

**MEDEDELINGEN LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN • NEDERLAND • 69-9 (1969)**

**EEN CHEMISCHE BIJDRAGE TOT DE
KENNIS VAN HET ROKEN VAN VIS**

A chemical contribution to the knowledge of fish smoking

A. RUITER

Instituut voor Visserijprodukten T. N. O., IJmuiden, Nederland

(Received 24-I-1969)

H. VEENMAN & ZONEN N.V. - WAGENINGEN - 1969

664.951.3

**Mededelingen Landbouwhogeschool
Wageningen 69-9 (1969)
is ook gepubliceerd als proefschrift**

INHOUD

1. ENIGE ASPEKTEN VAN HET ROOKPROCES, MET NAME VAN HET VISROKEN	1
1.1. Inleiding	1
1.2. Statistische gegevens over de productie van gerookte vis	2
1.3. Koud en heet roken	4
1.3.1. Koud roken	4
1.3.2. Heet roken	7
1.4. Rookontwikkeling	8
1.4.1. Verschillende houtsoorten als rookbron	8
1.4.2. Rookontwikkelaars	11
1.4.2.1. Het conventionele houtvuur	11
1.4.2.2. Gemechaniseerde rookontwikkelaars	12
1.5. Afwijkende wijzen van roken	17
1.5.1. Elektrostatisch roken	17
1.5.1.1. Elektrostatisch gefiltreerde rook	19
1.5.2. „Rookloos roken”	19
1.6. Slotopmerkingen	20
2. ONDERZOEK NAAR DE ACHTERGRONDEN VAN HET ROOKPROCES	22
2.1. Inleiding	22
2.2. Aroma en smaak van gerookte produkten	23
2.2.1. Rooksamenstelling	23
2.2.2. Neerslag c.q. absorptie van rook	25
2.3. Verhoging der houdbaarheid als gevolg van de microbicide eigenschappen van rook	29
2.3.1. Toxicologische aspecten	31
2.4. Vertraging van oxidatief vetbederf	33
2.5. Kleurvorming op gerookte produkten	33
2.6. Motivering van eigen onderzoek	36
3. ORIENTEREND ONDERZOEK	38
3.1. Bij de experimenten gebruikte rookinstallaties	38
3.2. Omstandigheden waaronder de kleur tot stand komt	39
3.3. Aandeel van het gerookte produkt in de kleurvorming	43
3.3.1. De rol der aminogroepen	43
3.4. Aandeel van rookbestanddelen in de kleurvorming	45
3.4.1. Opvangen van rook	45
3.4.2. Onderzoek naar actieve rookbestanddelen	46
3.4.2.1. Het verband tussen het optreden van de blauwe kleur in alkalisch milieu en de structuur van het carbonylderivaat	47
3.4.2.2. Herkomst van glyoxaal- resp. methylglyoxaal-bis-hydraxon	50
3.4.2.3. Testen van actieve verbindingen	50
3.5. Afbakening van verder onderzoek	53
3.5.1. Analytische problemen	53
3.5.2. Reaktiemechanismen	54
3.5.3. Technologische aspecten	54
4. SYSTEMATISCHE ANALYSE VAN ROOKBESTANDDELEN	57
4.1. Monstername	57
4.2. Methoden voor de kwantitatieve analyse van rookwater	58
4.2.1. Bepaling van het totale gehalte aan carbonylverbindingen	58

4.2.2.	Hydroxy- en dicarbonylverbindingen	59
4.2.2.1.	Scheiding van osazonen.	59
4.2.2.2.	Scheiding van α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen	60
4.2.2.2.1.	Glyoxaal en glycolaldehyde	61
4.2.2.2.2.	Methylglyoxaal en acetol	62
4.2.2.2.3.	Dihydroxyaceton en glycerinealdehyde	63
4.2.2.2.4.	Diacetyl en acetoïne	64
4.2.2.3.	Spectrofotometrische bepaling van de verschillende osazonen in de elutie-vloeistof	65
4.2.2.4.	Analyse van enkele mengsels	65
4.2.2.4.1.	Glyoxaal, glycolaldehyde, methylglyoxaal en acetol	65
4.2.2.4.2.	Mengsel met diacetyl	66
4.2.2.5.	Nader onderzoek van osazonfrakties van uit rook afkomstige carbonylver-bindingen.	66
4.2.2.5.1.	Spectrografisch onderzoek	67
4.2.2.5.2.	Massaspectrografisch onderzoek	68
4.2.2.6.	Nabeschouwing	70
4.2.3.	Andere carbonylverbindingen	72
4.2.3.1.	Formaldehyde.	72
4.2.3.2.	Furfural	76
4.2.3.3.	Acetaldehyde.	78
4.2.3.4.	Aceton	79
4.2.4.	Fenolen	80
4.2.5.	Zuren	83
4.2.5.1.	pH.	83
4.2.6.	Bruining	83
4.3.	Beschrijving der analyseresultaten en konklusies	84
4.3.1.	Analyse van een aantal op dezelfde wijze verkregen rookwatermonsters	84
4.3.2.	Analyse van een aantal rookwatermonsters, uit verschillende rookinrich-tingen afkomstig.	85
4.3.3.	Verband tussen de hoeveelheid der opgevangen rookcomponenten en de dik-te van de absorberende waterlaag	87
4.3.4.	Veroudering van monsters rookwater.	89
4.3.5.	Vergelijking van onze resultaten met die van anderen	90
4.4.	Slotopmerkingen.	91
5.	NADER ONDERZOEK OMTRENT DE KLEURVORMING	92
5.1.	Gedrag van verschillende carbonylverbindingen ten opzichte van amino-groepen	92
5.1.1.	Gedrag van een aantal carbonylverbindingen ten opzichte van de vrije ami-nogroepen van viseiwitconcentraat	92
5.1.2.	Gedrag van een aantal carbonylverbindingen ten opzichte van glycine	93
5.1.3.	Veranderingen in rookwater na toevoeging van een aminoverbinding	94
5.1.4.	Bruining van mengsels van actieve carbonylverbindingen met glycine	96
5.2.	Gedrag van verschillende aminoverbindingen ten opzichte van rookwater	100
5.2.1.	Gedrag van rookwater ten opzichte van aminogroepen die aan een macro-molecuul zijn gefixeerd	102
5.3.	Invloed van reactieomstandigheden op de bruining.	103
5.4.	Reakties die aan de bruining ten grondslag liggen	105
5.4.1.	Onderzoek naar de reakties tussen aminogroepen en glycolaldehyde	105
5.4.1.1.	Onderzoek naar de eventuele rol van pyrrolderivaten bij de bruining van gly-colaldehyde met glycine.	106
5.4.1.2.	Verder onderzoek naar het verloop van de glycolaldehyde-glycinereactie	110
5.4.1.3.	Isolatie en identifikatie van een tussenprodukt uit de bruiningsreactie van glycolaldehyde met glycine c.q. andere aminoverbindingen	114

5.4.2.	Onderzoek naar de reacties tussen aminogroepen en methylglyoxaal . . .	121
5.4.3.	Onderzoek naar de reacties tussen aminogroepen, methylglyoxaal en glycolaldehyde	124
5.5.	Slotopmerkingen.	125
6.	MOGELIJKHEDEN VOOR DE BESTUDERING VAN DE ROL DER DISPERSE FASE BIJ DE KLEURVORMING	127
6.1.	Poging tot afscheiding van de disperse fase uit rook	127
6.2.	Analyse van neergeslagen rookdeeltjes. Vergelijking met de analyse van de totale hoeveelheid opgenomen rook	131
6.2.1.	Opvangen en analyseren van de disperse fase	131
6.2.2.	Opvangen van rook met behulp van een vochtig eiwitoppervlak	132
6.2.3.	Vergelijking tussen 'droog' en 'nat' opgevangen rook	133
6.3.	Onderzoek naar de bruining van de disperse fase van rook	134
6.4.	Onderzoek naar de rol van de disperse fase bij het roken in verschillende rookinstallaties	137
6.4.1.	Heet roken in de hang	137
6.4.2.	Koud roken in de tunnel	139
6.4.3.	Koud roken in een geconditioneerde rookkast	140
6.5.	Slotopmerkingen.	141
7.	SAMENVATTING	142
8.	SUMMARY	146
9.	LITERATUUR	150

1. ENIGE ASPEKTEN VAN HET ROOKPROCES, MET NAME VAN HET VISROKEN

1.1. INLEIDING

Het roken van levensmiddelen behoort tot de oudste vormen van conservering die wij kennen. Zeer vroeg reeds moet men hebben ontdekt dat het bederf van door jacht en visserij verkregen dierlijke levensmiddelen sterk kan worden vertraagd door ze geruime tijd te laten drogen boven een houtvuur. Ook werden deze levensmiddelen wel gedroogd door ze aan de zonnewarmte en eventueel de wind bloot te stellen, zoals dat in sommige streken nog steeds gebeurt. Niet altijd echter bood het klimaat daartoe de mogelijkheden; in die gevallen was men op het houtvuur aangewezen.

Eeuwenlang was het verkrijgen van beter houdbaar voedsel het enige doel van het rookproces. Tegen het einde van de vorige eeuw kwamen evenwel andere conserveringsmethoden in zwang, en geleidelijk aan is het accent, in plaats van op de houdbaarheid, steeds meer op de organoleptische eigenschappen van het gerookte produkt komen te liggen. In het bijzonder geldt dit voor de vleesindustrie. Bij de vervaardiging van sommige gerookte visprodukten, zoals bijvoorbeeld exportbokking, speelt de bescherming tegen microbieel bederf nog steeds een belangrijke rol.

De conserverende werking van het rookproces berust met name op de hierbij optredende uitdroging. Bij een aantal visprodukten levert het zouten of pekelen van de vis vóór het roken eveneens een belangrijke bijdrage tot de conservering. Voorts bevat rook conserverende bestanddelen, waarvan mierzuur, azijnzuur, benzoëzuur, bepaalde aldehyden en een aantal fenolderivaten met name worden genoemd (TILGNER, 1967). Het is niet geheel duidelijk in hoeverre deze stoffen tot de houdbaarheid van gerookte produkten bijdragen.

Wellicht van meer belang zijn de antioxidatieve eigenschappen van rook. Dit hangt overigens af van het te roken produkt: vette vis bijvoorbeeld is zeer gevoelig voor oxidatief bederf (het 'ranzig' of 'tranig' worden van de vis), een reactie die bovendien wordt gekatalyseerd door de aanwezigheid van zout. Het behandelen van deze vis met houtrook blijkt die reactie aanzienlijk te vertragen.

Over de organoleptische eigenschappen van gerookte produkten is gedurende de laatste tien à vijftien jaar vrij veel bekend geworden. Hoewel vaak is aangenomen dat de fenolen en de zuren uit rook voor aroma en smaak verantwoordelijk zijn (SHEWAN, 1949; TILGNER c.s., 1962a, c) wordt tegenwoordig ook gewezen op het belang van enkele carbonylverbindingen (diacetyl, vanilline) voor de aromavorming. Voor de kleurvorming op gerookte produkten worden als oorzaken genoemd: de eigen kleur van een aantal fenolen en carbonylverbindingen, oxidatieprodukten van fenolen, reacties tussen carbonylverbindingen en eiwitten (waarbij melanoidinen ontstaan) en caramelisatieprodukten van pentosen (TILGNER, 1967). In hoofdstuk 2 wordt nader ingegaan op reeds verricht onderzoek op het gebied van aroma- en kleurvorming.

Sinds het roken niet meer in de eerste plaats wordt uitgevoerd met het doel,

een beter houdbaar produkt te verkrijgen, wordt door de consument steeds meer naar licht gerookte produkten gevraagd. Voor wat betreft de vis heeft men hierbij merkwaardigerwijze wél zijn eisen ten aanzien van een duidelijke rookkleur gehandhaafd. Met name in de Angelsaksische landen heeft dit ertoe geleid dat men deze produkten vóór het roken met een kleurbad ging behandelen (CUTTING, 1945, 1955; ANON., 1952; BURGESS c.s., 1965a).

1.2. STATISTISCHE GEGEVENS OVER DE PRODUKTIE VAN GEROOKTE VIS

Over de wereldproduktie van gerookte vis geven de tabellen I en II enige informatie. Deze zijn ontleend aan het Yearbook of Fishery Statistics van de Food and Agricultural Organisation (1963, 1964, 1966).

BORGSTROM (1962) wijst er op, dat ook rekening dient te worden gehouden met de aanzienlijke hoeveelheden vis, die bij primitieve volken worden gerookt.

In de Verenigde Staten rookt men veel zoetwatervis, met name zalm. De produktie van Canada bestaat voor een groot gedeelte uit gerookte kabeljauwfilets. Ook in Polen wordt kabeljauw gerookt en daarnaast vrij veel sprout. In Zuid-Afrika is het de heek, een magere vis, die in grote hoeveelheden wordt gerookt. In de Sovjet-Unie wordt veel 'balik' bereid, een gerookt visprodukt met als grondstoffen zalm en steur.

Duidelijk blijkt, dat de haring bij het roken nog steeds een belangrijke rol speelt, zij het dan in aanzienlijk mindere mate dan twintig jaar geleden.

Uit deze tabellen blijkt ook, dat Nederland verhoudingsgewijze veel gerookte vis produceert. Overigens is het gedeelte van de alhier aangevoerde vis dat wordt gerookt, niet zeer groot: naar schatting ongeveer 10 procent.

De rokerijen in ons land zijn voor het merendeel zeer kleine bedrijven. In 1966 bezaten wij 112 producerende visrokerijen, waarin 462 personen, inclusief de meewerkende eigenaren, werkzaam waren. In dit jaar werd ongeveer 20.000 ton vis verwerkt en voor 32.000.000 gulden aan gerookt produkt verkocht (gegevens van het Bedrijfschap voor de groothandel in vis en aanverwante bedrijven).

TABEL I. Wereldproduktie van gerookte haring, in duizenden tonnen

	1948	1958	1960	1962	1963	1964	1965	1966
België		1,3	2,2	1,3	1,5	1,5	1,5	2,6
Denemarken	4,0	1,7	1,6	1,6	1,4	1,9	2,0	1,7
Duitse Bondsrep.		13,2	15,0	15,6	17,7	15,5	12,3	12,0
Groot-Brittannië	76,4	19,4	14,9	12,3	12,5	27,6	22,1	20,7
Ierland	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
Nederland	18,0	9,8	9,6	9,0	10,0	9,4	7,5	7,5
Noorwegen	2,2	3,9	5,9	3,4	2,3	2,5	2,0	2,8
Polen		4,7	5,8	6,2	5,7	6,6	7,9	10,4
Zweden	0,7	1,1	1,0	0,9	0,8	1,5	1,0	1,0
Canada	6,0	4,5	3,2	3,1	4,3	4,6	6,5	5,1
Verenigde Staten		0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	
Totaal	120	60	60	54	57	72	63	65

TABEL II. Wereldproductie van gerookte vis (met uitzondering van haring), in duizenden tonnen

	1948	1958	1960	1962	1963	1964	1965	1966
België		1,7	1,7	2,2	2,0	2,3	2,3	1,2
Denemarken	2,8	2,1	2,4	1,6	1,8	3,3	3,6	3,7
Duitse Bondsrep.		17,3	15,0	12,1	11,4	12,6	16,4	17,0
Groot-Brittannië	60,8	4,4	5,9	5,5	4,8	4,8	6,2	5,5
Nederland		6,4	8,7	9,1	10,7	11,8	11,8	12,2
Noorwegen		0,0	0,6	0,9	1,1	0,8	1,2	
Polen		7,5	9,9	11,5	12,8	13,6	16,0	15,0
Sovjet-Unie ¹	43,4	82,7	90,7	83,6	85,3	95,4	100,7	104,5
Zweden	0,6	0,8	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	0,5
Canada	5,2	2,7	2,3	2,1	2,2	2,2	3,4	4,6
Verenigde Staten		15,3	13,6	14,5	11,3	12,3	14,3	
Zuid-Amerika	0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2
Zuid-Afrika		23,0	27,1	26,7	26,1	26,0	26,0	26,0
Sierra Leone				8,0	7,6	8,0	8,0	10,0
Japan	2,1	4,5	7,4	8,6	11,3	9,1	8,6	6,4
Philippijnen		10,8	11,4	11,2	12,0	12,5	13,9	14,4
Thailand	2,3	4,9	4,9	5,2	8,7	9,6	12,2	14,1
Totaal	150	188	204	205	212	228	248	253

¹ gedeeltelijk gedroogde vis

Een gedeelte van onze gerookte vis wordt geëxporteerd; tabel III geeft hierover enige gegevens.

TABEL III. Export van gerookte vis uit Nederland

	1958	1960	1962	1963	1964	1965	1966
Gerookte haring, in duizendtallen tonnen	2,5	4,7	3,7	4,0	3,4	3,3	2,3
waarvan naar België en Luxemburg	0,7	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
Duitse Bondsrep.	0,4	0,9	0,9	0,9	1,1	1,1	0,9
Egypte	0,1	0,4	—	—	—	—	—
Griekenland	1,0	1,9	2,1	2,4	1,5	1,5	0,9
Italië	—	0,9	0,1	—	0,1	—	—
Opbrengst in duizenden guldens	2583	5085	4386	5298	4184	4500	3674
Gerookte paling, in duizendtallen tonnen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3
Opbrengst in duizenden guldens	389	623	727	877	1166	1530	1835

1.3. KOUD EN HEET ROKEN

De meest gebruikelijke wijzen van visroken kunnen worden ingedeeld in twee grote groepen: het koud roken en het heet roken.

