extend of gel structure rebuilding.

β-GLUCAN COMPOSITION AND STRUCTURE – AN EVOLUTION OF VIEWS

Invited lecture

MIROSLAV NOVÁK

Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Czech Republic
novaks@vscht.cz

Proper history of β -glucan as an immunomodulator goes back to the 40s of the last century when Pillemer and Ecker isolated an insoluble fraction from fresh yeast, zymosan, with β -glucan as an active component. Lately, β -glucan was also proved an active component of Asian medicinal fungi. From these times, the structure of β -glucan has been explored and its relationship to biological effects investigated. Due to a polymeric character and molecular size as well as the tertiary structure inhomogeneities, frequent discrepancies were reported and accurate description of these phenomena is insufficient in certain details till now.

The work was done with the support of the grant GAČR 525/09/1033.

LIPIDS CONTENT DECREASING FOR BETTER CORN STARCH UTILIZATION

VLADIMÍR ONDÁŠ*, KRISTÍNA VAŠINOVÁ, VIERA HORVÁTHOVÁ, and ERNEST ŠTURDÍK

University of SS. Cyril and Methodius, Faculty of Natural Sciences, Department of Biotechnologies, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovak Republic
vladimir.ondas@gmail.com

The work was focused on determination of corn lipids influence on the simultaneous saccharification and fermentation of waxy and standard corn cultivars. From the measured values we found that removal of lipids from corn groats resulted in a statistically significant ($\alpha=0.05$) increase in the glucose concentration after pre-saccharification. The concentration of ethanol was significantly affected only in the case of groats with waxy starch.

We gratefully acknowledge Slovak Research and Development Agency for supporting within the Project APVV LPP-0251-07.

CHARACTERIZATION OF WAXY WHEAT VARIETIES STORED IN GENE BANK**LUDMILA PAPOUŠKOVÁ, VÁCLAV DVOŘÁČEK, and LUCIE PAVLÁTOVÁ***Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Prague 6 - Ruzyně, Czech Republic
papouskova@vurv.cz*

The study shows first characteristics of, in the Czech Republic unique, set of 4 waxy spring wheat varieties (Kanto 107, WQL6K107-BHWX2-2a, WQL6K107-BHWX14-7 and Waxy Pen) in 2007–2009. Results imply highly specific technology – rheological quality (including of Mixolab determination). High similarity among varieties owing to their common genetic origin was confirmed in case of polymorphism of storage proteins.

Supported by The Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. 0002700604.

THE INFLUENCE OF DEGREE OF OXIDATION OF CORN STARCH ON ITS PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES**ŚLAWOMIR PIETRZYK*, PAULINA PAJAŁ, TERESA FORTUNA, LESŁAW JUSZCZAK, and CIEMNIEWSKA ANNA***Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland
s.pietrzyk@ur.krakow.pl*

The aim of this work was to obtain the oxidised corn starch modified with four different levels of sodium chlorate(I), and to compare their physicochemical properties to the properties of the native starch. The native and modified starches were analysed in respect of amylose, carboxyl and carbonyl groups content, susceptibility to retrogradation and water binding capacity and solubility of starch in water at different temperatures. Thermodynamic characteristic of starch gelatinization was also determined. The oxidised starches had different physicochemical properties.

EFFECT OF MINERAL ELEMENTS ON RHEOLOGICAL PARAMETERS OF STARCH**TERESA FORTUNA, ŚLAWOMIR PIETRZYK*, IZABELA PRZETACZEK-ROŻNOWSKA, JACEK ROŻNOWSKI, DOROTA GAŁKOWSKA, and KATARZYNA JANIEC***Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland
s.pietrzyk@ur.krakow.pl*

The aim of this work was to determine the effect of metal ions on the rheological properties of produced modified starches and to compare the properties with these of native starches. The materials were potato, corn and spelt wheat starches with incorporated metal ions (potassium, magnesium and iron). The measurements of the rheological properties of these starches comprised of determination of flow and viscosity-time curves. The studied starches were characterised by different rheological parameters depending on the type of starch modification.

THERMODYNAMIC PASTING CHARACTERISTIC AND SUSCEPTIBILITY TO RETROGRADATION OF STARCHES MODIFIED BY INCORPORATION OF MINERAL ELEMENTS**MALGORZATA BĄCZKOWICZ, ŚLAWOMIR PIETRZYK*, DOROTA GAŁKOWSKA, JACEK ROŻNOWSKI ILONA TARTANUS, and KAROLINA SZKABAR***Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland
s.pietrzyk@ur.krakow.pl*

The aim this work was to determine the effect of mineral elements on the thermodynamic pasting characteristic and susceptibility to retrogradation of modified starches. The materials used were potato, corn and spelt wheat starches modified with using of mineral elements (K, Mg, Fe). Analysis of the modified starches comprised of the determination of thermodynamic pasting characteristic and retrogradation by using DSC. The susceptibility to retrogradation was also determined by turbidimetric method. Modifications of starches had effect on changes in the determined parameters of starch.