Bij het koude rookproces wordt in het algemeen langdurig gerookt, terwijl de temperatuur een waarde van 28° niet overschrijdt. Het heet roken neemt veel minder tijd in beslag; de rooktemperatuur bereikt echter waarden van 80° tot 100°.

1.3.1. *Koud roken*

De koud gerookte visprodukten kunnen in twee groepen worden verdeeld: de groep die na het roken direkt voor consumptie geschikt is, en de groep die dat niet is en eerst nog gebakken of gekookt dient te worden. Deze laatste groep, waartoe onder meer de in Engeland populaire 'kippers' behoren, wordt in ons land vrijwel niet geproduceerd en zal hier verder niet worden besproken.

Bij de andere groep van koud gerookte visprodukten gaat men uit van gezouten vis. Het zout heeft niet alleen een conserverend effect, maar bewerkstelligt tevens een verandering (denaturatie) van de spiereiwitten, waardoor ze consumabel worden. Dit effect duidt men, in navolging van onze Oosterburen, doorgaans aan met de term 'zoutgaar worden'.

Vóór het roken wordt een groot gedeelte van dit zout weer verwijderd door de vis te spoelen met water (het zogenaamde uitversen). De mate waarin wordt uitgeverst hangt onder meer af van de gewenste houdbaarheid. Indien men exportbokking, die geruime tijd houdbaar moet zijn, wenst te bereiden, wordt slechts kort uitgeverst; bij bokking die voor de binnenlandse markt is bestemd en minder lang houdbaar behoeft te zijn, wordt veel meer zout door spoelen verwijderd.

De gezouten vis wordt nu enige tijd voorgedroogd, waarna het eigenlijke roken kan beginnen. Dit geschiedde vanouds – en nog vaak – in vrij grote, hoge ruimten, op de bodem waarvan zich een smeulend houtvuur bevindt, dat voor de benodigde rook zorgt. Het materiaal voor dit vuur bestaat uit houtkrullen ('mot'), die worden afgedekt met een hoeveelheid zaagsel. Het zaagsel zorgt ervoor dat het vuur blijft smeulen; bij een snelle verbranding zou de rookproductie gering zijn, terwijl bovendien teveel warmte zou vrijkomen. In figuur 1 is een zeer ouderwetse vorm van de traditionele rookkamer of 'hang' afgebeeld.

De temperatuur mag tijdens het roken beslist niet hoger komen dan 30°, daar boven deze waarde een verdere denaturatie van de spiereiwitten optreedt, die resulteert in het papperig worden van de vis, een korrelige structuur van het spierweefsel en een drastische vermindering der houdbaarheid. Men noemt dit verschijnsel 'verbroeien'. Ook verliest het bindweefsel zijn stevigheid, waardoor de vissen zeer zacht worden.

De duur van het rookproces kan variëren van enkele uren tot enkele dagen. Met name het koud roken van zalm en van de reeds genoemde exportbokking vergt een zeer lange tijd.

Het spreekt vanzelf, dat het roken in deze ouderwetse rookkamers een bijzonder moeilijk te controleren proces is, waarbij het met name lastig is om een geschikte temperatuur te handhaven. Zelfs onberekenbare factoren als bijvoor-

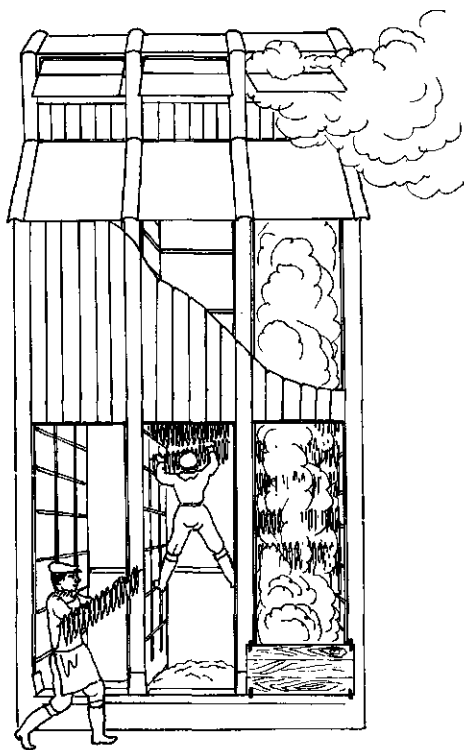


FIG. 1. Een traditionele rookhang

beeld de weersomstandigheden kunnen een aanzienlijke rol spelen.

Het is daarom niet verwonderlijk dat, vooral na de tweede wereldoorlog, het gebruik van een rooktunnel steeds meer ingang vond. Een goed voorbeeld van een rooktunnel is de in 1939 in Schotland ontworpen 'Torry Kiln' (figuur 2). De rook wordt hier ontwikkeld in een los van de eigenlijke tunnel staande rookkast, vanwaar de rook via een pijp naar de tunnel wordt geleid, en daar met behulp van een ventilator wordt ingeblazen. Voor de ventilator wordt de rook vermengd met een hoeveelheid lucht. Het rook-luchtmengsel passeert nu de tunnel, waarin zich de te roken vis bevindt, en verlaat deze via een schoorsteen. Een gedeelte echter wordt andermaal door de tunnel geleid, nadat het is vermengd met een hoeveelheid vers rook-luchtmengsel. Het is op deze wijze mogelijk, de temperatuur in de tunnel en de snelheid waarmee de rook over de vis strijkt, goed te reguleren.

Evenals in de hang wordt de vis in de tunnel doorgaans aan ijzeren staven (speten) geregen en zo gerookt. Doordat de rookbeweging hier horizontaal is, bestaat echter ook de mogelijkheid om de vis liggend te roken; hiervoor worden zg. horren gebruikt.

Hoezeer het koud roken een droogproces is blijkt bijvoorbeeld hieruit, dat bij het roken van 100 kg haring tot spekbokking ongeveer dertig kg water moet

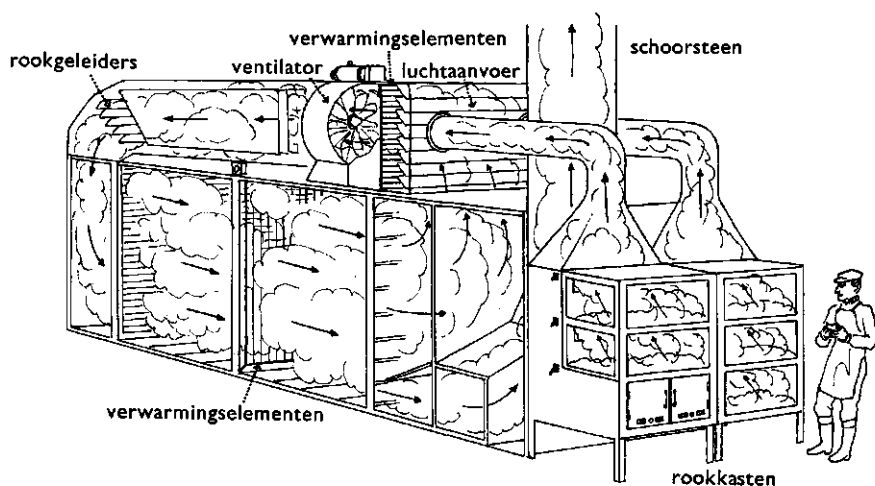


FIG. 2. Opengewerkte tekening van de 'Torry kiln' (naar BURGESS c.s.).

worden verdampt! Kennis aangaande de droogcondities is dan ook van groot belang voor de optimalisering van het koudrookproces.

Bij het drogen zijn met name de relatieve vochtigheid, de snelheid en de temperatuur van de lucht c.q. rook van belang. VAN MAMEREN (1958) noemt als maximale luchtsnelheid tijdens het voordrogen 1 m/sec, en neemt verder, op grond van een aantal waarnemingen, aan dat de optimale relatieve vochtigheid tussen 50 en 60% ligt. Een hogere luchtsnelheid of een lagere relatieve vochtigheid veroorzaakt een te snelle oppervlakedroging, waardoor het diffunderen van vocht uit het spierweefsel naar de oppervlakte wordt bemoeilijkt. Men zegt dan dat de vis 'dichtslaat'. Bedriegelijk is hierbij dat de vis aan de buitenzijde de indruk geeft, zeer droog te zijn; doordat het vochtgehalte in werkelijkheid echter vrij hoog is, zal een dergelijk produkt eerder bederven dan vis, die op de juiste wijze is voorgedroogd. Bovendien blijkt dichtgeslagen vis tijdens het roken moeilijk rookbestanddelen op te nemen. Ook de kleurvorming op het oppervlak blijft achter.

Een te hoge relatieve vochtigheid vertraagt het droogproces uiteraard ook; in extreme gevallen heeft men wel waargenomen dat de vis al enigermate ging bederven tijdens het drogen.

Versnelling van het droogproces door verhoging van de temperatuur is gelimiteerd vanwege de boven 30° optredende verbroeiing. In de praktijk streeft men er dikwijls naar, juist iets onder die temperatuur te blijven.

Na het passeren van de min of meer natte vis zal de relatieve vochtigheid van de lucht zijn toegenomen. De vis achterin de tunnel zal daardoor wat later droog zijn, zodat de kans bestaat dat geen uniform eindprodukt wordt verkregen. Het heeft daarom zin, de partijen vis voor en achterin de tunnel een of meer malen te verwisselen. Op zeer elegante wijze geschiedt dit in de zg. carous-

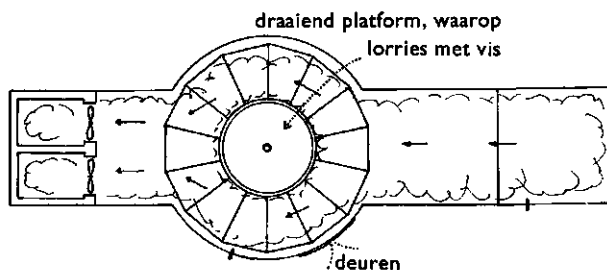


FIG. 3. Carroussel-rooktunnel (naar SCHOONENS). Boven-aanzicht.

sel-rooktunnel (SCHOONENS, 1949; zie figuur 3), waarvan er een paar in ons land in bedrijf zijn.

In de tunnel bevindt zich een platform dat langzaam ronddraait en waarop lorries met vis kunnen worden gereden. Elke lorie krijgt op deze wijze dezelfde behandeling.

In Duitsland zijn soortgelijke opstellingen ontwikkeld (SCHRÖTER, 1958), waarbij zelfs een luchtschommelachtig type, dus met een horizontale as (THOMBANSEN en SCHRÖTER, 1958). In het algemeen echter wordt van dit principe toch niet veel gebruik gemaakt. Uiteraard krijgt een dergelijke installatie pas zijn waarde indien het rookproces op zich een behoorlijke mate van reproduceerbaarheid bezit.

Is het in Nederland met name de haring, die koud wordt gerookt, in het buitenland wordt ook het roken van magere vis veelvuldig toegepast; een voorbeeld hiervan is de in Engeland populaire 'finnan haddock' (licht gerookte en gezouten schelvis, die, evenals de kipper, voor het consumeren nog moet worden toe bereid).

1.3.2. Heet roken

Het heet of warm roken, ook wel stomen genoemd, wordt in Nederland, behalve op haring, vooral ook op makreel toegepast. Paling wordt eveneens in grote hoeveelheden heet gerookt en levert dan een uitgezochte delicatessie op.

Het heetrookproces heeft met het koudrookproces de hulpstof rook gemeen, doch verschilt er verder sterk van. Hoewel ook tijdens het heet roken het vochtverlies aanzienlijk kan zijn, blijkt de houdbaarheid van deze produkten betrekkelijk gering; de hoofdoorzaak hiervan ligt in de lage zoutconcentratie, terwijl de door het verhitten totaal veranderde structuur der eiwitten eveneens een rol zal spelen. Het heet roken geschiedt nog veelvuldig in de traditionele hang, hoewel ook voor dit proces tunnels bestaan; een recent voorbeeld is de heetrooktunnel van DEFLOOR (1967).

Evenals bij het koudrookproces wordt het uitgangsmateriaal – op smaak gezouten vis – eerst voorgedroogd. Dit geschiedt boven kleine vuurtjes die betrekkelijk weinig rook doch veel warmte ontwikkelen. Voor haring of makreel bedraagt de droogtijd ongeveer twee uur, waarbij de rooktemperatuur geleidelijk oploopt tot 70 à 80°. De temperatuur in het inwendige van de vis komt niet veel hoger dan 40 à 50°.

Teneinde het oplopen van de droogtemperatuur beter in de hand te houden wordt wel gasverwarming toegepast. Voorstellen in die richting dateren reeds van 1932 (WINDEL). Als nadeel wordt genoemd, dat de huid van de vis de gewenste leerachtige consistentie zou missen indien is gedroogd door middel van gasverwarming. Door aan de verbrandingsgassen van het houtvuur looiende eigenschappen toe te schrijven, is dit verschijnsel mogelijk te verklaren. Weliswaar wordt de vis bij het roken alsnog aan deze looiende stoffen blootgesteld, doch daar de huid inmiddels aanzienlijk is uitgedroogd, zouden veel minder van deze stoffen kunnen worden opgenomen.

Het eigenlijke roken, dat nu volgt, neemt, althans voor haring en makreel, nog eens twee uur in beslag. Ook hier wordt weer gebruik gemaakt van een smeulend houtvuur dat uit mot en zaagsel is opgebouwd. De rooktemperatuur loopt op tot ongeveer 85°, doch de temperatuur in de vis komt praktisch nooit boven 60°, mede als gevolg van de verdamping van water aan de oppervlakte.

Bij makreel bedraagt het gewichtsverlies tijdens het drogen 12% en tijdens het roken 8%, terwijl het gewicht gedurende het afkoelen tot kamertemperatuur nog eens met 5% vermindert. Voor het stomen van 50 kg makreel is ongeveer 3 kg mot en 1½ kg zaagsel benodigd (VAN MAMEREN, 1958).

Het heet roken van paling is een enigszins anders verlopend proces. Paling krijgt een zeer rigoureuze warmtebehandeling, waarbij de temperaturen in de rookhang tot ver boven 100° kunnen oplopen. Soms leidt men, in het begin van het proces, stoom in de kast om een betere warmteoverdracht te verkrijgen. Voor een uitvoerige beschrijving van het palingroken wordt verwezen naar de dissertatie van VAN DEN BROEK (1948).

In tabel IV is een overzicht opgenomen van een aantal gerookte produkten, met daarbij een aantal gegevens omtrent de bereidingswijze, de samenstelling van het produkt en de houdbaarheid.

Behalve in ons land is het heet roken vooral in Duitsland populair en voorts ook in Denemarken en Zweden. Het koud roken is het meest gebruikelijke proces in Engeland, Noord-Amerika, Noorwegen en Frankrijk (SHEWAN, 1945), en de Oosteuropese landen.

1.4. ROOKONTWIKKELING

1.4.1. *Verschillende houtsoorten als rookbron*

De keuze van de houtsoort die voor het roken wordt gebruikt, hangt doorgaans af van wat er ter plaatse verkrijgbaar is, en van de persoonlijke smaak van de roker.

In verscheidene verhandelingen over de praktijk van het roken vindt men vermeld, dat hierbij slechts harde houtsoorten bruikbaar zijn. Volgens WILLE (1949) is voor het roken van vis in beginsel alleen loofhout geschikt en beslist geen naaldhout. Als oorzaak van de ongeschiktheid van naaldhout noemt hij het hoge harsgehalte, waardoor het gerookte produkt een „onmogelijke” smaak verkrijgt. Onder de vele loofhoutsoorten verdienen de harde soorten, in het bijzonder beukehout, de voorkeur; ook elze-, eike- en berkehout zijn geschikt. Hout van

TABEL IV. Fabrikage, samenstelling en houdbaarheid van verschillende gerookte produkten (naar VAN MAMEREN)

Produkt	Samenstelling		Grondstof	Fabrikage	Houdbaarheid bij kamer-temperatuur
	Vet	Vocht			
Gestoomde bokking	15-20%	50-60%	verse, vrij vette, dichte haring	licht zouten in pekkel 2 uur drogen tot 70° 2 uur roken tot 85° als bij gestoomde bokking	2 tot 3 dagen
Gestoomde makreel	7-12%	55-65%	verse, vrij vette opengesneden makreel		2 tot 3 dagen
Gerookte paling	15-25%	50-55%	levende paling	laten doodkruipen in zout opensnijden en schoonmaken 5-15 min. voordrogen bij hoge temperatuur 50 min. roken bij 80-90° licht zouten in pekkel 1 uur drogen bij 30° 5 uur roken bij 35° 40 uur ontzouten in water 5 uur drogen bij 30° 15 uur roken bij 25-30° 8 uur ontzouten in water 3 dagen roken bij 25-30°	3 tot 4 dagen
Kippers	15-20%	50-60%	verse, liefst vette gefileerde haring		3 tot 4 dagen
Spekbokking	15-20%	50-55%	steurharing ¹ , liefst vol en vet		7 tot 10 dagen
Exportbokking	20-25%	40-45%	steurharing		meer dan 6 maanden

¹ Zwaar gezouten haring met ca. 13% zout en 50-55% vocht

de jeneverbesstruik geeft een zeer pikante smaak aan het produkt. Eveneens bruikbaar is populiere- of kastanjehout en hout van vruchtbomen.

SHEWAN (1945) rookte schelvis met behulp van verschillende houtsoorten, waaronder enige soorten naaldhout, meest van Amerikaanse herkomst, en verkreeg verreweg het beste produkt met eikehout. Hierbij moet echter worden vermeld dat houtsoorten als beuke- of berkehout ontbraken in zijn experiment.

In hetzelfde artikel verwijst Shewan ook naar een Canadese publikatie (SIDAWAY, 1944), waarin wordt gesteld dat de aard van de gebruikte houtsoort weinig invloed heeft op het aroma van de gerookte vis, dat veel meer afhangt van de kwaliteit van het uitgangsprodukt en de condities in de rookkast.

TILGNER (1958) vermeldt, dat vele rokerijen zaagsel van zachte houtsoorten gebruiken (vermoedelijk zijn coniferen bedoeld) en dat dit nimmer aanleiding geeft tot klachten over een hars- of terpentijnachtige smaak. Met zachte houtsoorten wordt altijd een beter gekleurd produkt verkregen.

Ook Tilgner onderzocht de organoleptische kwaliteiten van met verschillende houtsoorten gerookte produkten, waarbij op kleur, reuk en smaak werd gelet. De beste resultaten werden verkregen met ahorn-, eike- en beukehout, en bijna even goede met denne-(!) en berkehout. Iets minder goed voldeden elze-, linde- en espehout, terwijl hout van de spar als de minst geschikte (maar altijd nog acceptabele) soort uit de bus kwam. De onderlinge spreiding in de beoordelingen was overigens, ten opzichte van deze verschillen, zeer groot.

De verschillende beoordelingen ten aanzien van het gebruik van naaldhoutsoorten zijn wellicht te verklaren door het zeer uiteenlopende harsgehalte van naaldhout. Dennehout is soms nagenoeg harsvrij, maar bij andere soorten druipet de hars vaak op vele plaatsen uit het hout.

In dit verband moet overigens worden opgemerkt, dat eventuele verschillen in smaak en aroma direkt na het roken het duidelijkst worden waargenomen. De organoleptische eigenschappen veranderen daarna nog vrij sterk, waarbij niet al te grote verschillen tussen de produkten onderling blijken te vervagen of zelfs te verdwijnen.

In ons land wordt naaldhout („vurehout“) veelvuldig gebruikt bij het roken van vis, zie 1.4.2.1. Eikehout vindt eveneens toepassing, doch steeds met andere houtsoorten vermengd, onder andere omdat men van mening is dat rook, alleen van eikehout afkomstig, het produkt te zuur maakt. Bovendien is de kans, dat zuiver eikezaagsel wordt betrokken, niet zeer groot. BURGESS c.s. (1965b) wijzen er op, dat hetgeen als eikezaagsel wordt verkocht, soms in 't geheel geen eikehout bevat.

Overigens wordt volgens TILGNER (1958) ook in Engeland veel gebruik gemaakt van zachte houtsoorten, CUTTING daarentegen beweert dat harde houtsoorten in het algemeen worden verkozen boven zachte (1965).

In Noord-Amerika wordt dikwijls gerookt met notehout („hickory“) en ook met ahornhout. In Oost-Europa wordt veel van beukehout gebruikt gemaakt.

1.4.2. Rookontwikkelaars

1.4.2.1. Het conventionele houtvuur

Zoals in 1.3.1 werd vermeld, bestaat het materiaal voor het conventionele houtvuur uit krullen en zaagsel. De krullen en schilfers, de zg. mot, zijn doorgaans van vurehout afkomstig. Een laag zaagsel, meestal eikezaagsel of wat er voor doorgaat, die over de mot wordt uitgespreid, zorgt er voor dat de lucht niet onbeperkt kan toetreden, zodat het vuur blijft smeulen. Als afdek materiaal gebruikt men ook wel de resten van een oud vuur, die dan vooraf met water worden bevochtigd (dempsel'). Sommige palingrokers maken gebruik van smeulende houtblokken.

In de traditionele rookkasten, de zg. hangen, beweegt de rook zich langzaam naar boven en ontwijkt, na de vis te zijn gepasseerd, via een schoorsteen.

Indien men gebruik maakt van een tunnel wordt de rook in een aparte kast ontwikkeld. Deze is door een pijp met de tunnel verbonden. In de kast bevindt zich nog een opening voor valse trek, waardoor een luchtstroom ontstaat die de ontwikkelde rook met zich meevoert (zie figuur 4).

Het vochtgehalte van het gebruikte hout kan een rol spelen in de kwaliteit van het eindprodukt. TILGNER, ZIEMBA en DJU-HAK-DJU (1962) vonden, dat vochtgehaltes van 20 tot 35% tot het beste produkt leiden. Bij hogere vochtpercentages ontstaat 'vuile' rook (rook met veel grove deeltjes), die het produkt een slecht uiterlijk geeft en bovendien zeer veel zuur bevat. Te droge rook bevat onvoldoende bestanddelen die de vereiste kleur, geur en smaak aan het produkt geven.

In Nederland wordt vrijwel uitsluitend het conventionele houtvuur toegepast bij het roken van vis. De nadelen van deze wijze van rookontwikkeling (discontinue rooktoevoer, oncontroleerbaar en onreproduceerbaar verloop van het verbrandingsproces) en enige onprettige eigenschappen van de brandstof (groot volume, zeer brandbaar, sterk besmet met schimmelsporen) wegen nog niet zo

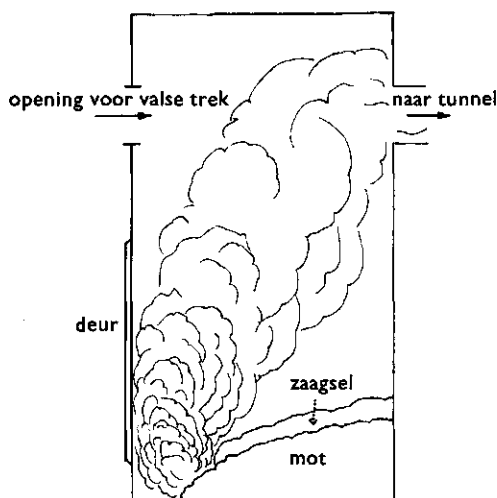


FIG. 4. Schema van een conventionele rookontwikkelaar.

zwaar dat men een sterke behoefte voelt, de rook op een meer elegante wijze te gaan ontwikkelen. Het benodigde houtafval is bovendien goedkoop, hoewel de prijs gedurende de laatste jaren sterk is gestegen als gevolg van ontstane mogelijkheden voor de verwerking van houtafval (spaanplaten!).

In de vleesindustrie echter begint het gebruik van moderne rookontwikkelaars in zwang te komen. Enige typen zullen hier worden besproken.

1.4.2.2. Gemechaniseerde rookontwikkelaars

Een van de bekendste mechanische rookontwikkelaars is die van de Noorse constructeur HALFDAN OLSEN (1955). Deze bestaat in hoofdzaak uit een zeer langzaam ronddraaiende schijf waarin zich een aantal verbrandingskamers bevindt (figuur 5). Via een vultrechter worden de verbrandingskamers een voor een met houtspaanders (beuke- of eikehout) gevuld. Ze worden vervolgens met behulp van een op lage spanning werkend gloeielement aangestoken, waarna de inhoud van de kamer langzaam van buiten naar binnen verbrandt, als bij een pijp. De rook wordt door middel van een ventilator afgezogen via de ruimte binnenin het schoepenrad. Daar het rad doordraait, worden de verbrandingskamers na verloop van enige tijd weer automatisch geleegd. Het probleem van de asverwijdering is hiermee op simpele wijze opgelost.

Met behulp van deze generator is een beheersing van de rookontwikkeling tot op zekere hoogte mogelijk. Een nadeel van het systeem is de neiging tot

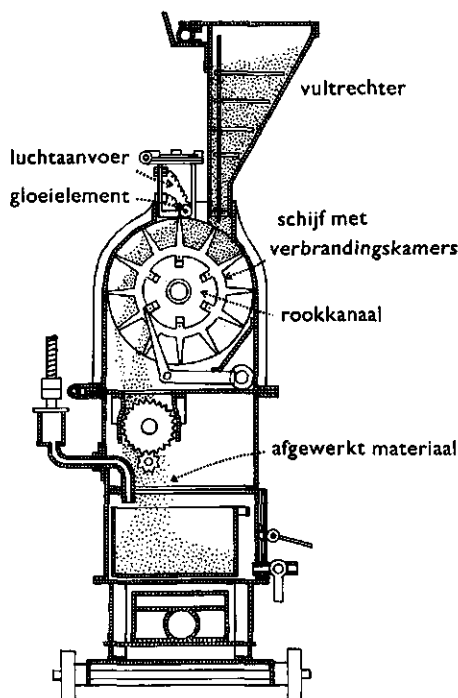


FIG. 5. Schema van de rookontwikkelaar volgens HALFDAN OLSEN.

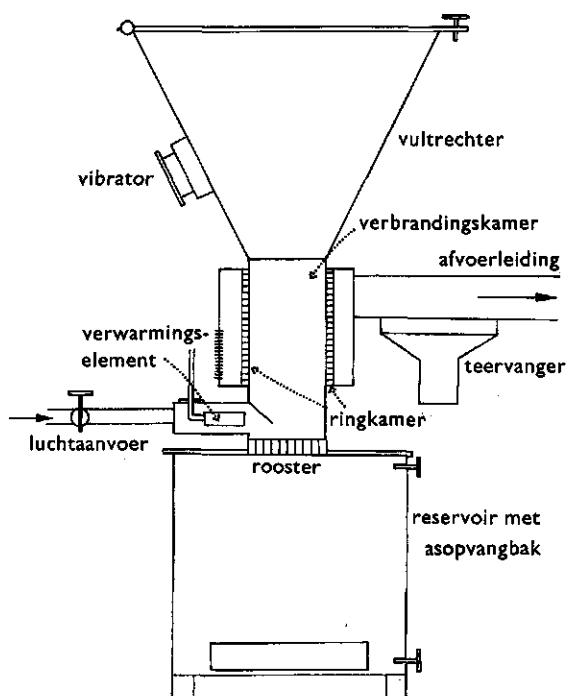


FIG. 6. De rookontwikke-
laar van MITTELHÄUSER en
WALTER.

vastlopen van de draaiende delen door as- en teeraanslag; de rookontwikkelaar vereist daardoor veel onderhoud.

Dit nadeel vervalt bij de 'Hansamatic'-generator van MITTELHÄUSER EN WALTER (1965). De houtspaanders worden hier in een verbrandingskamer gebracht (zie figuur 6), waardoor lucht wordt gevoerd die met behulp van een verwarmingselement op hoge temperatuur wordt gebracht. De houtspaanders gaan hierdoor smeulen, waarbij de geproduceerde rook via een aantal openingen uit de verbrandingskamer in een ringvormige kamer wordt geleid en van daar naar een afvoerbuis. De teer zou worden verwijderd door een in de afvoerbuis geplaatste teervanger.

Een vibrator in de vultrechter zorgt ervoor dat de verbrandingskamer steeds met houtspaanders gevuld blijft. De afgewerkte spaanders komen via een rooster in een asopvangbak terecht.

Dit type rookontwikkelaar wordt in de vleesrokerijen steeds meer toegepast.

Er bestaan nog enkele andere rookontwikkelaars waarbij de klassieke wijze van rookontwikkeling, nl. door middel van een smeulend houtvuur, in meerdere of mindere mate is gemechaniseerd. Deze zullen hier verder niet worden besproken. Wel dient nog te worden verwezen naar een overzicht van het gebruik van rookinstallaties bij de bereiding van vleesprodukten (TE WECHEL, 1968).

Een geheel andere tendens in de bouw van rookgeneratoren is het streven naar het verkrijgen van 'rook zonder vuur'; hiertoe is men vooral gekomen vanuit de (juiste) redenering dat een proces als het langzaam verbranden van hout nimmer

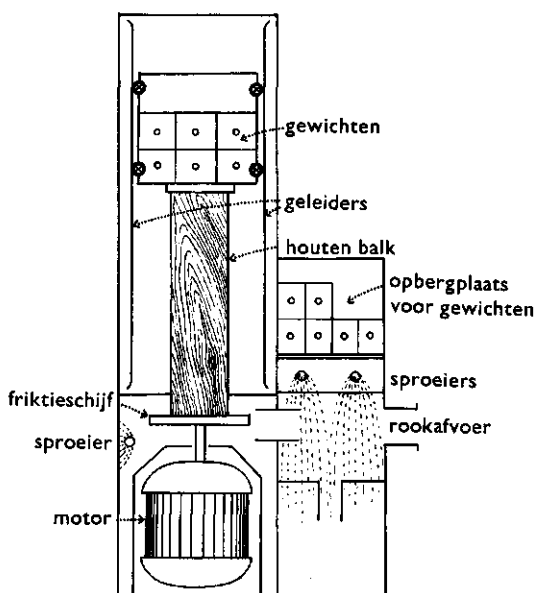


FIG. 7. Wrijvingsrookontwikkelaar volgens RASMUSSEN en SPIEHS (naar TILGNER).

volledig zal kunnen worden beheerst. Daarnaast moeten uiteraard economische motieven worden genoemd.

Als belangrijkste vertegenwoordiger van dit genre moet de wrijvingsrookontwikkelaar worden beschouwd. De gedachte om door wrijvingswarmte rook te ontwikkelen, is afkomstig van de Amerikaan H. RASMUSSEN (ANON., 1956a, b). Hij construeerde een apparaat (zie figuur 7), waarin een houten balk tegen een snel ronddraaiende (1750 r.p.m.) schijf wordt gedrukt. Deze schijf is voorzien van acht messen, die langs het hout schrapen en zo een grote hoeveelheid warmte ontwikkelen, waardoor rook ontstaat. De rookproductie kan worden geregeld door wijziging van de hoeveelheid gewichten waarmee de balk tegen de schijf wordt gedrukt. Ter voorkoming van roetaanslag wordt langs de wanden van de rookontwikkelaar water gespreeid. Ook de rook wordt nog gewassen om teeraanslag te voorkomen, terwijl ze hierbij tevens wordt gekoeld. Overigens kan men zich afvragen of op deze wijze geen aanzienlijke hoeveelheid nuttige rookbestanddelen wordt weggewassen.

Een groot voordeel van deze wijze van rookontwikkeling is, dat men er op elk gewenst moment onmiddellijk mee kan stoppen. Verder is slechts weinig ruimte nodig voor de opslag van het benodigde materiaal. Dat houten balken aanmerkelijk duurder zijn dan zaagsel of ander houtafval, zou ruimschoots worden goedgemaakt door de veel grotere rookopbrengst per gewichtshoeveelheid hout (HUSAINI en COOPER, 1957).

De horizontale friktieschijf heeft volgens TILGNER (1958) het nadeel, dat de buitenkant van de schijf een grotere (omtreks)snelheid heeft dan de meer naar binnen gelegen delen, hetgeen de kwaliteit van de rook zijns inziens ongunstig

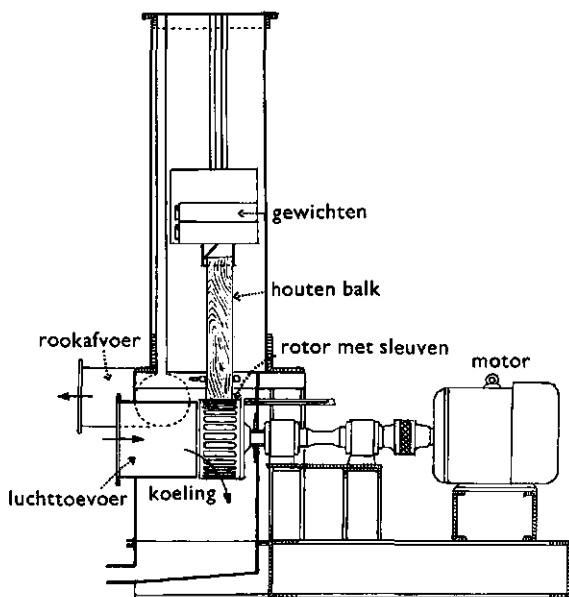


FIG. 8. Wrijvingsrookontwikkelaar volgens ADAM.

beïnvloedt. Dit nadeel doet zich niet voor bij een Tsjechoslowaakse wrijvingsrookontwikkelaar (ADAM, 1960), waar een rotor om een horizontale as draait (figuur 8).

Ondanks de afschrapende werking van de horizontale friktieschijf kan op het hout een zeer harde koollaag ontstaan, die verdere rookontwikkeling sterk bemoeilijkt. Dit verschijnsel doet zich overigens ook wel voor bij het Tsjechoslowaakse type. Knoesten in het hout kunnen de rookontwikkeling eveneens bemoeilijken. Om deze redenen is het de vraag of het geclaimde voordeel van een konstante rookontwikkeling in de praktijk inderdaad haalbaar is. Een onaangename eigenschap van met name de Tsjechoslowaakse generator is nog de zeer grote hoeveelheid lawaai die door dit toestel wordt geproduceerd.

Ondanks deze bezwaren schijnt de wrijvingsrookontwikkelaar toch enige industriële toepassing te hebben gevonden, en wel in de Verenigde Staten (MEYBOOM, 1966) en in Tsjecho-Slowakije (FOSTER, 1959).