PHYSICOCHEMICAL AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF COMMERCIAL MODIFIED STARCHES

PAULINA PAJAK*, TERESA FORTUNA,
and ŚLAWOMIR PIETRZYK

*Department of Analysis and Evaluation of Food Quality,
University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Kra-
kow, Poland
p.pajak@ur.krakow.pl*

The objective of the paper was to evaluate some physicochemical and rheological properties of selected commercial modified starches. The swelling power and solubility in water, as well as the pasting profile were determined. Rheological properties were measured using rotational rheometer with concentric cylinders geometry. Based on the investigations accomplished, it was concluded that the starches differed in their physicochemical and rheological properties.

MOLECULAR MASS OF WATER/ALKALI SOLUBLE POLYSACCHARIDES FROM MUSHROOMS APPLIED IN TMC

Invited lecture

WERNER PRAZNIK^a, ANTON HUBER^b,
and JANA ČOPIKOVÁ^c

^a *RG of Plant Carbohydrates, Department of Chemistry,
University of Natural Resources and Applied Life Science,
Vienna, Austria;* ^b *CePoL/MC - Central Polymer Lab /
Molecular Characteristics, IfC -Institut für Chemie, KF-
Univ Graz, Austria;* ^c *Department of Carbohydrate Chem-
istry and Technology, ICT Prague, Czech Republic
werner.praznik@boku.ac.at*

The ‘Traditional Chinese Medicine’ (TCM) applies mushrooms against diseases and for healthy effects. These effects are based partly on the prebiotic properties of the including polysaccharides. Analyses of glycans have shown mainly β-glucan with small amounts of heteropolysaccharids. Calibrated SEC-analysis delivered detailed information about molecular mass distribution and average molecular values. Results from different mushroom, grown on the trunk of birch, will be presented and discussed.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF INCLUSION COMPLEX FORMATION BETWEEN CHLORHEXIDINE AND β-CYCLODEXTRIN DERIVATIVES

CAROLINA PUPE*, LUIZ CLÁUDIO DA SILVA,
ARÍDIO MATTOS JUNIOR, and LÚCIO CABRAL

*Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Carlos
Chagas Filho Avenue, University City, Rio de Janeiro,
Brasil, 21941-902
carolinapupe@gmail.com*

Cyclodextrins are cyclic oligomers of glucose that can constitute a host:guest conformation with drugs. This conformation may prevent side effects as observed for chlorhexidine, an antiseptic agent that causes teeth staining, chemical incompatibility and has a bitter taste. The inclusion complexes were prepared by simple methods and their formation was evidenced by XRPD and DSC. Moreover inhibition effect against *C. albicans* and *S. mutans* was confirmed in vitro.

*Acknowledgement: this investigation was supported by
CAPES.*

APPLICATION OF WHEAT B-STARCH AS FILLER FOR ADHESIVES

EVŽEN ŠÁRKA^a, LENKA CIHELKOVÁ^a,
JAN GOJNÝ^b, and ZDENĚK BUBNÍK^a

^a *Department of Carbohydrate Chemistry and Technology,
ICT Prague,* ^b *Department of Wood, Pulp and Paper, Uni-
versity of Pardubice, Czech Republic
evzen.sarka@vscht.cz*

Food application of B-starch as a result of lower quality is problematic. The study focused on preparation of polymer adhesives with various additions of dried B-starch, kaolin or dried carbonation lime. The viscosities of adhesive samples using a rotary viscometer and strengths of the adhesive bond with paperboard on the TIRAtest 26005 were measured. B-starch as a filler or partial polymer substitute had a positive influence on physical and price properties.

*This research was supported by the Research Inten-
tion Theoretical Fundamentals of Food and Biochemical
Technologies of MSM CR, No. MSM 6046137305.*

EFFECT OF REACTION TIME ON THE ACETYLATION OF WHEAT B-STARCH AND CHARACTERIZATION OF THE PRODUCT

EVŽEN ŠÁRKA^a, JAROSLAV KOLÁČEK^a,
ANTONÍN SIKORA^b, KATEŘINA HRUŠKOVÁ^a,
DANA PROKOPOVÁ^a, RICHARD HRABAL^c,
JAROSLAV MAIXNER, and ZDENĚK BUBNÍK^a

^a Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, ICT Prague, Czech Republic, ^b Department of Thermodynamics and Rheology, Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v. v. i., Czech Republic, ^c Central Laboratories, ICT Prague, Czech Republic
evzen.sarka@vscht.cz

Wheat B-starch in native or pre-gelatinized form was acetylated at various reaction times for temperatures in the range of 115–128 °C. The following parameters of the dried and grinded product were studied: particle size measured by image analysis and laser diffraction, degree of substitution by measurement of ¹H NMR spectra and FT-IR spectra, crystalline structure by X-ray diffraction pattern, temperature and enthalpy of gelatinization.

This research was supported by the Research Grant “Biodegradable composites based on B-starch for agriculture applications” GAČR 525/09/0607 and by the Research Intention MSM 6046137305 Theoretical Fundamentals of Food and Biochemical Technologies of MSMT CR.