De rook van een wrijvingsrookontwikkelaar zou zeer bruikbaar zijn voor de vervaardiging van zg. frankfurters (WEIR, 1957; WEIR c.s., 1962). Bij het behandelen van haringfilets met wrijvingsrook bleken nogal aanzienlijke verschillen op te treden ten opzichte van normaal gerookte filets (MEYBOOM en VAN MAMEREN, 1962). Bij latere experimenten in het Instituut voor Visserijprodukten was dit verschil echter weer nauwelijks significant.

Zij nog vermeld dat de wrijvingsrook zelf duidelijk anders is dan de op gebruikelijke wijze ontwikkelde rook. De geur wordt door sommigen als een 'schroeilucht' omschreven en herinnert maar ten dele aan die van verbrand hout. Ook is wrijvingsrook witter dan rook van een smeulend houtvuur.

Het principe 'rook zonder vuur' is eveneens gehanteerd door D. L. Nicol van het Humber Laboratory te Hull, die de zg. fluïdisatierookgenerator (NICOL, 1960; NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, LONDON 1965) ontwikkelde (zie figuur 9). Deze bestaat uit een fluïdisatiekamer, die voor ongeveer een derde wordt gevuld met tevoren gezeefd zaagsel. Elektrisch verhitte lucht wordt met een bepaalde snelheid door het zaagsel geblazen. De zaagseldeeltjes worden door de luchtstroom meegenomen en in een gefluïdiseerde toestand gehouden, hetgeen wil zeggen dat zij aan twee gelijke doch tegengestelde krachten onderhevig zijn en derhalve blijven zweven. De zaagseldeeltjes verkolen in de hete (350°) luchtstroom, waarbij zij rook vormen. De dichtheid van de deeltjes neemt hierbij geleidelijk af, totdat ze door de gasstroom worden meegenomen naar de afscheider. Van hier gaat de rook naar de tunnel, terwijl de verkoolde deeltjes in een reservoir onder de afscheider terechtkomen.

In tegenstelling tot de wrijvingsrookontwikkelaar is de fluïdisator speciaal met het oog op het roken van vis ontwikkeld, hoewel ook bij het roken van bacon goede resultaten zijn verkregen (NICOL, 1960). Het verbruik aan zaagsel zou slechts 25% van de bij een klassieke rookbron benodigde hoeveelheid bedragen. Industriële toepassing heeft deze generator echter (nog) niet gevonden.

De mogelijkheden voor het verkrijgen van rook uit hout beperken zich niet tot de hier besproken systemen. Eén zeer recent voorbeeld moge nog worden genoemd, en wel de rookgenerator van FESSMANN (1966). Op het eerste gezicht is

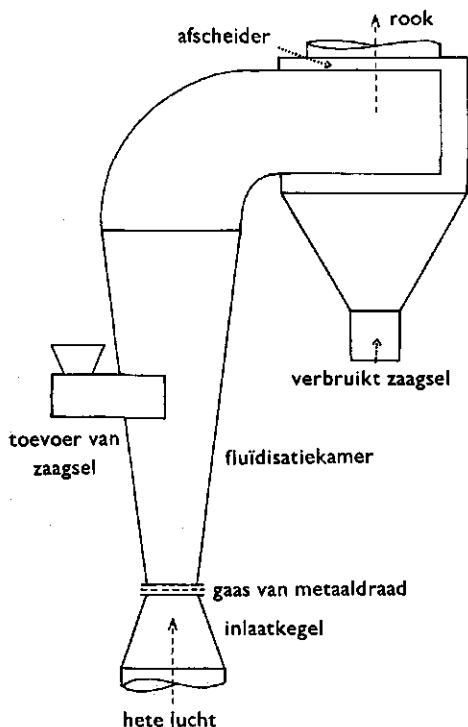


FIG. 9. Fluïdisatie-rookontwikkelaar volgens NICOL.

het principe van dit toestel enigszins verwant aan het Hansamatic-type, met dit grote verschil echter dat de houtspaanders hier niet verbranden doch ontleden onder afsluiting van lucht. Reeds in bedrijf zijnde uitvoeringen werken met oververhitte (250–360°) stoom als transportgas (TE WECHER, 1966). In tegenstelling tot bijvoorbeeld de generator van Nicol is een spontane ontvlaming hier natuurlijk uitgesloten, hetgeen de mogelijkheden voor toepassing in een volledig automatisch bedrijf aanmerkelijk gunstiger maakt.

Of de Fessmann-generator evenwel geschikt is voor het roken van vis, valt gezien het hoge vochtgehalte van de rook te betwijfelen.

1.5. AFWIJKENDE WIJZEN VAN ROKEN

Een belangrijke drijfveer bij het ontwerpen van vrijwel alle onder 1.4.2.2 beschreven rookontwikkelaars was de wens, de grondstof hout effectiever te benutten, er dus voor te zorgen dat uit een minimale hoeveelheid hout een maximale hoeveelheid rook wordt ontwikkeld. Het blijft echter een feit, dat verreweg de meeste rook niet op het te roken produkt terecht komt, doch onbenut via de schoorsteen wordt afgevoerd.

Verschillende pogingen zijn in het werk gesteld om een doelmatiger gebruik te maken van de ontwikkelde rook. Met name moeten hier worden genoemd: het elektrostatisch roken, en de behandeling met een rookoplossing, de zogenaamde 'vloeibare rook'.

1.5.1. *Elektrostatisch roken*

Rook kan fysisch worden beschreven als een zeer fijne verdeling van vloeistofdruppeltjes in een gas, ofwel een aerosol. Zowel de vloeistof- of disperse fase als de gas- of dispergerende fase bevatten een aantal ontledingsprodukten van hout, waarvan een gedeelte verantwoordelijk is voor de organoleptische eigenschappen van gerookte produkten.

Volgens FOSTER en SIMPSON (1961a, b) moet men zich voorstellen dat het rookproces in hoofdzaak berust op absorptie van gassen aan het vochtige oppervlak van het te roken produkt. Bij verdunning van de rook met lucht, of bij verhoging van de temperatuur, vervult de disperse fase de rol van reservoir. Ook de door het produkt opgenomen bestanddelen zouden vanuit de disperse fase weer worden aangevuld.

De massa van de disperse fase blijkt die van de dispergerende fase vele malen te overtreffen, althans voorzover het zuren, fenolen en carbonylverbindingen betreft (SIKORSKI, 1962a). Het zal duidelijk zijn dat een zeer hoog rendement mogelijk is indien het gelukt, juist deze disperse fase op het produkt neer te slaan, hoewel men zich daarbij wel dient te realiseren dat de samenstelling van deze fase anders zal zijn dan die van de gasfase: met name de minst vluchtige bestanddelen van rook zullen zich in de disperse fase ophopen.

Bij het elektrostatisch roken is het inderdaad mogelijk gebleken, een groot deel van de disperse fase op het te roken produkt neer te slaan. Reeds in de twintiger jaren werden pogingen in die richting ondernomen. Een bruikbare op-

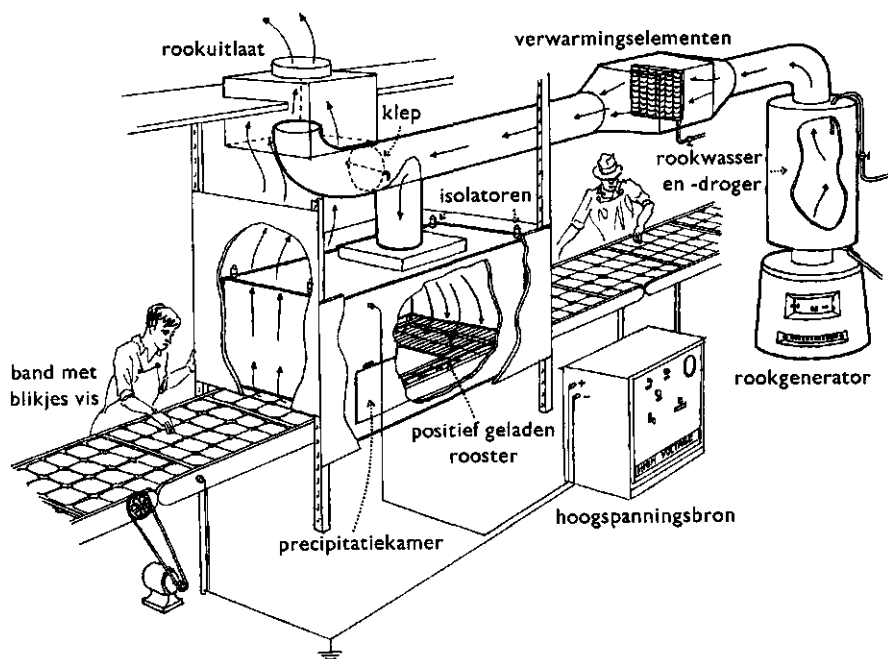


FIG. 10. Installatie voor het elektrostatisch roken van vis (volgens HAMM en RUST).

stelling, waarmee de rooktijd zeer kon worden bekort, werd beschreven door HAMM en RUST (1947). In de door hen beschreven installatie werden sardines, die reeds in blikjes waren gelegd, elektrostatisch gerookt; ze werden hiertoe op een lopende band geplaatst, waarna zij in de rookkamer kwamen waar een elektrisch veld was aangelegd met een potentiaalverschil van 14 tot 23 kV. De blikjes vormden de negatieve pool, terwijl de rookdeeltjes positief geladen werden en daarna op de vis neersloegen (figuur 10). Door BRAMSNAES (1951) werd vastgesteld dat deze sardines de karakteristieke goudgele kleur van op Skandinavische wijze gerookte sprat misten, doch niettemin een duidelijke rooksmaak hadden.

SIKORSKI en BARYLKO-PIKIELNA (1960) achtenelektrostatisch gerookte producten volkomen gelijkwaardig aan producten die op conventionele wijze zijn gerookt; een konklusie die zij baseerden op de organoleptische beoordeling van een aantal verschillende producten (diverse soorten gerookte vis, en worstjes). VAN MAMEREN (1966) daarentegen acht de smaak van elektrostatisch gerookte vis beslist onvoldoende; wel bezit het produkt zijn inziens een goede kleur. In een latere publikatie (1962b) wijst SIKORSKI er op, dat de gunstige beoordeling van elektrostatisch gerookte producten niet behoeft te gelden voor producten waarbij gebruik is gemaakt van een installatie die de deeltjes oplaadt voor zij in de rookkamer komen.

WOSKRESENSKIJ (1962) vermeldt nog, dat elektrostatisch gerookte haring het

scherpe aroma van op conventionele wijze gerookte vis mist, doch voegt hieraan toe dat dit voor velen een reden is, het eerste produkt te prefereren.

Behalve een zeer effectieve benutting van de rook kan ook de rooktijd sterk worden bekort. Men moet hierbij echter wel bedenken dat dit bij koud gerookte produkten als bijvoorbeeld spekbokking nauwelijks van belang is, omdat de duur van het proces vrijwel uitsluitend zal worden bepaald door de droogsnelheid. Zelfs bij de bereiding van kippers, die verhoudingsgewijze niet zeer lang worden gedroogd, is de tijdwinst gering, zoals blijkt uit een der jaarrapporten van het TORRY RESEARCH STATION te Aberdeen (1958). Hierin wordt ook vermeld dat de mate, waarin de rookdeeltjes neerslaan, niet zo groot is als op grond van laboratoriumproeven wel werd vermoed.

Om dit alles, en ook vanwege de ernstige vervuiling („tarring-up”) die bij dit proces optreedt, worden de voordelen van het elektrostatisch roken in het Torry-rapport marginaal genoemd. Hiertegenover staat de mening van WOSKRESENSKIJ (1965), die het elektrostatisch roken in alle opzichten superieur acht ten opzichte van de klassieke procedure.

Over het gevaar, dat het werken met hoge spanningen mogelijkerwijze inhoudt, wordt in het algemeen weinig vermeld, doch volgens MORSE en PIVAN (1953) kan de stroomsterkte zo worden ingesteld dat de procedure niet gevaarlijk is.

In het algemeen blijkt het elektrostatische rookproces in Oost-Europa wat gunstiger te worden beoordeeld dan elders. Of deze werkwijze daar reeds op grote schaal wordt toegepast, is ons niet bekend. Wel kan in dit verband het résumé van TILGNER (1958) worden genoemd, waarin een twintigtal toen bestaande elektrostatische rookinstallaties worden opgesomd, doch deze waren voor het merendeel experimenteel.

1.5.1.1. Elektrostatisch gefiltreerde rook

Volledigheidshalve dient reeds hier de mogelijkheid te worden vermeld om te roken met rook waaruit de disperse fase is verwijderd. Door FOSTER en SIMPSON (1961a, b) werd gevonden, dat slechts de gasfase van rook een direkte rol speelt bij het roken van vis of bacon. TILGNER, SIKORSKI, URBANOWICZ en NOWAK (1962d) namen waar dat Oostzeeharing, die in de gasfase is gerookt, een normale geur en smaak heeft, doch dat de kleurontwikkeling achterblijft.

1.5.2. „Rookloos roken”

Reeds meer dan honderd jaar geleden werden pogingen gedaan om het rookproces te vereenvoudigen en goedkoper te maken, en wel langs geheel andere weg dan de bovenbeschreven procedures (TILGNER, 1966). Een zekere Du Bonnée moet toendertijd hebben voorgesteld, vlees en vis te conserveren met houtazijn, de vloeistof die ontstaat bij de droge destillatie van hout. De experimenten in die richting mislukten echter.

In latere pogingen, onder andere die van GUINOT (1944, 1950) („Fuméol”) werden bepaalde frakties van het destillaat voor het conserveren van vlees, kaas of vis gebruikt. Deze procedures hadden eveneens weinig succes. De oorzaak

lag doorgaans bij de organoleptische afwijkingen die aan het eindprodukt werden gekonstateerd, en die werden getypeerd als hars-, teer-, pek- of houtskoolachtig. Ook vanuit toxicologisch gezichtspunt waren deze vloeistoffen niet geheel onbedenklijk.

Een andere vertegenwoordiger van dit type is het Russische WNIIMP-preparaat van LAPŠIN (1961).

De smaakafwijkingen van met dit preparaat behandelde vis worden overigens door hem wel toegegeven; reden waarom hij voor het koud roken van vis een gekombineerde methode voorstelt waarbij het klassieke rookproces gedeeltelijk wordt vervangen door een behandeling met de rookessence. Hij claimt hierbij een tijdwinst van meer dan 50 % (LAPŠIN, 1962). Een bewering waarbij we, in verband met de in 1.5.1 gemaakte opmerking over de droogsnelheid, een vraagtekens plaatsen.

Beter voldoen de rookcondensaten die zijn verkregen uit rook die op de normale wijze werd ontwikkeld (TILGNER, 1966). Hij stelt dan ook voor in de praktijk een scherp onderscheid te maken tussen de eerste en de laatste groep, die hij respectievelijk aanduidt met de namen rookessence en rookcondensaat.

Rookcondensaten kunnen worden bereid door elektrostatische precipitatie van de disperse fase (TORIYAMA c.s., 1955). Een andere methode is de absorptie van rookgassen in een bepaalde vloeistof. HOLLENBECK en MARINELLI (1963) gebruiken hiervoor water (het CharSol-preparaat), MILER (1965) 1 N natronloog en TAYLOR (1964) een plantaardige olie. Daar deze rookcondensaten ook ongewenste bestanddelen bevatten, wordt vaak nog een zuivering uitgevoerd; Miler gaat hierbij zo ver dat hij slechts de fenolische fractie overhoudt.

Voor verdere informatie over de behandeling met vloeibare rook kan nog worden verwezen naar publikaties van LANGNER (1966) en WISTREICH (1967).

Welk van deze preparaten het meest geschikt is, zal sterk afhangen van het produkt dat men wenst te bereiden. Een condensaat, dat bestaat uit de elektrostatisch geprecipiteerde disperse fase van rook, is misschien bruikbaar voor een verdieping van de rookkleur, terwijl een gerookte olie perspectieven zou kunnen bieden voor een produkt als gerookte plakjes koolvis in olie („Seelachs“). Volledigheidshalve moet hier ook nog worden gewezen op de mogelijkheid, een kunstmatig bereid rookaroma toe te voegen. In hoeverre deze handelwijzen een acceptabel produkt opleveren, wordt hier in het midden gelaten.

1.6. SLOTOPMERKINGEN

Hoewel de hier gegeven opsomming van nieuwe mogelijkheden voor het roken van levensmiddelen misschien de indruk wekt, dat zich op dit gebied grote ontwikkelingen voordoen, moet er toch nadrukkelijk op worden gewezen dat met name bij het visroken vrijwel uitsluitend de van vader op zoon overgeleverde technieken worden beoefend, met uitzondering van het langzaam groter worden-de gebruik van rooktunnels in plaats van de traditionele hang. De redenen hiervoor zijn wellicht, dat de voordelen van de nieuwere methoden voor de visrokers nog niet zo klaarblijkelijk zijn, ofwel dat men van mening is dat gewijzigde me-

thoden de mogelijkheid in zich bergen van een afwijkend en dus minder goed produkt. Ook conservatisme zal aan deze gang van zaken zeker niet vreemd zijn.

De vrees voor een minder goed produkt is overigens niet van alle realiteit ontbloot. Hoewel de consument tegenwoordig veelal een produkt vraagt met een minder geprononceerde rooksmaak, gaat hij bij zijn beoordeling van gerookte produkten nog steeds, zij het vaak onbewust, uit van de door de klassieke werkwijze gemodelleerde kenmerken van dit produkt. Elke verandering in deze werkwijze kan een verandering in het produkt ten gevolge hebben; mogelijkwerwijze weerhoudt dit sommige rokers ervan, geld in moderne apparatuur te investeren. Vooral voor zeer kleine bedrijven is hier een reëel risico aanwezig.

Deskundige voorlichting kan een belangrijke rol spelen; hierbij is het evenwel van belang dat de achtergronden van het *klassieke* rookproces goed bekend zijn, zodat men weet welke eisen moeten worden gesteld niet alleen aan het produkt, maar ook aan de rookinstallatie.

Vele mislukkingen bij pogingen om het rookproces te verbeteren en efficiënter te maken zijn ongetwijfeld te wijten aan onvoldoende kennis van deze achtergronden. Terecht is dan ook door velen getracht, in deze achtergronden meer inzicht te verkrijgen. In hoofdstuk 2 wordt een globaal overzicht gegeven van deze onderzoekingen.

2. ONDERZOEK NAAR DE ACHTERGRONDEN VAN HET ROOKPROCES

2.1. INLEIDING

Pas gedurende de laatste decennia wordt de behoefte aan meer achtergrondinformatie over het roken van levensmiddelen gevoeld. Het werk van PETTET en LANE in de dertiger jaren, waarvan de definitieve publikatie in 1940 plaatsvond, mag men beschouwen als het begin van het gerichte en systematische onderzoek van het rookproces met het doel, de achtergronden hiervan te leren kennen en zo een basis te vormen voor de verdere ontwikkeling van de technologie van het roken. Pettet en Lane gaven als eersten een globale samenstelling van houtrook, waarbij zij tevens nagingen hoe deze samenstelling veranderde bij wisselende doorstroomsnelheden van de lucht in de rookkast.

Overigens is het merkwaardig dat aan een verwant proces, de droge destillatie van hout, veel eerder aandacht is besteed; Goos publiceerde in 1952 een lijst met 213 bestanddelen van houtdestillaat, waarbij hij in hoofdzaak teruggreep naar gegevens die ver voor 1940 werden verkregen.

Na 1945 is het onderzoek van het rookproces sterk geïntensiveerd, met als resultaat een zeer grote hoeveelheid gegevens. Vooral op het gebied van de kwalitatieve samenstelling van rook is veel feitenmateriaal verzameld.

Intussen moet de vraag worden gesteld, in hoeverre al dit materiaal van direct belang is voor de praktijk van het roken. Het is immers allerm minst een eenvoudige zaak om een proces te bestuderen dat vrijwel niet valt te beheersen en dus ook slecht kan worden gereproduceerd. Zowel het ontstaan van rook uit hout als het binnendringen van deze rook in levensmiddelen zijn zeer ingewikkelde mechanismen; bovendien is de rook zelf niet alleen uiterst complex van samenstelling maar tevens instabiel, zowel in fysisch als in chemisch opzicht. Zinnvolle bestudering van een en ander lijkt slechts mogelijk indien men, in afwijking van de praktijkomstandigheden, een aantal factoren konstant houdt of uitschakelt. Hierbij bestaat echter de kans dat men in feite een systeem gaat bestuderen dat met de praktijk betrekkelijk weinig uitstaande heeft. Ook is het risico, dat men in dit labrynt van fysische variabelen en chemische reacties een of meer factoren over het hoofd ziet, allerm minst uitgesloten. Het wekt dan ook nauwelijks verbazing dat in de literatuur over het rookproces nogal eens tegenstrijdigheden voorkomen.

Het behoeft geen betoog, dat regelmatig contact tussen degenen die zich met het onderzoek van het rookproces bezighouden, van groot belang is. Zeer nuttig waren daarom de symposia die in 1958 en 1960 in Gdańsk (Danzig) werden georganiseerd, en waarin de afdeling 'Technologie van levensmiddelen van dierlijke oorsprong' van de Politechnika Gdańska, onder leiding van Prof. Dr. D. J. Tilgner, een belangrijke rol speelde. Met name op het tweede symposium is zeer veel onderzoek ter sprake gekomen. De 38 lezingen, die hier werden gehouden, werden gepubliceerd in een speciale editie van het Joegoslavische tijd-

schrift 'Tehnologija Mesa' (Vleestechnologie), dat in dit proefschrift veelvuldig wordt aangehaald.

Helaas zijn na 1960 geen open symposia over het roken van levensmiddelen meer belegd, hoewel de behoefte daaraan stellig bestaat. Nog in 1963 schreef DRAUDT: 'Undoubtedly the major deterrent to progress in smoking technology is the general lack of readily available scientific information on smoke composition, and components responsible for the flavor and other functional properties of smoke'. Het is de vraag of dit in 1969 te pessimistisch is. Het is ook de vraag of deze opmerking slechts moet gelden voor onze praktische kennis van de samenstelling van rook en de betekenis van deze samenstelling. In elk geval dringt de idee zich op, dat tussen de wetenschappelijke informatie omtrent het rookproces en de praktijk van het roken een soort niemandsland aanwezig is, dat vanaf beide zijden zeer schroomvallig wordt betreden en waardoorheen weinig communicatie plaatsvindt.

Aan de hand van de tot nu toe verkregen gegevens zullen we nagaan in hoeverre die indruk juist is, en waar de hiaten het meest hinderlijk zijn. In tegenstelling tot hetgeen veelal in de literatuur gebruikelijk is – het centraal stellen van de rook en haar eigenschappen – gaan we hier uit van het produkt zelf, waarbij de volgende vier facetten zullen worden besproken:

- ontstaan van aroma en smaak als gevolg van de behandeling met rook;
- bescherming tegen microbiel bederf;
- verhindering van chemisch bederf (vetoxidatie);
- vorming van de karakteristieke rookkleur op het produkt.

2.2. AROMA EN SMAAK VAN GEROOKTE PRODUKTEN

Het ontstaan van de typische organoleptische eigenschappen van gerookte produkten is, globaal beschouwd, een gevolg van de absorptie van bepaalde stoffen uit die rook, gevolgd door diffusie in het produkt en eventueel reacties van sommige stoffen uit rook met bestanddelen van dat produkt. Van belang hierbij is de samenstelling van de rook, en de mate waarin die rook op het produkt terecht komt.

2.2.1. Rooksamenstelling

Sinds moderne scheidingsmethoden als de gaschromatografie, en moderne detectiemethoden zoals de infrarood- en de massaspectrometrie hun intrede deden in de analytische chemie, is door vele onderzoekers nagegaan welke verbindingen zoal in houtrook aanwezig zijn. Dit inventarisatieonderzoek heeft onder meer aan het licht gebracht dat rook een grote verscheidenheid aan fenolische verbindingen, carbonylverbindingen en vetzuren bevat, waarvan een aanzienlijk gedeelte een zeer sterke geur bezit, zodat men mag verwachten dat deze verbindingen van belang zijn bij de vorming van het rookaroma.

In vele gevallen werden de rookmonsters verkregen door de rook te condensereren in zg. cold traps, waarbij werd gekoeld met kooldioxide/acetone- of kooldioxide/ethanolmengsels (PETTET en LANE, 1940; JAHNSEN, 1961; HOFF en

KAPSALOPOULOU, 1964; PORTER c.s., 1965; DOERR c.s., 1966; FIDDLER c.s., 1966). Op het aldus verkregen condensaat werd in de meeste gevallen een gaschromatografische scheiding uitgevoerd, waarna de identiteit van een aantal componenten kon worden vastgesteld.

Gezien de hoge concentraties aan rookbestanddelen in het condensaat is het allerminst denkbeeldig dat hierin reacties zullen gaan optreden. Door tijdige verdunning kunnen deze reacties echter aanzienlijk worden vertraagd. JAHNSEN (1961) vermeldt dat rookcondensaten, die hij uit hout met een hoog vochtgehalte bereidde, veel stabielere waren dan condensaten die uit minder vochtig materiaal werden verkregen; een verschijnsel dat hij als louter een verdunningseffect verklaart. Overigens dient men te bedenken dat reacties in het condensaat zeer verwant, zo niet dezelfde, zullen zijn als reacties in de deeltjesfase van het rook-aerosol; we behoeven dan ook niet te verwachten, dat hierbij geheel andere verbindingen zullen ontstaan. Wel bestaat de kans dat sommige zeer reactieve verbindingen, die een belangrijke rol kunnen spelen in het rookproces, geheel zullen verdwijnen. Ook een kwantitatieve interpretatie van de resultaten wordt bij het voortschrijden der reacties steeds moeilijker (ZIEMBA, 1956).

Een andere methode voor het opvangen van rook is de absorptie in een vloeistof, meestal water. Behalve het voordeel, dat op deze wijze allerlei reacties worden vermeden of op zijn minst tegengegaan, sluit een dergelijke handelwijze meer op de praktische situatie aan, zie 2.2.2.

Naast de directe analyse van de totale rook is ook onderzoek verricht op rookfrakties die tevoren op meer klassieke wijze waren geïsoleerd. Zo werden er scheidingen uitgevoerd op grond van het verschil in vluchtigheid der verschillende frakties, waarna deze frakties afzonderlijk werden onderzocht (GROENEN, 1965). Ook werden scheidingen verkregen door de rook door bepaalde oplossingen te leiden (NaOH (FIDDLER c.s., 1966), 2,4-dinitrofenylhydrazine (LOVE en BRATZLER, 1966)), met het doel, de samenstelling van verschillende groepen van chemisch verwante verbindingen (zuren, fenolen, carbonylverbindingen) nader te leren kennen.

Hoewel men in het algemeen van mening is (SHEWAN, 1949; TILGNER c.s., 1962a, c; DRAUDT, 1963; FIDDLER c.s., 1966), dat het rookaroma wordt gemodelleerd door de fenolen en verscherpt of geaccentueerd door de vetzuren, blijkt steeds weer dat de invloed van een aantal carbonylverbindingen niet moet worden veronachtzaamd (TILGNER, 1967). SPANYÁR, KEVEI en BLAZOVICH (1966) zijn zelfs van mening dat de aromastoffen in rook grotendeels bestaan uit geringe hoeveelheden van bepaalde carbonylverbindingen. Het is voorts nuttig, te bedenken dat een fenolische fractie, die uit rook is afgescheiden op grond van de zwak zure eigenschappen der fenolen en hun oplosbaarheid in ether, ook allerlei andere stoffen – met name carbonylverbindingen – kan bevatten die deze zwak zure eigenschappen eveneens bezitten. Interessant is in dit verband de isolatie van methylcyclopentenolon (cycloteen) uit de fenolfractie van rook, door KURKO (1961); een component die een vrij belangrijke rol schijnt te spelen in de totstandkoming van het aroma.

Vele van de tot nu toe in houtrook gevonden verbindingen komen ook voor

op de lijst van Goos (1952), hetgeen nauwelijks verwondering zal wekken vanwege de grote overeenkomst tussen de droge destillatie van hout en het ontstaan van rook uit een smeulend houtvuur. Het belangrijkste verschil tussen beide processen is het ontbreken van oxidatieve reacties bij de droge destillatie. Wat hiervan het gevolg is voor de samenstelling der pyrolyseprodukten, valt moeilijk te overzien. Uit de literatuurgegevens blijkt in elk geval niet duidelijk dat de hoeveelheid of het aantal componenten met veel zuurstof in het molecuul in rookcondensaten hoger is dan in houtdestillaten. Men heeft getracht, hierover enige informatie te verkrijgen door een toestel te ontwerpen waarin hout eerst in een atmosfeer van kooldioxide aan pyrolyse wordt onderworpen, waarna de pyrolyseprodukten in een andere ruimte met lucht worden verhit (MILER, 1962; TILGNER c.s., 1962a). Men vermoedt, op grond van de verkregen gegevens, dat oxidatieprocessen geen grote rol spelen (MILER, 1962). Niettemin bestaat tussen beide produkten een duidelijk onderscheid, zie 1.5.2.

Nog slechts weinig is bekend over de condities waarbij de individuele aroma- en smaakstoffen in de rook hun optimale concentratie bereiken. Dit geldt zowel voor de gewenste als voor de minder gewenste aromadragers. De zeer gekomplieerde samenstelling der rook is hier uiteraard debet aan.

Intussen is het de vraag of het noodzakelijk is, deze weg te bewandelen voor het verkrijgen van informatie omtrent de optimale rookcondities. Een kwantitatieve analyse van groepen van rookbestanddelen, gekombineerd met een organoleptische beoordeling, zal naar alle waarschijnlijkheid meer directe informatie kunnen geven, waarbij inventarisatie en semi-kwantitatieve analyse van enkele rookfrakties voor de opheldering van sommige details zouden kunnen zorgen.

De weg der kwantitatieve analyse van groepen van verbindingen is o.m. gevolgd door RUSZ (1962), TILGNER c.s. (1962b) en SPANYÁR c.s. (1960a, b, 1961). Rusz analyseerde rook, van verschillende houtsoorten afkomstig, en onderzocht ook de invloed van de pyrolysetemperatuur en het vochtgehalte van het gebruikte hout op de rooksamenstellingen. Tilgner c.s. onderzochten alleen de invloed van het vochtgehalte. Spanyol en medewerkers verrichtten zeer uitgebreid onderzoek, waarin zij verschillende houtsoorten betrokken en tevens de invloed van pyrolysetemperatuur en vochtgehalte nagingen. Bovendien verzamelden zij een aantal gegevens over de wijze waarop de samenstelling van rookcondensaat samenhangt met de afkoeling van de rook tijdens het transport van rookbron naar condensor.

Wat betreft het belang van verdere studies op het gebied van de totale inventarisatie lijkt het ons toe, dat dit meer moet worden gezocht op het terrein van de synthetische rookaroma's, een terrein dat hier verder buiten beschouwing zal blijven.

2.2.2. *Neerslag c.q. absorptie van rook*

De pogingen om rook in zijn geheel op te vangen, een werkwijze waarvan de wenselijkheid reeds door Pettet en Lane werd beklemtoond, zijn zeer waardevol indien het doel van het onderzoek de rook *als zodanig* is. Het is echter de vraag of de samenstelling van een rookcondensaat representatief is voor de samenstel-

ling van het gedeelte van de rook dat op het produkt terechtkomt. Het is hierbij van belang of het de deeltjesfase dan wel de gasfase van het rookaerosol is, die in hoofdzaak de verantwoordelijkheid draagt voor de aanwezigheid van rookbestanddelen in gerookte produkten. We kunnen immers verwachten dat de samenstelling van de deeltjesfase anders is dan die van de gasfase, omdat de minst vluchtige bestanddelen zich in de deeltjesfase zullen ophopen.

Nu werd onder 1.5.1 reeds vermeld, dat de Britse onderzoekers Foster en Simpson van mening zijn dat het rookproces in hoofdzaak neerkomt op absorptie van stoffen uit de gasfase van rook aan het vochtige oppervlak der levensmiddelen. Zij voerden een serie experimenten uit, waarin de deeltjesfase uit de rook werd verwijderd met behulp van een elektrostatisch filter. Zowel voor als achter het filter werden monsters van de rook getrokken door absorptie van deze rook in water, en werden vis en bacon aan de inwerking der rook blootgesteld. Noch tussen de rookmonsters, noch tussen de gerookte produkten was enig verschil van betekenis vast te stellen.

Hoewel tegen deze experimenten enige bezwaren zijn aan te voeren, zie hoofdstuk 6, lijkt de theorie van Foster en Simpson in de meeste gevallen te mogen worden toegepast. Indien men voorts bedenkt dat de hoeveelheid zuren, fenolen en carbonylverbindingen in de deeltjesfase veel groter is dan in de gasfase (SIKORSKI, 1962a), zal het duidelijk zijn dat een totaal rookcondensaat in hoofdzaak bestaat uit dat gedeelte van de rook dat niet op het produkt terecht komt. Een en ander is voor ons aanleiding om kritisch te staan tegenover analyses van rookcondensaten die zonder meer op het roken van vis (of andere levensmiddelen) worden betrokken.

Juister lijkt het om, evenals Foster en Simpson, de rook in water te laten absorberen en de ontstane oplossing aan een analyse te onderwerpen. Hiervoor heeft men gebruik gemaakt van gaswasflessen (SPANYÁR, 1960a; RUSZ, 1962; ZIEMBA, 1964, 1967b) en ook wel van met water gevulde worstomhulsels (KURKO, 1961; SIMON c.s., 1966; TE WECHER, 1967; BRATZLER en HARPER, 1968). Foster en Simpson gebruikten Petrischalen met water.

Ook deze werkwijzen echter wijken aanzienlijk van de praktijkomstandigheden af. In de dunne laag vocht rond het levensmiddel zullen sommige stoffen – afhankelijk van hun oplosbaarheid in water en hun concentratie in de rookgassen – snel hun verzadigingsconcentratie bereiken en niet meer worden opgenomen, terwijl andere componenten gedurende een veel langere periode kunnen worden geabsorbeerd. De absorptie via wasflessen, in waterworsten of in Petrischalen nivelleert al deze verschillen, omdat immers het watervolume in deze gevallen zeer veel groter is. Ook met de trage diffusie van rookcomponenten naar dieper gelegen gedeelten van het levensmiddel wordt bij de absorptie van rook in water geen rekening gehouden.