CASSAVA AS AN EXOTIC SOURCE OF STARCH

EVŽEN ŠÁRKA, KATEŘINA HRUŠKOVÁ,
ANDREA HINKOVÁ, and ZDENĚK BUBNÍK

Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, ICT Prague, Czech Republic
evzen.sarka@vscht.cz

Cassava roots as a starch source were obtained from Vietnam. The ratio total starch/dry substance ranged from 61.4 to 82.2 %. The content of lipids, fiber and K, Ca, Mg, N and P was found 0.18 %, 3.61 %, 1.43 g/kg, 0.33 g/kg, 0.52 g/kg, < 0.1 % and < 0.5 %, respectively. Extractable carbohydrate content was determined using HPAC – PAD, system Dionex, the highest value was found for fructose and sucrose (0.536 % and 0.503 %, respectively). The total sum of extractable carbohydrates was 1.50 %, this comprised 0.97 % of reducing sugars.

This research was supported by the Research Intention Theoretical Fundamentals of Food and Biochemical Technologies of MSMT CR, No. MSM 6046137305.

ADSORPTION OF METAL CATIONS FROM AQUEOUS SOLUTIONS ONTO STARCH GRAFTED COPOLYMERS

BEATA SCHMIDT* and TADEUSZ SPYCHAJ

Polymer Institute, Westpomeranian University of Technology, 70-322 Szczecin, ul. Pulaskiego 10, Poland
Beata.Schmidt@zut.edu.pl

Adsorption of Cu⁺² and Fe⁺³ cations from aqueous solutions onto starch graft copolymers have been investigated. Starch-g-poly(acrylamide-co-acrylic acid) copolymers were manufactured by reactive extrusion. Efficiency of cations sequestration has been evaluated using simple and sensitive UV-VIS spectrophotometric method. The starch graft copolymers can effectively remove metal cations from aqueous solutions.

POLYSACCHARIDES BASED NANOPARTICLES: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION

LUIZ CLÁUDIO DA SILVA*, CAROLINA PUPE,
MARIANE ASSAFIM, BÁRBARA CAMARINHA,
KAREN TAVARES, LEONARDO CINELLI,
PRISCILLA FINOTELLI, and LÚCIO CABRAL

Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Carlos Chagas Filho Avenue, University City, Rio de Janeiro, Brasil, 21941-902
lulaufrj@hotmail.com

Pharmaceutical sciences and biochemistry researchers exhibited a lot of interest to polysaccharides as biopolymers for nanoparticles production and anticoagulant effects. The aim of this study was produce and characterize nanoparticles combining chondroitin sulfate, sulfated fucan, and chitosan. Nanoparticles showed regular shapes (mean diameter between 140 and 181 nm) and anticoagulant properties.

Acknowledgement: this investigation was supported by CAPES.

β-GLUCANS IN FOOD SUPPLEMENTS

PETRA SLAVÍČKOVÁ, ANDRIY SYNYTSYA,
GORDON K. GOMBA, MIROSLAV NOVÁK,
and JANA ČOPIKOVÁ

Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, ICT Prague, Czech Republic
petra.slavickova@gmail.com

The polysaccharides β-glucans occur as an important component of the cellular walls in some microorganisms,

such as yeast and mushrooms. There are several isolates and supplements available commercially that contain β -glucans. These polysaccharides stimulate the immune system, modulating humoral and cellular immunity. A set of isolates and food supplements was evaluated based on the content of β -glucans determined with Megazyme kit K-YBGL. The purity of the products was verified with the aid of spectrometric methods

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sport (project 6046137305) and the Czech Science Foundation (project No 525/09/1133).

EXTRUDED THERMOPLASTIC STARCH-BASED (NANO)MATERIALS FOR TECHNICAL PURPOSES

Invited lecture

TADEUSZ SPYCHAJ*

*Polymer Institute, Westpomeranian University of Technology, 70-322 Szczecin, ul. Pulaskiego 10, Poland
Tadeusz.Spychaj@zut.edu.pl*

Two types of starch-based materials are presented: (i) extruded thermoplastic starch modified with montmorillonites (pristine and organophilized), and (ii) starch grafted acrylic copolymers synthesized via reactive extrusion. Physicochemical characterization of the both obtained modified starches as well as mechanical properties of the first group materials, and metal cation binding, flocculation or water sorption features of the second, are considered.

THE ROLE OF CARBOHYDRATES IN THE STRUCTURE FORMATION OF THE SOY PROTEIN CONCENTRATE DURING THE EXTRUSION PROCESS

KRZYSZTOF SURÓWKA

*University of Agriculture in Kraków, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, Poland
rtsurowk@cyf-kr.edu.pl*

An attempt has been made to investigate the effect of endogenous carbohydrates occurring in the soy cotyledons for the structure formation of extrudates obtained from soy protein concentrate. Therefore, the solubility of extrudates in the solvents, which are capable to loose the bonds of a different type, has been examined. It has been found that the polysaccharide fractions diminish the importance of intermolecular non-covalent interactions in texture formation, and at the same time oligosaccharides increase the role of ionic and disulphide bonds. As a result of extrusion, the polysaccharides become partially bonded into the protein matrix.

The author wishes to thank prof. Ricardo Villota for providing financial assistance for this project.

SEPARATION, THICKENING, CLASSIFICATION AND WASHING OF WHEAT STARCH WITH HYDROCYCLONES

Invited lecture

LADISLAV SVAROVSKY

*FPS Institute, Bexhill-on-Sea, United Kingdom
LSvarovsky@aol.com*

The paper reviews the ways of boosting the performance of hydrocyclones by using series connections and recycles, with particular reference to wheat starch. Different applications, alternative arrangements and applicable design rules are discussed, with quotes of specific case studies encountered in industry. Aimed at practitioners such as chemists, process engineers or plant operators, as well as students and academics.

AMYLOSE AND PHOSPHORUS CONTENT IN STARCH OF INDUSTRIAL POTATO VARIETIES

DAGMAR ŠIMKOVÁ, JAROSLAVA DOMKÁŘOVÁ, and BOHUMIL VOKÁL

*Potato Research Institute, Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, Czech Republic
simkova@vubhb.cz*

The study is focused on the evaluation of results regarding amylose (enzymatic determination by Megazyme kit) and phosphorus content (spectrophotometric determination) in starch samples from potato varieties grown for industrial purpose. Dependences of determined parameters (amylose, phosphorus) are evaluated in relation to potato varieties and localities in the Czech Republic.

The study was supported by the project of Ministry of Agriculture of the Czech Republic, National Agency for Agricultural Research No. IG57056.

A NOVEL APPROACH FOR PREPARATION OF AMIDE DERIVATES OF HYALURONAN**DANIELA ŠMEJKALOVÁ^{*}, GLORIA HUERTA-ANGELES, RADOVAN BUFFA, and VLADIMÍR VELEBNÝ***Contipro C a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní Dobrouč, Czech Republic
smejkalova@contipro.cz*

A novel approach of activation of hyaluronan carboxyl group involving ethylchloroformate was found to produce highly substituted hyaluronan. The amide derivatives were prepared within minutes after the addition of primary amines to the activated hyaluronan solution. A complete structural elucidation was obtained by a combination of 1D and 2D NMR techniques, including DOSY, COSY, TOCSY, HSQC and HMBC experiment. The amide derivatives prepared in this way can undergo crosslinking to produce stable and biocompatible hydrogels.

HYDROLYSIS AND DERIVATIZATION OF OXIDIZED CELLULOSE**TOMÁŠ TAUBNER^a, ANDRIY SYNITSYA^a, JANA ČOPIKOVÁ^a, PAVEL HAVELKA^b, and GORDON K. GOMBA***^a Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, ICT Prague, Czech Republic, ^b VUOS a.s., Pardubice – Rybitví, Czech Republic
taubnert@vscht.cz*

Microwave assisted hydrolysis of water soluble sodium salt of oxidized cellulose was carried out at 100 °C and power output 150 W. The distribution of the molecular weight of products was in the range from 8 000 to 30 000 g mol⁻¹. As methylester of oxidized cellulose is more reactive polymer than previous one the highly methylated oxidized cellulose was amidated with five amines under anhydrous conditions. Maximal values were obtained for ethanolamide and minimal for octylamide. The degree of derivatization was confirmed by FTIR and elementary organic analysis.

This work was supported by the Ministry of Industry and Trade (project 2A-ITP1/041) and by the Ministry of Education, Youth and Sport (project 6046137305).

CHARAKTERIZATION OF CELLULOSE AND ITS DERIVATIVES BY THERMAL ANALYSIS AND FT-IR**JOZEF TURJAN^a, MILAN DRÁBIK^b, PETER MAGDOLEN^a, JÁN KOZÁK^a, JOZEF ŠVEC^a, and PETER CAPEK^a***^a Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia, ^b Institute of Inorganic Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 36 Bratislava, Slovakia
chemtur@savba.sk*

The thermal properties of cellulose and its organic (carboxymethyl and methyl 2-hydroxyethyl), inorganic (sulfate) as well as their hybrid organic–inorganic derivatives (carboxymethyl-sulfate and methyl 2-hydroxyethyl-sulfate) were investigated in the temperature range 20–500 °C in order to find possible differences in their fingerprints. Thermal analysis revealed information concerning their thermal stability and decomposition.

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/0155/08 and APVV Grant No. 0030/07.

EFFECT OF GENOTYPE ON VARIABILITY IN THE CONTENT OF NON-STARCH POLYSACCHARIDES IN BARLEY GRAIN**KATEŘINA VACULOVÁ^a, MARTA BALOUNOVÁ^a, RENATA MIKULÍKOVÁ^b, KAROLÍNA BENEŠOVÁ^b, and JAROSLAVA EHRENBERGEROVÁ^c***^a Agrotest Fyto, Ltd., Havlickova 2787, 767 01 Kromeriz, ^b Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute, Mostecka 7, 614 00 Brno, ^c Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic
vaculova.katerina@vukrom.cz*

The effect of a different grain type (hulled vs. hullless) and starch (standard vs. waxy with a reduced amylose/amylopectin ratio) on the variability in the content of important nutrients (non-starch polysaccharides: β -glucans and pentosans; *N*-substances and starch) was studied in a set of 21 cultivars and 80 new lines of spring barley, grown at two locations (Kromeriz and Zabcice) in the years 2008–2009. In hullless materials, production of β -glucans was on average 36.3 % higher and that of pentosans 14.4 % lower than in hulled genotypes with standard starch. New lines with high (KM 2619.413.4.03) or low (progenies of KM 1057) contents of β -glucans and pentosans, suitable for food and feed use, were selected.