Deze moeilijkheden doen zich uiteraard niet voor bij een analyse van rookbestanddelen op het gerookte produkt zelf. Het eerste systematische onderzoek in deze richting is dat van LINTON en FRENCH (1945). Zij bepaalden de concentratie aan fenolen, aceton, vluchtige zuren en formaldehyde in gerookte vis. De uitkomsten van de laatste twee bepalingen waren echter niet geschikt om er kon-

klusies omtrent het rookproces aan te verbinden. De moeilijkheden bij de vluchtig zuur-bepaling werden veroorzaakt door hoge blankowaarden van het uitgangsmateriaal, die bovendien nog afhankelijk waren van de versheid van dit materiaal; de moeilijkheden met de bepaling van formaldehyde ontstonden door de participatie van deze stof in irreversibele chemische reacties. We stuiten hier al direkt op twee problemen bij de analyse van rookbestanddelen in gerookte produkten. Vooral het feit dat er reacties gaan optreden, tussen de rookcomponenten onderling of tussen rookcomponenten en bestanddelen van het produkt, maakt de analyse van een aantal rookbestanddelen langs deze weg onmogelijk. Bij deze reacties zijn ongetwijfeld ook stoffen betrokken die mede de smaak bepalen: het is een bekend feit dat het aroma van sommige produkten zich gedurende de eerste dagen na het roken nog sterk wijzigt. De reuk van brandend hout verdwijnt en een milder, voller aroma komt ervoor in de plaats. En in 1.4.1. werd er al op gewezen, dat organoleptische verschillen als gevolg van de behandeling met verschillende soorten rook bij het bewaren min of meer worden 'gladgestreken'. Waarschijnlijk wordt een aantal stoffen, die als aromacomponent minder gewenst zijn, chemisch gebonden; mogelijk ontstaan ook nieuwe aromacomponenten. Vervluchtiging van sommige stoffen tijdens de verdere uitdroging speelt misschien eveneens een rol.

Het analyseren van een of meer rookbestanddelen, of groepen van bestanddelen, is met name zinvol in die gevallen waar we objektieve informatie willen verkrijgen over wat men in de Angelsaksische literatuur 'the degree of smoking' noemt. Door SIMPSON en CAMPBELL (1962) is aan deze werkwijze een kritische bespreking gewijd. Zij poneren, dat de analyse van fenolische componenten in gerookte levensmiddelen weliswaar een veel gezonder basis vormt voor een 'rook-index' dan analyses van vluchtige zuren of carbonylverbindingen, maar manen toch tot voorzichtigheid bij de interpretatie van de resultaten. Slechts wanneer steeds dezelfde, of soortgelijke, produkten worden gerookt, onder dezelfde condities van rookproducties en -neerslag, mogen de analyseresultaten met elkaar worden vergeleken. De auteurs illustreren dit als volgt: twee partijen vis, waarvan de ene in een traditionele rookkast en de andere in een moderne rooktunnel werd gerookt, blijken, bij dezelfde organoleptische beoordeling, geheel verschillende analyseresultaten op te leveren: het gehalte aan fenolen was bij de op conventionele wijze gerookte vis twee maal zo hoog. (Zij trekken dan ook de konklusie dat de huidige (1960) kennis omtrent het rookproces nog niet toelaat dat chemische analyses een beslissende rol spelen in de kwaliteitscontrole van gerookte vis).

Op dit terrein is men, sinds 1960, nauwelijks verder gekomen. Nu is de objectieve kwaliteitsanalyse van gerookte produkten niet meer een van de meest urgente zaken, maar bruikbare analysemethoden voor rookstoffen in gerookte levensmiddelen of modellen daarvan kunnen van groot nut zijn bij de bestudering van de condities tijdens het roken. Juist het feit echter, dat het gehalte aan de fenolen van gerookte produkten, bij gelijke organoleptische beoordeling, zo aanzienlijk blijkt te kunnen verschillen, zou een goed uitgangspunt kunnen zijn voor een nadere bestudering van de fenolen die in het produkt terechtkomen.

Voorzover we weten is een dergelijk onderzoek nimmer aangevat, maar verwacht mag worden dat het op zijn minst een bijdrage zou kunnen leveren aan onze kennis omtrent aroma- en smaakvorming, terwijl misschien ook een betere maat voor de intensiteit der rookbehandeling kan worden verkregen.

Het zal inmiddels duidelijk zijn, dat een ideale procedure voor het verkrijgen van rookmonsters niet bestaat. Niettemin kan men, indien men zich de beperkingen van de verschillende werkwijzen terdege bewust is, met vrucht van de bestaande methoden gebruik maken. Zo zijn de methoden, waarbij de rook in water wordt geabsorbeerd, zeer bruikbaar indien het gaat om samenstelling en hoeveelheid van de nuttige rook in de rookinstallatie. In vele gevallen zal men hierna kunnen volstaan met de analyse van enkele belangrijke groepen van rookcomponenten, die zonodig kunnen worden aangevuld met een meer gedetailleerde analyse van enkele groepen.

Langs deze weg is reeds een hoeveelheid informatie verkregen, doch de onderlinge vergelijkbaarheid laat veel te wensen over, niet alleen door de verschillende analysemethodes die werden toegepast, maar vooral ook door het verschil in opvangtechnieken. Voorstellen tot standaardisatie der analysetechnieken zijn reeds op het tweede rookcongres te Gdańsk uitvoerig ter sprake gekomen; over de wijze van rook opvangen is de verwarring echter nog steeds groot. Het komt ons voor, dat een duidelijke afspraak over de toe te passen opvangtechniek(en) zo spoedig mogelijk dient te worden gemaakt. Het zal dan mogelijk worden, de hier liggende problemen op een grotere schaal aan te pakken dan tot voorheen het geval was.

Wellicht heeft het ook zin om te werken met een variant op deze absorptiemethode, door de rook niet in water maar in een organisch oplosmiddel op te vangen. Speciaal bij het roken van vette levensmiddelen mag worden verwacht dat een niet onaanzienlijk deel van de rook via de vetweefsels binnendringt (WISTREICH, 1967). De samenstelling van de op deze wijze geabsorbeerde rookcomponenten is ongetwijfeld anders en het kan nuttig zijn om ook zo enige gegevens te verzamelen.

Zij er nog aan herinnerd, dat het verkrijgen van rookmonsters door absorptie in vloeistoffen mede is gebaseerd op de juistheid van de theorie van Foster en Simpson. Hoewel deze theorie, zoals nog zal blijken, haar beperkingen heeft, is zij, juist voor de bestudering van de opname van - vluchtige - aromastoffen, zeer bruikbaar, en er is dan ook niet veel aanleiding om haar in dit opzicht te wantrouwen.

De absorptiemethodieken geven vrijwel geen bruikbare inlichtingen over de invloed van de condities in de rookkast of -tunnel (temperatuur, relatieve vochtigheid, snelheid der rookgassen) op het produkt. Voor een bestudering van het effect dezer parameters op aroma en smaak der gerookte waren zijn analyses van rookbestanddelen in deze waren de enig juiste weg. In sommige gevallen is het mogelijk, het levensmiddel te vervangen door een model; op deze wijze kan een grotere uniformiteit worden bereikt.

Aan dat model moet echter de eis worden gesteld, dat het de vis of de worst zeer nabij komt. Met name de wijze waarop het oppervlak uitdroogt, en de

diffusie van water naar dat oppervlak, kunnen zeer belangrijk zijn bij de opname van rookstoffen, en dienen daarom in het model zorgvuldig te worden geïmitteerd, ook al omdat de genoemde drie parameters juist hierin zulk een grote rol spelen. We hebben de indruk, dat aan het probleem van het verkrijgen van een bruikbaar model tot nog toe wat te weinig aandacht is besteed.

Over de aard der reacties die zich op het produkt afspelen en waarin rookcomponenten participeren, is nog niet veel bekend. KRYLOVA c.s. (1962) vonden echter, dat hierin met name de fenolen zijn betrokken: zij zouden zich binden aan de vrije amino- en sulfhydrylgroepen der eiwitten. Anderen veronderstellen de participatie van vrije carbonylverbindingen in Maillard-achtige reacties en in polymerisatiereacties. Deze zullen onder 2.5 weer ter sprake komen. Hier zij reeds opgemerkt, dat bij de ontwikkeling van bruikbare analyses op gerookte produkten meer kennis van deze reacties noodzakelijk is.

2.3. VERHOOGING DER HOUDBAARHEID ALS GEVOLG VAN DE MICROBICIDE EIGENSCHAPPEN VAN ROOK

Hoewel de conserverende werking van het rookproces, zoals dat van oudsher werd uitgevoerd, in hoofdzaak berust op de onttrekking van water aan levensmiddelen, kunnen de rookbestanddelen zelf een niet onbelangrijke bijdrage hieraan leveren. Dit blijkt bijvoorbeeld uit een eenvoudig experiment van KOCHANOWSKI (1962). Hij legde stukjes huid van gerookte vissen op agarplaten waar een bacteriesuspensie doorheen was gemengd. Rondom deze stukjes bleek geen bacteriegroei op te treden.

Overtuigender nog is een onderzoek van SHEWAN (1945), waarin warm gerookte haring werd vergeleken met haring die, onder vergelijkbare condities, in hete lucht was gedroogd. De rook- resp. droogtijd, en hiermee de graad van uitdroging, werd gevarieerd. In alle gevallen bleek de niet met rook behandelde vis sneller te bederven, hetgeen zowel organoleptisch als met behulp van een bederfanalyse (bepaling van het gehalte aan vluchtige basische stikstofverbindingen) werd vastgesteld. Vooral tussen kort gerookte en kort gedroogde vis waren de verschillen groot. Bij langdurig behandelde vis was het effect van de rook wat minder uitgesproken.

Bij de bereiding van kippers bleken de rookbestanddelen de grootste bijdrage tot de houdbaarheid te geven (SHEWAN, 1949). GIBBONS, ROSE en HOPKINS (1954) komen, in een studie over het roken van bacon, tot de konklusie dat het kiemgetal met name door deze rookstoffen wordt gereduceerd, en niet zozeer door de wateronttrekking. Het betreft hier echter in beide gevallen produkten, die tijdens het roken weinig vocht hebben verloren.

Het zou zinvol zijn, deze experimenten verder uit te breiden en er ook sterker gezouten produkten in te betrekken. Juist bij de in ons land veel bereide koud gerookte vis (met vrij hoge zoutpercentages) mag worden verwacht dat de rol van de rookbestanddelen bij de conservering geringer is dan bij de bovengenoemde produkten. Deze experimenten zouden een goede tegenhanger vormen van veelvuldig gedane modelproeven waarbij de bactericide werking van rook, rook-

condensaten of rookfrakties werd vastgesteld, maar waarbij niet duidelijk wordt of dit element in de praktijk een belangrijke dan wel een ondergeschikte rol speelt. Het is intussen niet onze bedoeling, de waarde van onderzoek naar de microbicide werking van de rook zelf te ontkennen; we willen er slechts op wijzen dat men uit zulk onderzoek soms te lichtvaardig konklusies trekt omtrent het effect van het rookproces zelf. Illustratief is in dit verband een recente studie van KOCHANOWSKI en MACIEJOWSKA (1967), waarbij is nagegaan in hoeverre vis, die voor de westkust van Afrika werd gevangen, kan worden geconserveerd door behandeling met rook, zout of antibiotica. Uit het feit dat een groot aantal bacteriestammen, die van deze vis werden geïsoleerd, zeer gevoelig waren ten opzichte van rookcondensaat, wordt gekonkludeerd dat het roken een nuttige techniek is voor het conserveren van Afrikaanse vis, en daarom ook kan worden aanbevolen voor industriële toepassing. Hoewel deze uitspraak op zich volkomen juist is, mag men haar toch niet baseren op de gevonden antibacteriële werking van rookcondensaat, daar, zoals reeds werd vermeld, in de praktijk geheel andere factoren meespelen.

In dit onderzoek werd met 1:1- en 1:3- verdunningen van een rookcondensaat gewerkt, die enige tijd waren bewaard. Het meest verdunde condensaat bleek de sterkste antibacteriële werking te vertonen! Men kan hieruit konkluderen dat de antimicrobe bestanddelen van rook tamelijk reaktief zijn en dat de optredende reacties sterk van de concentraties van deze bestanddelen afhangen. Er zal ernstig rekening gehouden moeten worden met het feit dat de antibacteriële eigenschappen van sommige rookbestanddelen snel verdwijnen indien zij eenmaal op de vis zijn neergeslagen. Dit is weer een reden te meer om aan de uit modelproeven verkregen resultaten niet zonder meer konklusies ten aanzien van de praktische situatie te verbinden.

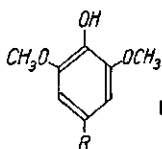
Wel heeft het zin, de bactericide eigenschappen van rookcondensaat te bestuderen indien men het effect van een behandeling met vloeibare rook wil nagaan, zie 1.5.2. Zulk onderzoek is eveneens door KOCHANOWSKI verricht (1962) en verder onder meer door WOLKOVSKAJA en LAPŠIN (1962). Een bespreking van hun werk moge hier achterwege blijven.

Voorts dient nog te worden vermeld, welke rookbestanddelen met name worden beschouwd als verantwoordelijk voor de antibacteriële werking van rook. Reeds tegen het einde der vorige eeuw is hieromtrent onderzoek verricht door SERAFINI en UNGARO (1891, 1892) en door BEU (1890). Uiteraard kon dit, met de summiere hulpmiddelen van die tijd, niet meer dan een vage indruk opleveren. Serafini en Ungaro achten de teerstoffen verantwoordelijk voor de bacteriedodende werking van rook; Beu schreef over de „antifermentatieve” werking van „kreosoot, brandbare oliën en carbolzuur”. Deze laatste onderzoeker heeft echter al ingezien dat wateronttrekking uitermate belangrijk is voor de conservering. Hij nam waar „dass eine energische antiseptische Wirkung des Rauches erst bei einem gewissen Grade von Wassermangel eintritt”.

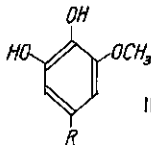
RIDEAL schrijft in 1903, dat de bactericide werking van rook berust op de aanwezigheid van azijnzuur en kreosoot. HESS noemt in 1928 formaldehyde de be-

langrijkste antibacteriële stof. Hij vermeldt ook, dat de bactericide eigenschappen van rook toenemen bij verlaging van de pH.

SHEWAN (1949) konstateerde dat de stabiliteit van koud gerookte vis ten opzichte van mikro-organismen een funktie is van het gehalte aan fenolische verbindingen. In later jaren werd in het Torry Research Station gevonden dat de volgende fenolen hiervoor in het bijzonder verantwoordelijk waren: 2,6-dimethoxyfenol (I), 2-methoxy-6-hydroxyfenol (II), en enkele homologen van deze verbindingen (REPORTS OF THE FOOD INVESTIGATION BOARD, D.S.I.R., GREAT BRITAIN 1953, 1954).



(R = H, CH₃, C₂H₅ of C₃H₇)



(R = H, CH₃ of C₂H₅)

Later werd nog gevonden (REPTS. FOOD INVESTIGATION BOARD, 1955), dat verschillende bacteriesoorten niet voor al deze componenten even gevoelig waren. Een *Achromobacter*stam bleek met name gevoelig voor 2,6-dimethoxyfenol en zijn homologen, terwijl *B. cereus* sterk reageerde op het in rook eveneens aanwezige hydrochinon.

In dit overzicht is er reeds op gewezen, dat sommige bactericide stoffen door polymerisatie, reacties met andere rookcomponenten of met bestanddelen van het produkt, deze eigenschap geheel of gedeeltelijk kunnen verliezen. Anderzijds moet er ook rekening mee worden gehouden, dat chemische veranderingen aan de oppervlakte van het gerookte produkt de groei van mikro-organismen kunnen belemmeren (BEM, 1966).

Hoewel het zeker nuttig zou zijn, deze experimenten verder uit te breiden, moet er toch op worden gewezen dat het momenteel urgenter is om, voor de thans gebruikelijke rookprocessen, duidelijk vast te stellen wat het aandeel der rookbestanddelen in het conserverend effect van de totale behandeling is. Slechts in die gevallen waar dit aandeel een belangrijke rol speelt, heeft verder onderzoek van de microbicide eigenschappen van rook praktische betekenis.

Tenslotte zij nog vermeld, dat de microbicide werking van rook zich niet tot schimmels lijkt uit te strekken. Juist gerookte vis vertoont bijzonder snel schimmelgroei, indien de bewaarcondities ongunstig zijn. Natuurlijk moet men hierbij bedenken dat de aanwezigheid van houtafval in de buurt van de rookinstallatie een voortdurende bron van schimmelinfectie vormt, maar in elk geval is vanuit de praktijk wel duidelijk, dat rookbestanddelen, althans in de concentratie waarin zij op gerookte vis voorkomen, de gevolgen van deze infectie niet kunnen verhinderen.

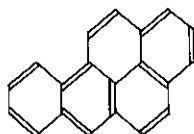
2.3.1. Toxicologische aspecten

Uitgaande van de microbicide eigenschappen van houtrook kan men zich

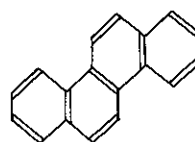
afvragen of deze hulpstof, vanuit toxicologisch gezichtspunt bezien, geheel onbedenkkelijk is. Inderdaad bevat houtrook vele voor de mens schadelijke verbindingen: methanol, formaldehyde, acetaldehyde, kresol, fenol, guaiacol. De hoeveelheden echter, die tijdens het roken op de levensmiddelen terechtkomen, zijn dermate klein, dat geen enkele schadelijke werking hiervan kan worden verwacht (LUDORFF, 1958) – een overtuiging die algemeen wordt gedeeld.

Dit laatste geldt evenwel niet voor de polycyclische koolwaterstoffen, waarvan er enkele in houtrook zijn aangetoond. Onder deze koolwaterstoffen bevinden zich de carcinogene verbindingen 3,4-benzpyreen en 1,2,5,6-dibenzanthraceen. Volgens TILGNER en MILER (1963) worden deze verbindingen niet gevormd indien de pyrolysetemperatuur beneden 425° en de temperatuur in de oxidatiezone beneden 375° blijft. In het conventionele smeulende houtvuur treden echter altijd hogere temperaturen op (TILGNER, 1968).

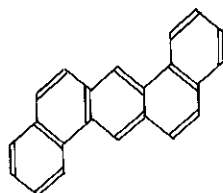
Door Bailey en Dungal is getracht, verband te leggen tussen de naar verhouding hoge frekwentie van maagkanker in gebieden waar de bewoners grote hoeveelheden gerookt vlees en gerookte vis nuttigen (IJsland), en de aanwezigheid van sporen 3,4-benzpyreen in deze levensmiddelen (BAILEY en DUNGAL, 1958; DUNGAL, 1961). TILGNER (1968) refereert aan een Russisch onderzoek, waarin wordt aangetoond dat onder Baltische vissers, die zeer veel gerookte vis eten, meer kanker van het maagdarmkanaal voorkomt dan bij de meer in het binnenland wonende bevolking. In beide gevallen betreft het hier evenwel extreme omstandigheden (overvloedige opname van sterk gerookte producten) en het is zeer de vraag of er van normaal gerookte vis carcinogene effecten vallen aan te tonen. Hierbij moet ook nog worden bedacht dat verwante polycyclische koolwaterstoffen, zoals bijvoorbeeld het eveneens in rook aanwezige chryseen, een anticarcinogene werking schijnen te bezitten (MILER, 1966). Aan gehalten van 0,001 tot 0,0001 p.p.m. benzpyreen zou men niet teveel betekenis moeten hechten. Terecht wijst DE WIJN (1966) er op dat het onverstandig is, om zich zorgen te maken over de mogelijke aanwezigheid van $0,001 \mu\text{g}$ benzapyreen per kg totaal gewicht, (.....) terwijl men honderd tot duizend keer zoveel opneemt met ieder stuk vlees dat boven een houtskoolvuur is geroosterd.'



3,4-benzpyreen



chryseen



1,2,5,6-dibenzanthraceen

Natuurlijk is het niet absoluut uitgesloten dat gerookte produkten andere carcinogene stoffen kunnen bevatten, maar er bestaan geen duidelijke aanwijzingen dat het met mate nuttigen van gerookte produkten de kans op kwaadaardige gezwellen in het spijsverteringskanaal merkbaar vergroot, behalve dan misschien in zeer extreme gevallen zoals de hierboven genoemde. We citeren ten tweede male de Wijn: 'Het gehele probleem van de kankerverwekkende factoren in de woon- en werkomgeving van de mens moet gezien worden in het totale beeld en niet vanuit het gezichtspunt van enkele waarnemingen van geïsoleerde onderdelen daarvan.'

2.4. VERTRAGING VAN OXIDATIEF VETBEDERF

De antioxidatieve eigenschappen van houtrook zijn in het begin van de dertiger jaren bestudeerd door LEA (1933) en later onder andere door WATTS en FAULKNER (1954), KURKO (1959) en TILGNER c.s. (1967). Algemeen wordt aangenomen dat voor de antioxidatieve werking van rook een aantal fenolen verantwoordelijk is. Kurko noemt hierbij met name hoogkokende fenolfrakties, die bestaan uit pyrogallolethers. Merkwaardigerwijze zijn dit dezelfde stoffen als die waaraan een sterke microbicide werking wordt toegeschreven. De antioxidatieve werking van deze verbindingen kan worden vergeleken met die van het bekende antioxidans BHT (KURKO, 1959).

2.5. KLEURVORMING OP GEROOKTE PRODUKTEN

In tegenstelling tot de antioxidatieve werking van rook is de wijze, waarop de kleur op gerookte levensmiddelen wordt gevormd, een zeer gekompliceerde kwestie, waarover – verhoudingsgewijze – nog niet zoveel bekend is.

Het ligt voor de hand, te veronderstellen dat de kleur op gerookte waren het gevolg is van het daarop neerslaan van teerdeeltjes, zoals vroeger dan ook meestal werd aangenomen. De verdieping van de kleur na het roken echter, die vooral bij koud gerookte vis wordt waargenomen, duidt er op dat het neerslaan van teerdeeltjes zonder meer de kleurvorming niet kan verklaren en dat daar in elk geval ook chemische reacties bij optreden.

In 1945 werd door SHEWAN het vermoeden geopperd, dat de fenolen uit rook bij de reactie zijn betrokken. Pyrogallol, en ook wel andere fenolachtigen, oxideren aan de lucht tot bruine of bruinzwarte verbindingen. Deze reacties worden versneld bij verhoging van de pH. Inderdaad blijkt vis, waarvan het oppervlak met natriumbicarbonaat is behandeld, een meer intense kleur te bezitten dan niet behandelde vis, die aan dezelfde hoeveelheid rook werd blootgesteld. Niet geheel verse vis (die ammoniak en andere basen bevat) blijkt eveneens gemakkelijker te verkleuren na behandelen met rook.

LINTON en FRENCH kwamen echter in hetzelfde jaar tot de konklusie dat deze fenolen niet deelnamen aan de reacties die tot kleurvorming leiden. Zij bepaalden het fenolgehalte in gerookte vis op twee verschillende manieren en vonden geen afname gedurende de kleurverdieping.

In 1956 vond SIKORSKI, dat de rookbestanddelen die in een elektrostatisch veld het minst werden versneld, de neutrale componenten dus, de kleurvorming veroorzaakten. Dit zouden hoofdzakelijk harsachtige (teerachtige?) bestanddelen zijn. ZIEMBA (1956) nam waar, dat deze neutrale rookbestanddelen zelf gekleurd waren – de kleur varieerde van geel tot bruin – en dat deze rookkleur dieper werd, waarschijnlijk als gevolg van polymerisatie of autoxidatie dezer stoffen. TILGNER (1957) wijst er op, dat er een correlatie bestaat tussen de hoeveelheid van deze neutrale bestanddelen en de hoeveelheid fenolen in houtrook, en dat dit verklaart waarom Shewan het fenolgehalte kon beschouwen als de oorzaak van de kleurvorming op gerookte levensmiddelen. HUSAINI en COOPER (1957) namen waar dat bacon, die werd behandeld met de niet met stoom vluchtige rookfractie, aan de randen zwart werd. HANLEY en DRAUDT (1958) verhitten elektrostatisch gerookte ham bij temperaturen tussen 52° en 57°C. en namen waar, dat de kleur daarbij veranderde van goudgeel in zeer donkerbruin. TILGNER c.s. (1962d) tenslotte vergeleken heet gerookte haring, waarbij de disperse fase met een elektrostatisch filter uit de rook was verwijderd, met op conventionele wijze gerookte haring en constateerden dat de kleur van het eerstgenoemde produkt enigszins achterbleef bij het 'normale' produkt. Hieruit trokken zij de konklusie, dat de disperse fase belangrijk is bij de totstandkoming van de kleur.

Hiertegenover staat de waarneming van FOSTER en SIMPSON (1961), dat kippers, die in de gasfase werden gerookt, zich uiterlijk in niets onderscheidden van kippers die met de normale rook waren behandeld. Wellicht zouden we moeten konkluderen dat het aandeel van de disperse fase nogal afhangt van het produkt, of beter van de kondities waaronder het produkt bereid wordt. Niettemin blijft deze controverse enigszins raadselachtig.

SIMPSON en CAMPBELL (1962), die de oorzaak van de kleurvorming natuurlijk in componenten uit de gasfase zochten, gaven als hun mening dat carbonylverbindingen hierin een hoofdrol spelen. Zij vermoeden dat aceton, formaldehyde, furfural, hydroxymethylfurfural, vanilline, ortho-vanilline en syringaldehyde (4-formyl-2,6-dimethoxyfenol) de belangrijkste carbonylverbindingen zijn. Voorts vermelden zij dat carbonylverbindingen kunnen condenseren met stikstofhoudende extracten van spierweefsel van vis, en dat hier wellicht een verklaring voor de kleurvorming ligt; in elk geval achten zij het noodzakelijk dat deze condensatieprodukten als eerste worden onderzocht bij verdere studies over de achtergronden der kleurvorming.

Door de Poolse onderzoeker Z. ZIEMBA is de kleurvorming op gerookte produkten uitvoerig bestudeerd. Hij kon aantonen dat eiwitten een sleutelpositie innemen in de totstandkoming van de kleur op gerookte levensmiddelen (1962). In deze beschrijving maakt hij onderscheid tussen twee kleurvormingsreakties: een snelle (met eiwitten) en een langzame (tussen rookcomponenten onderling). Bij deze laatste groep zouden met name fenol/aldehydecondensaties optreden.

Bij zijn experimenten maakte hij gebruik van filtreerpapiertjes (1967c), die al of niet met gelatine waren geïmpregneerd. Op deze papiertjes werden rookoplossingen gebracht, waarna ze bij 80° werden gedroogd. De geïmpregneerde papier-

tjes ontwikkelden, nadat de rookoplossing was aangebracht, niet alleen een veel sterkere kleur dan de andere papiertjes, maar ook kwam op deze papiertjes een karakteristieke glans te voorschijn. Ziemba trekt daaruit de konklusie dat de reacties tussen rookbestanddelen en eiwitten ook voor deze glans verantwoordelijk zijn. Reacties tussen aldehyden en fenolen, volgens Shewan een van de oorzaken van deze glans (REPTS. FOOD INVESTIGATION BOARD, D.S.I.R., GREAT BRITAIN, 1954), spelen volgens hem hierbij geen rol.

Of fenol-aldehydecondensaties in de praktijk van veel belang zijn is de vraag, daar Ziemba tijdens de reactie met gelatine geen afname van het fenolgehalte vond.

Bij later onderzoek (ZIEMBA, 1964, 1966a, 1967a) bleek, dat gelatine door allerlei aminozuren kon worden vervangen, en dat dan eveneens bruine verbindingen ontstonden. Hiermee was aannemelijk gemaakt dat de kleurvorming via de vrije amino-groepen van eiwitten tot stand komt. Geheel in overeenstemming hiermee zijn waarnemingen van DVOŘÁK en VOGNAROVÁ (1965a, b), die een scherpe daling van het gehalte aan beschikbaar lysine vonden bij behandeling van vleeseiwit met rook.

Voorts werd waargenomen, dat de hoeveelheid carbonylverbindingen in een rookoplossing sneller verminderde indien hieraan gelatine werd toegevoegd. Hieruit leidt Ziemba af dat de typische 'rook'kleur (die tegelijkertijd ontstaat) voornamelijk is te danken aan het optreden van carbonyl-aminoreacties.

De kleurvorming op gerookte levensmiddelen zou dus een opvallende overeenkomst vertonen met de 'Maillard-reactie' tussen eiwitten en suikers, waar ook aminogroepen worden geblokkeerd en een bruine kleur ontstaat. Ziemba wijst er op, dat in rook diverse verbindingen zijn gevonden die ook worden genoemd in het schema van HODGE (1953), waarin een overzicht van de bij de Maillard-reactie optredende mechanismen wordt gegeven. Dit zijn dehydratatie- en fragmentatieproducten van suikers, in het bijzonder furfuralen, dehydroreduktonen, methylglyoxaal en diacetyl. Het optreden van deze verbindingen in houtrook zal geen verbazing wekken, daar hout voor meer dan de helft uit koolhydraten (cellulose, hemicellulose) bestaat. Helaas was Ziemba niet in de gelegenheid, een en ander nader te verifiëren, maar hij gaf als zijn persoonlijke mening te kennen dat met name methylglyoxaal bij deze kleurvorming een grote rol speelt (1966).

De bruiningsreactie bleek, evenals de Maillard-reactie, pH-afhankelijk (waarmee het gedrag van met natriumbicarbonaat behandelde vis is verklaard). Verder werd gevonden dat zonlicht de kleurvorming in negatieve zin beïnvloedde, doch dat zij verdiept werd door de inwerking van luchtzuurstof. Interessant was de waarneming, dat de invloed van de luchtzuurstof na het roken groter was naarmate er minder lucht bij de rookontwikkeling was toegetreden.

Op grond van het werk van Ziemba kan men zeggen, dat de rookkleur in hoofdzaak tot stand komt door reacties tussen carbonylverbindingen uit rook en vrije aminogroepen van eiwitten. TILGNER acht evenwel allerlei andere factoren even belangrijk, blijkens het volgende citaat: 'Die typische gold-gelbe bis schwärzlich-braune Färbung der Oberfläche eines geräucherten Erzeugnisses

kann nach dem jetzigen Stand unserer Erkenntnisse wie folgt erklärt werden: Manche Rauchbestandteile haben schon von sich aus eine eigene dunkle Färbung. Es handelt sich hauptsächlich um Phenol- und Carbonyl- Verbindungen. Ausserdem treten Polymerisations-Erscheinungen auf. Phenolverbindungen oxydieren und verfärben sich dadurch. Auch Farbreaktionen mit Eiweissstoffen finden statt, insbesondere von Carbonyl- und Aminverbindungen, die zu den schwarzfarbigen Melonoiden führen. Holzmaterial enthält auch Pentosane, die teilweise karamelisiert werden und damit zur dunklen Färbung beitragen' (1967).

Het is de vraag of deze opsomming een in alle opzichten juist beeld geeft van de wijze, waarop de kleur wordt gevormd.

2.6. MOTIVERING VAN EIGEN ONDERZOEK

'The changes involving surface color formation are far from clear, and need study', schreef Draudt in 1963. Hoewel het werk van Ziemba intussen veel heeft opgehelderd, is onze kennis van wat er nu precies gebeurt tijdens en na het roken, nog niet zeer groot. Omtrent de aard der actieve carbonylverbindingen bestaan slechts vermoedens; van de wijze waarop zij reageren is niet veel meer bekend dan dat zij aan aminogroepen worden gekoppeld. Over de omstandigheden waaronder de kleur tot stand komt bestaan wel gegevens, doch een verklaring ontbreekt vrijwel geheel.

Nu is de kleurvorming stellig niet het belangrijkste aspekt van de behandeling van levensmiddelen met rook, maar wel is het feit dat er kleur wordt gevormd een direkte aanwijzing dat er reacties aan het oppervlak optreden, waardoor de chemische structuur daar wellicht ingrijpend wordt gewijzigd. Het zijn deze reacties die ons interesseren. Hebben zij misschien consequenties voor de gezondheid van de konsument? Dat zou pas kunnen worden nagegaan, indien het een en ander over die reacties bekend is.

Pogingen tot verbetering van het rookproces, of tot efficiënter roken, zullen meer gericht kunnen worden ondernomen indien we beter geïnformeerd zijn omtrent de chemische achtergronden. Dat houdt meer in dan alleen maar informatie over de rooksamenstelling en de bestanddelen die voor de funktionele eigenschappen van rook verantwoordelijk zijn (Draudt). Onze informatie zal zich moeten uitstrekken tot de kennis van reacties tussen rookbestanddelen en het produkt, en de beïnvloeding van deze reacties door de omstandigheden.

Tenslotte biedt een studie van deze reacties het interessante aspekt, dat hierdoor wellicht een bijdrage kan worden geleverd aan het ophelderen van de uiterst complexe mechanismen die met de verzamelnaam 'Maillard-reactie' worden aangeduid.

Toen in het Instituut voor Visserijprodukten besloten werd, fundamenteel onderzoek over het roken te gaan verrichten, werd dan ook prioriteit gegeven aan een studie over de kleurvorming, niet alleen omdat zich hier een van de grootste hiaten in de kennis omtrent het rookproces bevindt, maar ook omdat de betekenis van een dergelijk onderzoek ver buiten de kleurvorming op zichzelf zou kunnen liggen.

De belangrijkste facetten uit het inmiddels verrichte onderzoek worden in de nu volgende hoofdstukken weergegeven. Hierin komt onder meer de identifikatie van enkele bij de kleurvorming betrokken carbonylverbindingen aan de orde. Ook wordt een schema voor de kwantitatieve analyse van deze verbindingen beschreven, terwijl voorts werd nagegaan hoe de hoeveelheden van deze stoffen zich verhielden ten opzichte van enkele andere rookcomponenten. Daar op het gebied van de rookanalyse veel verwarring heerst, werden allerlei bestaande methoden aan een kritisch onderzoek onderworpen.

Daarnaast werd een begin gemaakt met de bestudering van de voor en tijdens de bruining optredende reacties. Een aantal konklusies konden worden getrokken, die wellicht bruikbaar zijn als basis voor verder onderzoek.

Tenslotte werden nog enige experimenten uitgevoerd met het doel, het aandeel van de disperse fase van rook in kleurvorming te bestuderen.