Financial support from the Ministry of Agriculture and Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic, under projects QH91053, 1M0570 and MSM2532885901 is gratefully acknowledged.

PERSPECTIVES IN CANCER TREATMENT BY A GLYCOBIOLOGICAL APPROACH: RESULTS IN EXPERIMENTAL TUMOR MODELS *IN VIVO*
Invited lecture

L. VANNUCCI, A. FISEROVA, P. ROSSMANN, V. KREN, P. KRIST, K. BEZOUSKA, M. SAIEH, V. ULLMANOVA-BENSON, K. KLIMESOVA, V. GROBAROVA, J. KRIZAN, and V. SASEK

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Videnska 1083, Prague 4, Czech Republic
vannucci@biomed.cas.cz

Glycosylated structures of proteins and lipids are functionally important in cell-cell interactions as well as in immune recognition. Aberrant glycosylation products due to a carcinogenetic process can be targeted by lectin-like receptors on natural immunity cells. We report our experience with synthetic glycoconjugates and beta-glucans in the modulation of cancer recognition and anticancer responses.

EFFECT OF MODIFIED STARCHES ON RHEOLOGICAL PROPERTIES OF GLUTEN-FREE DOUGH

MARIUSZ WITCZAK^{*,a}, LESŁAW JUSZCZAK^b, JAROSŁAW KORUS^c, RAFAL ZIOBRO^c, and TERESA WITCZAK^a

^a *Department of Engineering and Machinery for Food Industry,* ^b *Department of Analysis and Evaluation of Food Quality,* ^c *Department of Carbohydrates Technology, Agricultural University, Balicka 122 Str., 30-149 Krakow, Poland*
rrwiczka@cyf-kr.edu.pl

Selected rheological properties of gluten-free dough with addition of modified starch were investigated with the use of rheometer equipped with a system of parallel plates. Mechanical spectra were measured in the range of linear viscoelasticity, at constant strain amplitude. Creep and recovery tests were performed at constant shear stress. The investigations have shown a significant influence of starch type upon rheological properties of the dough.

THE CONTENT OF DEXTRAN IN RAW CANE SUGAR AND ITS DECREASING DURING THE REFINING PROCESS

MACIEJ WOJTCZAK* and ANETA ANTCZAK

Technical University of Lodz, Institute of Chemical Technology of Food 90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10, Poland
maciej.wojtczak@p.lodz.pl

The material for the analysis consisted of: raw and refined cane sugar samples and by-products of the refining process. The obtained results show that the content of dextran in raw cane sugars was from 86 to about 320 mg/kg. Dextran present in cane raw sugar is partially eliminated during the process of refining; in our experiment its content in refined cane sugar was from 50 to about 120 mg/kg.

The study was supported by the research grant No. NN312 165934 form the Polish Ministry of Science and Higher Education.

STARCH-BASED COMPOSITIONS AND FILMS MODIFIED WITH SEMIHYDROPHILIC ORGANOMONTMORILLONITES

MAGDALENA ZDANOWICZ and TADEUSZ SPYCHAJ*

Polymer Institute, Westpomeranian University of Technology, 70-322 Szczecin, ul. Pulaskiego 10, Poland
Tadeusz.Spychaj@zut.edu.pl

Biopolymeric compositions and films prepared via solution casting of gelatinized starch with water/glycerol slurries of organophilized montmorillonites (OMMT) have been obtained and characterized. Effectiveness of OMMT dispersion in starch compositions (indirectly by viscosity measurements) and rheological properties of the systems were evaluated and compared. The degree of OMMT dispersion in starch film was determined by XRD.

THE EFFECT OF FLOUR SORT ON THE CARBOHYDRATE PROFILE OF FLOUR AND PASTRY

KAROLINA MIŚKIEWICZ^a, EWA NEBESNY^a, ANETA ANTCZAK^a, JADWIGA GOŁĄBCZAK^b, and JUSTYNA ROSICKA-KACZMAREK^a

^a Technical University of Lodz, Institute of Chemical Technology of Food 90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10,

^b Technical University of Lodz, Institute of Technical Biochemistry, Poland

karolcia_1-82@tlen.pl

This work aimed at determination of carbohydrate profiles of flours originating from various sources and their mixtures as well as estimation of their impact on carbohydrate composition of the pastry such as short crust cakes. The carbohydrate profiles of cakes were different from the profiles of flours. The analyses showed that the richest in glucose, fructose and sucrose were cakes derived from spelt flour type 630. The lowest content of these sugars was found in cakes obtained from the mixture containing 25% Amaranthus flour. Comparison of quantities of the aforementioned sugars in the tested flours and cakes revealed that all of them were decreased by baking. Baking caused hydrolysis of starch. Its quantities in the cakes were by approximately 58% lower compared to flours and their mixtures. Our study revealed a decrease in sucrose content by approximately 60% on average compared to flours and their mixtures.

DIFFERENCES IN CHEMICAL COMPOSITION OF STARCH SURFACE GRANULES AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF GLUCOSE HYDROLYSATES IN DEPENDENCE OF WHEAT KERNEL HARDNESS

JUSTYNA ROSICKA-KACZMAREK^a, EWA NEBESNY^a, IZABELLA KWAŚNIEWSKA-KAROLAK^a, and MARIOLA TKACZYK^b

^a Technical University of Lodz, Institute of Chemical Technology of Food 90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10,

^b Department of Physical Chemistry, University of Lodz, Poland

rosicka_j23@o2.pl

The aim of the study was to characterize the relationship between endosperm texture (wheat kernel class) and the involvement of polar lipids in the association of friabilin to starch granule surface. Our research showed, that starch from soft classes contain higher quantities of proteins and lipids on starch granule surface then from hard cultivars. We also confirmed, that starches isolated from hard wheat do not include surface proteins from friabilin family (puroindoline) on the contrary to starches from soft

wheats. It was demonstrated that puroindolines form complexes with bound polar lipids present on starch granule surface. Obtained results showed, that starches from hard wheat varieties contain higher amount of amylase-lipid complex, in spite the total amount of surface lipids was lower in starches from hard varieties then from soft wheats. wheat hardness class determined the physico-chemical properties of obtained glucose syrups. Hydrolysates received from soft wheat starches characterized higher DE and two-times shorter filtration time than syrups from hard varieties starches. On the contrary syrups obtained from hard wheat starches had a better transparency index.

This work is financially support by the Ministry of Science and High Education Project No. NN312 314337.

CHANGES OF AMYLOSE-LIPID COMPLEX POLYMORPHIC FORM AND ITS INFLUENCE ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ENZYMATIC HYDROLYSATES FROM WHEAT STARCH

JUSTYNA ROSICKA-KACZMAREK^a, EWA NEBESNY^a, IZABELLA KWAŚNIEWSKA-KAROLAK^a, TOMASZ ZIĘBA^b, and ARTUR GRYSZKIN^b

^a Technical University of Lodz, Institute of Chemical Technology of Food 90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10,

^b Department of Food Storage and Technology, Wrocław University of Environmental and Life Science, Poland
rosicka_j23@o2.pl

The aim of the study was to determine changes of AML complex in native starch and in starch after removing surface protein in dependence of extracting solvent during process of enzymatic hydrolysis. We also examined the impact of AML changes and extraction processes on the physico-chemical properties of obtained hydrolysates. Thermal analysis showed dissimilarities in the susceptibility of starch to gelatinization process what indicates differences in amounts of AML complex in dependence of wheat starch source. Extraction of surface proteins with different solutions caused changes in the AML – complex susceptibility to hydrolysis with alpha-amylase. It was also concluded that amount of AML complex and its polymorphic form influence the physico-chemical properties of hydrolysates obtained from wheat starch.

This work is financially support by the Ministry of Science and High Education Project No. NN312 314337.

EFFECT OF ACETYLATION ON SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CASSAVA STARCH**LEŚLAW JUSZCZAK^{a,*}, TOMASZ ZIEBA^b, ARTUR GRYSZKIN^b, SŁAWOMIR PIETRZYK^a, and TERESA FORTUNA^a**

^a Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture University of Agriculture, Balicka 122 Str. 30-149 Krakow, Poland, ^b Department of Food Storage and Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, C.K. Norwida 25/27 Str. 50-375 Wrocław, Poland
rrjuszcz@cyf-kr.edu.pl

The aim of the present work was to study the effect of acetylation on some physicochemical properties of cassava starch. Stabilization of starch structure by acetyl groups increased paste clarity, water binding capacity and solubility. Whereas acetylation process decreased gelatinization temperatures, paste viscosity and tendency to retrogradation. On the grounds of obtained results, important correlation between acetyl content and some physicochemical properties were observed.

POLYPHENOLIC-POLYSACCHARIDE CONJUGATES WITH ANTICOAGULANT ACTIVITY FROM *AGRIMONIA EUPATORIA* (L.): CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE COMPOUNDS SEPARATED WITH ANION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY**MARTA TSIRIGOTIS-WOŁOSZCZAK^a, IZABELA PAWLACZYK^{a,b}, WITOLD PILECKI^{b,c}, and ROMAN GANCARZ^{a,b}**

^a Division of Medicinal Chemistry and Microbiology, Wrocław University of Technology, ul. Łukasiewicza 2, 50-371 Wrocław, Poland, ^b Regional Specialist Hospital in Wrocław, Research and Development Centre, ul. Kamińskiego 73a, 51-124 Wrocław, Poland, ^c Department of Pathophysiology, Wrocław Medical University, ul. K. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław, Poland
marta.tsirigotis-woloszczak@pwr.wroc.pl

Polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Agri-monia eupatoria* L. were analyzed with anion-exchange chromatography, DEAE type, by step-wise elution, with NaCl solutions at different concentrations (0.05–1.2 M). The *in vitro* anticoagulant activities of the separated fractions were tested on human blood plasma by aPTT, PT and TT tests. The chemical characterization of the separated compounds was done with different colorimetric methods.

This work is supported by European Regional Development Fund and the Polish Government (Operational Programme Innovative Economy 2007-2013) under the grant "WROVASC – Integrated Cardiovascular Centre".

INFLUENCE OF SUGAR BEET PECTIN ON EMULSIFYING PROPERTIES OF WHEY PROTEINS**RENÁTA KOVÁČOVÁ*, MIROSLAVA MIHULOVÁ, MARCELA ŠIRMEROVÁ, and JIŘÍ ŠTĚTINA**

Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
renata.kovacova@vscht.cz

Whey proteins are being used in many colloidal food products to increase viscosity, to form gels, to stabilise emulsions or foams, or as water-binding agents, however, they are susceptible to aggregate under acid condition and heat treatment. Pectin is able to stabilise dairy proteins at these conditions, but stabilisation is strongly influenced by pectin structure. Sugar beet pectin can be interesting for application because it has different structure in comparison with citrus and apple pectin. In this study, the influence of medium pH and temperature on sugar beet pectin-whey protein complex was evaluated by measurement of hydrodynamic diameter and surface electrical potential of complex particles. It was observed, that sugar beet pectin prevent both pure β -lactoglobulin and whey sample aggregation successfully at these conditions. Further, influence of beet pectin on emulsifying properties of whey protein was evaluated. The model oil-in-water emulsions (10% w/w oil content) from reconstituted whey at pH 3 and pH 7 with and without pectin addition were prepared. It was observed that addition of beet pectin slightly increased size of oil droplets (from 7.9 to 12.2 μ m), but significantly improved emulsion stability. However, pectin addition significantly impaired emulsion ability of whey proteins at pH 3, because of significant increasing of oil droplet size (from 8.9 to 37.6 μ m).

This work was supported by financial support from specific university research (MSMT no. 21/2010) and by funding of Ministry of Education, Youth and Sports (MSM 6046137305).

Autorský rejstřík

- Alamäe T. 883
Antczak A. 899, 900
Arga K. Y. 890
Assafim M. 896
Ates Ö. 890
- Bączkowiec M. 894
Balounová M. 898
Běláková S. 886
Benešová K. 898
Benmessaud G. 892
Bezouška K. 883, 899
Bieliková M. 886
Blahovec J. 887
Brljová M. 883
Bubník Z. 895, 896
Buffa R. 898
Buxa K. 883, 884
- Cabral L. 895, 896
Camarinha B. 896
Capek P. 884, 898
Ciemniewska A. 894
Cihelková L. 895
Cinelli L. 896
- Čertík M. 883
Čopíková J. 891, 895, 896, 898
Čožíková D. 885
- Da Silva L. C. 895, 896
Długosz M. 890
Domkářová J. 897
Dostálová J. 891
Dostálová R. 885
Drábik M. 898
Duchek P. 885
Duchoňová L. 885
Dvončová D. 887
Dvořáček V. 894
Dvořáková J. 888
- Ebringerová A. 888, 890
Ehlova T. 887
Ehrenbergerová J. 886, 898
- Finotelli P. 896
Fiserova A. 899
Fortuna T. 890, 894, 895, 901
Fraňová S. 884
- Gago F. 889
Gałkowska D. 890, 894
Gambuś H. 883
Gancarz R. 901
Gavurníková S. 886
Gojný J. 895
Gołąbczak J. 900
Gomba G. K. 898
Gregorová E. 886
- Grobarova V. 899
Gryszkin A. 900, 901
Gubiš J. 886, 887
Gustaw W. 893
- Halley P. J. 891
Hasalová I. 885
Havelka P. 898
Havrlentová M. 886, 887
Hejlová A. 887
Hermannova M. 887
Hinková A. 896
Hirsch J. 888
Hlinková A. 887
Horáček J. 885
Horváthová V. 887, 893
Hrabal R. 896
Hrabica J. 888, 891
Hromádková Z. 888, 890
Hrušková K. 896, 896
Hrušková M. 888
Huber A. 895
Hudcovicová M. 888
Huerta-Angeles G. 898
- Chmeličková M. 886
Chowaniec A. 883
- Jablonský I. 889
Jane J.- L. 889
Janiec K. 894
Jaworska G. 890
Jurinova I. 888
Jurovatá J. 889
Juszczak L. 890, 894, 899, 901
- Karikoga G. K. 896
Kazak H. 890
Klčová L. 888
Klimesova K. 899
Klímová E. 886
Koláček J. 896
Korus J. 899
Košťálová Z. 890
Kováčková R. 901
Kozák J. 898
Kozáková R. 885
Kraic F. 889
Kraic J. 888
Krejčová J. 892
Kren V. 899
Krist P. 899
Krizan J. 899
Křižanová K. 887
Kucukasik F. 890
Kusý P. 888, 891
Kvasnička F. 891
Kwaśniewska-Karolak I. 900
- Lázníček M. 885
- Lázníčková A. 885
Leierova V. 887
Leitnerová D. 891
Lhotáková E. 891
Li M. 891
Liu P. 891
Loeppert R. 892
- Macháň P. 886
Magdolen P. 898
Maixner J. 896
Mardo K. 883
Marounek M. 892
Matějková Š. 892
Mathlouthi M. 892
Mattos A. Junior 895
Mihálik D. 888
Mihulová M. 901
Mikulíková D. 888
Mikulíková R. 898
Miśkiewicz K. 900
Mleko S. 893
- Nebesny E. 900
Nosálová G. 890
Novák M. 893, 896
Nowotna A. 884
- Ondáš V. 887, 893
Öner E. T. 890
- Pabst W. 886
Pajak P. 894, 895
Papoušková L. 894
Paulsen B. S. 884
Pawlaczyk I. 901
Pavlátová L. 894
Petrášiková E. 883
Pietrzyk S. 894, 895, 901
Pileckí W. 901
Praznik W. 892, 895
Prisenžňáková L. 890
Prokopová D. 896
Przetaczek-Roźnowska I. 894
Pupe C. 895, 896
- Roge B. 892
Rosicka-Kaczmarek J. 900
Rossmann P. 899
Roźnowski J. 894
- Saieh M. 899
Sasek V. 899
Schmidt B. 896
Sikora A. 896
Skřivanová E. 892
Slavičková P. 896
Spsychaj T. 896, 897, 899
Súkopová H. 889
Surówka K. 897
Svarovsky L. 897
- Synytsya A. 891, 892, 896, 898
Szkabar K. 894
- Šafaříková A. 891
Šárka E. 895, 896
Šimková D. 897
Širmerová M. 901
Šliková S. 888
Šmejkalová D. 888, 891, 898
Špírková M. 885
Štětina J. 901
Šturdík E. 885, 887, 893
Šudyová V. 888
Šutovská M. 884
Švec I. 888, 898
- Tartanus I. 894
Taubner T. 898
Tavares K. 896
Thakur M. 892
Tkaczyk M. 900
Togola A. 884
Tomczyńska-Mleko M. 893
Tomšíková K. 887
Trojan R. 885
Trojtlerova L. 887
Tsirigotis-Wołoszczak M. 901
Tůma J. 892
Turjan J. 898
- Ullmanova-Benson V. 899
- Vaculová K. 886, 891, 898
Vannucci L. 899
Vašinová K. 893
Velebný V. 885, 887, 888, 891, 898
Visnapuu T. 883
Vokál B. 897
Voldřich M. 891
Volek Z. 892
Vrchotová N. 888
- Wierdak M. 884
Witczak M. 890, 899
Witczak T. 899
Wojtczak M. 899
Wrońska K. 884
- Xie F. 891
- Yu L. 891
- Zdanowicz M. 899
Zięba T. 900, 901
Ziobro R. 899
- Žofajová A. 886, 887

OBSAH

ÚVODNÍK 821

REFERÁTY

Kokrystaly a jejich očekávané farmaceutické aplikace 823
B. Kratochvíl

Metabolismus ecdysteroidů u hmyzu (*Insecta*) a význam hmyzí střevní mikroflóry 831
M. Pavlík, H. Ryšavá a Z. Wimmer

Senzorická stabilita piva 838
P. Nádaský a D. Šmogrovičová

Čištění odpadních vod chemickou oxidací hydroxylovými radikály 846
L. Dušek

Možnosti využití spektroskopie NIR v masném průmyslu 855
J. Mlček, O. Rop, K. Šustová, J. Simeonovová a R. Gál

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

Posouzení čichového vnímání prostřednictvím komerčně dostupné sady pachů 861
D. Leitnerová, Z. Panovská, A. Váchová a B. Boháčková

Simultánní stanovení obsahu nestruturních sacharidů a škrobu v listech vyšších rostlin metodou využívající anthronového činidla 867
P. Teslová, J. Kalina a O. Urban

Charakterizácia vlastností a kryštalizácia malátdehydrogenázy *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 871
D. Mikulášová, M. Koháryová, P. Štefanková a M. Kollárová

Zníženie emisií pri spaľovaní biomasy v teplovodnom kotly 876
J. Mullerová, S. Hloch a J. Valíček

POLYSACHARIDY 2010 881

CONTENTS

EDITORIAL 821

REVIEW ARTICLES

Cocrystals and Their Expected Pharmaceutical Applications 823
B. Kratochvíl

Metabolism of Insect Ecdysteroids and Significance of Insect Intestinal Microbiota 831
M. Pavlík, H. Ryšavá, and Z. Wimmer

Sensory Stability of Beer 838
P. Nádaský and D. Šmogrovičová

Purification of Wastewater Using Chemical Oxidation Based on Hydroxyl Radicals 846
L. Dušek

Potentials of NIR Spectroscopy in Meat Industry 855
J. Mlček, O. Rop, K. Šustová, J. Simeonovová, and R. Gál

LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS

Assessment of Olfactory Perception with a Commercially Available Set of Odours 861
D. Leitnerová, Z. Panovská, A. Váchová, and B. Boháčková

Simultaneous Determination of Non-Structural Saccharides and Starch in Leaves of Higher Plants Using Anthrone Reagent 867
P. Teslová, J. Kalina, and O. Urban

Characterization, Properties and Crystallization of Malate Dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor* 871
D. Mikulášová, M. Koháryová, P. Štefanková, and M. Kollárová

Reducing Emissions from the Incineration of Biomass in the Boiler 876
J. Mullerová, S. Hloch, and J. Valíček

POLYSACCHARIDES 2010 881

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 104 (2010), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 134, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 120 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2010 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plně předplatné 2010 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2010 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 25.8.2010.