3. ORIENTEREND ONDERZOEK

3.1. BIJ DE EXPERIMENTEN GEBRUIKTE ROOKINSTALLATIES

Bij vrijwel alle in dit hoofdstuk beschreven experimenten hebben wij gebruik gemaakt van een van de beide in het Instituut voor Visserijprodukten aanwezige rookinstallaties:

a. een klassieke rookkast of hang, fabrikaat Räucherschmidt, Rheinhausen, Duitse Bondsrepubliek (zie figuur 11). In deze kast wordt vrijwel uitsluitend heet gerookt (makreel, haring, paling). Op het rooster wordt het houtvuur aangelegd; daaronder bevindt zich een serie gasbranders die een voordroging van het produkt mogelijk maken. Bij de rookkast hoort nog een kleine stoomgenerator, waarmee zonodig stoom in de kast kan worden geleid.

Deze rookkast zal in de verdere beschrijving als 'hang' worden aangeduid.

b. een experimentele rooktunnel, volgens het onder 1.3.1 beschreven principe (figuur 12). Naast de tunnel bevindt zich de rookgenerator, een simpele kast

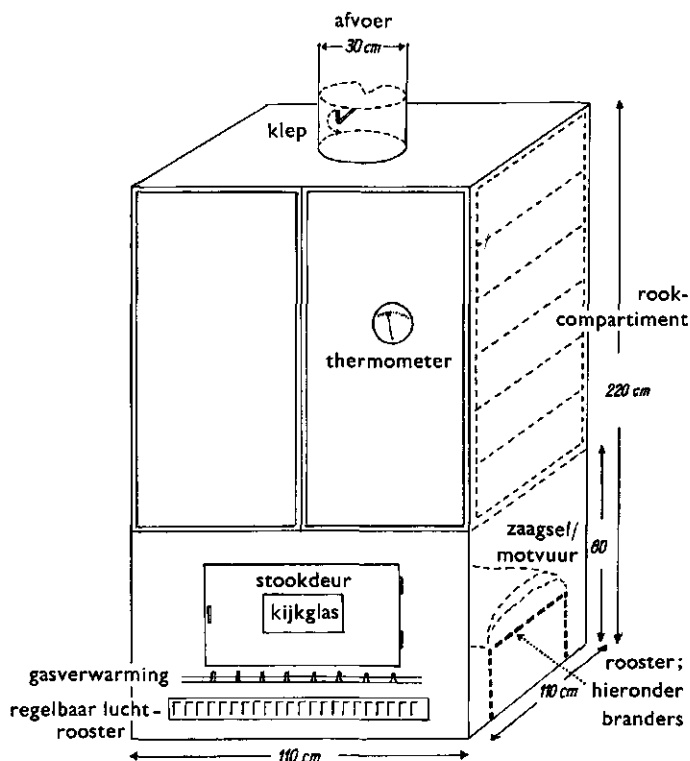


FIG. 11. Schematische voorstelling van de bij de experimenten gebruikte rookkast. In de zijkant is aangegeven, hoe de kast van binnen is ingedeeld.

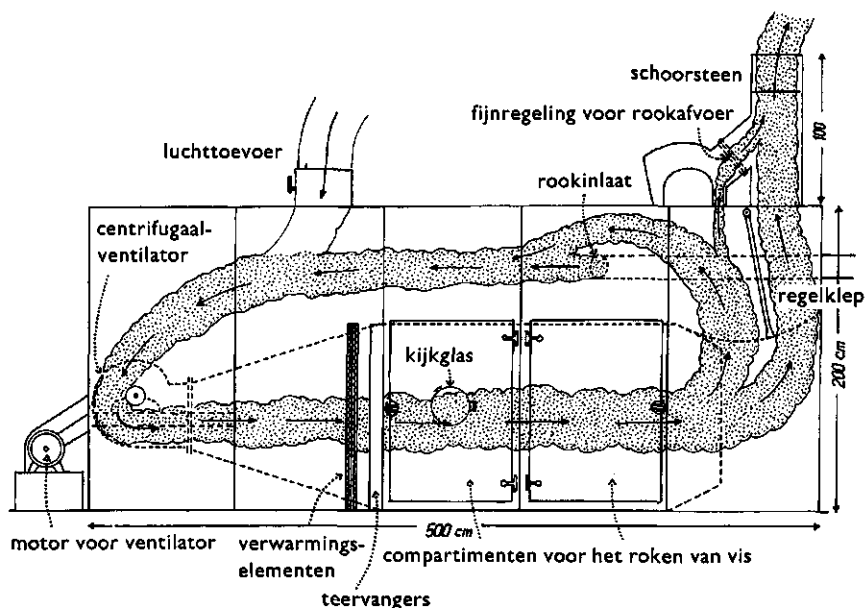


FIG. 12. Zijaanzicht van de bij de experimenten gebruikte tunnel. De richting der rookcirculatie is hierop aangegeven.

zoals bij 1.4.2.1 afgebeeld, die door middel van een pijp met de tunnel is verbonden.

Deze installatie, die verder als 'tunnel' zal worden aangeduid, leent zich zowel voor heet als voor koud roken.

3.2. OMSTANDIGHEDEN WAARONDER DE KLEUR TOT STAND KOMT

De kleurontwikkeling op gerookte vis is onder meer afhankelijk, en wel in sterke mate, van het vochtgehalte van de vis voor de aanvang van het roken. Zeer droge vis krijgt, althans bij het roken in de tunnel, nauwelijks 'kleur'. Ook bij zeer natte vis blijft de kleurvorming achter, hoewel hierbij moet worden vermeld dat de vis tijdens het rookproces verder zal uitdrogen en gaandeweg een voor de kleurontwikkeling gunstiger vochtgehalte bereikt.

Het vrijwel niet tot stand komen van een rookkleur bij te droge vis heeft een voor de hand liggende oorzaak: de mogelijkheden tot gasabsorptie zijn hier klein en derhalve komen weinig rookstoffen op de vis terecht. Dat de kleurvorming bij natte vis minder snel verloopt, zou kunnen worden verklaard door aan te nemen dat diffusie van kleurvormende bestanddelen in de vis een duidelijke rol gaat spelen. Men zou zich kunnen voorstellen dat voor deze stoffen twee mogelijkheden openstaan: of reacties aan het oppervlak, of diffusie naar binnen. Welke van de twee mogelijkheden overweegt, zal afhangen van de vochtigheidsgraad van de vis. Intussen is het ook mogelijk dat in dieper gelegen lagen reacties

gaan optreden; er kunnen bruine plekken in de vis ontstaan (die als ongewenst moeten worden beschouwd), de concentratie kan echter ook te laag zijn om nog tot een duidelijke kleurontwikkeling te leiden.

Deze zienswijze wordt bevestigd door ZIEMBA (1966a). Hij stelt, dat niet alleen de op het produkt gedeponeerde hoeveelheden rook van belang zijn bij de kleurvorming, maar vooral ook de verhouding rookafzetting/diffusie naar binnen. Verder vermeldt hij, dat een intensieve kleurontwikkeling pas optreedt tijdens uitdroging van het oppervlak, en niet zolang dit nog vochtig is, ondanks opname van steeds nieuwe hoeveelheden rookbestanddelen.

De invloed van diffusie en uitdroging op de kleurontwikkeling kan worden gedemonstreerd door een serie eenvoudige experimenten. Hierbij bedienen we ons van het in figuur 13 getoonde hulpmiddel. Dit bestaat uit twee platen van polystyreen, resp. 3,0 en 0,6 cm dik, die met vier schroeven op elkaar zijn bevestigd. In de dunne plaat bevindt zich een ronde opening met een diameter van 5,64 cm (oppervlak 25 cm²), die correspondeert met een uitsparing in de dikke plaat, 1 cm diep en met dezelfde diameter. De uitsparing kan worden gevuld met bijvoorbeeld een uit vis-eiwitconcentraat en water vervaardigde eiwitpasta. Tussen de beide platen wordt een kunst darm geklemd. (Deze kunst darmen worden veelvuldig bij de worstfabrikage gebruikt en bestaan in vele variëteiten en afmetingen).

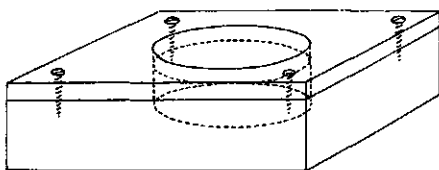


FIG. 13. Blok van polystyreen voor de bestudering van de kleurontwikkeling op kunst darm.

Indien we werken met een pasta die ca 20 % eiwit bevat, en deze afdekken met een eiwithoudende kunst darm, bijvoorbeeld een collageendarm, verkrijgen we een model dat, chemisch gezien, enige overeenkomst vertoont met een magere vis. Hoewel het in principe ook mogelijk is om van deze materialen een soort worst te maken, verdient het hier beschreven model o.i. de voorkeur vanwege zijn grotere handelbaarheid.

Door de verhouding water/eiwit te wijzigen is het mogelijk, een indruk te verkrijgen van de invloed van het vochtgehalte van het te roken materiaal op de kleurvorming.

Bij onze experimenten gebruikten we als eiwit een in het Instituut voor Visserijprodukten vervaardigd vis-eiwitconcentraat (bereid uit wijting; gehalte aan ruw eiwit 90%, vochtgehalte 9,2%), terwijl de vishuid werd voorgesteld door collageendarm ('Cutisin', fabrikant A.G. Koospol, Praag). De dikte van deze darm was 0,10 mm, hetgeen ongeveer overeenkomt met de huiddikte van vele vissoorten.

In het eerste experiment werden pasta's met resp. 15, 20, 25 en 30 % eiwit op de bovenbeschreven wijze met Cutisindarm afgedekt en vervolgens 1 uur in de hang gerookt, bij een temperatuur die opliep van 40° tot omstreeks 80°. Verder

werd in een vijfde modelblok water gebracht en daarover een stuk darm gespannen; in een zesde blok werd de ruimte onder de darm leeggelaten.

De kleur na afloop van het rookproces werd vastgelegd met behulp van de 'Reinhold Color Atlas' van Kornerup en Wanscher (Reinhold Publishing Corporation, New York).

– Ter toelichting op deze wijze van kleurvastlegging het volgende: In de atlas is aan dertig verschillende kleuren een kaart met 48 schakeringen gewijd. Deze schakeringen ontstaan door meer of minder grijs toe te voegen, door de kleurintensiteit te veranderen, of door combinaties van beide. Kaart 4 geeft de kleur oranjegeel, 5 geeloranje en 6 oranje. De toenemende grijsheid wordt weergegeven door de letters A t/m F en de intensiteit door de cijfers 1 t/m 8. De kleuren, die geen grijs bevatten, worden op bijvoorbeeld kaart 4 weergegeven door 4A1 t/m 4A8, waarvan 4A8 de meest intense kleur representeert. Alle mogelijke bruine schakeringen zijn op deze kaarten 4 t/m 6 aanwezig. –

Door ons werden de volgende kleuren na het roken waargenomen:

Samenstelling model	Kleur van de darm na roken	Code
water onder de darm	vaalbruin	4E4
15% eiwitpasta onder de darm	id.	4E5
20% eiwitpasta onder de darm	id.	4E5
25% eiwitpasta onder de darm	id.	4E5
30% eiwitpasta onder de darm	diepbruin	4/5E8
Droge darm	geelbruin	4C6/7
Niet gerookte darm	licht grijsgeel	3D3

De oppervlakte van de eiwitlaag onder de darm was bij de variaties 15, 20 en 25% lichtbruin verkleurd; bij de variatie met 30% eiwit waren slechts enkele gekleurde plekken aanwezig.

We konkluderen dat pas bij deze laatste variatie de diffusie voldoende beperkt wordt om een goede kleurontwikkeling aan de oppervlakte mogelijk te maken. De nog vrij aanzienlijke kleurontwikkeling op de 'droge' darm zou kunnen wijzen op reacties met neergeslagen deeltjes uit de rook. Het is echter evenzeer mogelijk dat de rookgassen enigszins worden geabsorbeerd. (De Cutisin-darm bevatte voor de aanvang van de proef 17% vocht).

In een tweede experiment werden dezelfde zes variaties 1 uur bij ca 80° gerookt, nu in de tunnel. De rook is hier wat minder dicht, maar vooral veel droger.

Waargenomen kleur na roken:

Samenstelling model	Kleur van de darm na roken	Code
water onder de darm	licht geelbruin	3D4
15% eiwitpasta onder de darm	lichtbruin	4D5
20% eiwitpasta onder de darm	id.	4D6
25% eiwitpasta onder de darm	id.	4E6
30% eiwitpasta onder de darm	id.	4D6
Droge darm	geen kleurontwikkeling	–

De kleurontwikkeling is hier duidelijk minder dan in het vorige experiment. Opvallend is het ontbreken van een rookkleur op het droge stuk darm. Een en ander wijst erop, dat de absorptie van gassen aan het oppervlak door de snelle uitdroging zal worden bemoeilijkt – en in het geval van de droge darm wordt verhinderd, doordat daar de mogelijkheid van vochtanvoer ontbreekt. Ook de lagere rookdichtheid zal hier wel een rol spelen.

Voorts werd nog een derde experiment ondernomen waarbij de zes blokken $2\frac{1}{2}$ uur lang bij een relatief lage temperatuur werden gerookt (in de tunnel; temperatuur oplopend van 25° tot 35°). De kleurontwikkeling was in alle gevallen zeer gering. Dit demonstreert de temperatuurafhankelijkheid van deze reactie. Overigens is van koud gerookte vis bekend dat de rookkleur na enige dagen wel degelijk te voorschijn komt.

De bij deze drie experimenten gebruikte rookcondities werden nu ook toegepast op eiwitpasta's die niet met een Cutisin huidje waren afgedekt. Op deze wijze kon een voorstelling worden gemaakt van het roken van een opengelegde vis.

Experiment IV: 1 uur in de hang gerookt. (Temperatuur oplopend van 50° tot 76°).

Eiwitgehalte pasta voor roken	Vochtverlies tijdens roken	Kleur na roken	Code
15 %	37 %	lichtbruin	5B3
20 %	37 %	id.	5B3
25 %	36 %	iets donkerder bruin	5B4
30 %	28 %	donker bruin	6D8

Experiment V: 1 uur bij 80° in de tunnel gerookt.

15 %	51 %	licht geelbruin	4A4
20 %	50 %	lichtbruin	4B6
25 %	42 %	bruin	5C5
30 %	30 %	vrij donkerbruin	6D6

Experiment VI: $2\frac{1}{2}$ uur bij omstreeks 30° in de tunnel gerookt.

15 %	18 %	zeer licht gekleurd	4A2
20 %	19 %	licht geelbruin	4A3
25 %	18 %	id.	4A3
30 %	19 %	iets donkerder bruin	4B5

Met name uit de proeven IV en V blijkt dat er tussen de mate van indroging en de intensiteit van de kleur aan de oppervlakte een duidelijk verband bestaat.

De betekenis van de percentages vochtverlies is nogal betrekkelijk: deze gelden de totale eiwitpasta, en niet de oppervlaktelaag waar de kleurontwikkeling tot stand komt.

Uit een en ander zal duidelijk zijn dat we de zienswijze van Ziemba omtrent de omstandigheden, waaronder de kleur ontstaat, kunnen delen. Het is echter

goed, te bedenken dat de praktische situatie nog heel wat ingewikkelder zal zijn. Zo wijst ROLFE (1958) er bijvoorbeeld op, dat tijdens de migratie van water naar het oppervlak van het levensmiddel, zouten en oplosbare eiwitten worden meegetransporteerd; deze stoffen worden dan, tijdens de verdamping, aan het oppervlak geconcentreerd. Ongetwijfeld zal ook dit verschijnsel de kleurvorming beïnvloeden.

3.3. AANDEEL VAN HET GEROOKTE PRODUKT IN DE KLEURVORMING

Door ZIEMBA (1962, 1964, 1966a, 1967b, c) is gevonden, dat met name de eiwitten een belangrijke rol spelen bij de kleurvorming op gerookte levensmiddelen, vermoedelijk via hun vrije aminogroepen. We hebben deze zienswijze kunnen bevestigen en tevens kunnen preciseren. Het werken met verschillende soorten kunstdarm gaf een goede mogelijkheid tot oriëntatie. We onderzochten monsters papiervezeldarm (fabrikant Vaessen-Schoemaker, Deventer), cellofaandarm („Nalo”; van dezelfde fabrikant), en twee kunstdarmen op collageebasis (de reeds genoemde Cutisindarm en „Naturin”; fabrikant Naturinwerke, Becker & Co, Weinheim, West-Duitsland). Stukjes van deze darmen werden in de polystyreenblokken geklemd; onder de darmen werd een pasta van 30 % vis-eiwit in water aangebracht. Daarna werden de blokken een uur in de hang gerookt; de temperatuur tijdens het roken verliep van 50° (begin) tot bijna 80° (eind).

Na het roken werd de kleur op de darmen beoordeeld. Ze werden vervolgens een kwartier in alcohol gelegd en daarna goed uitgespoeld, om teerdeeltjes etc. te verwijderen. De kleur werd nu weer beoordeeld.

De beoordeling was als volgt:

Darm	Kleur na roken	Code	Kleur na behandeling met alcohol	Code
Naturin	helder bruin	4B6/7	helder bruin	4B6
Cutisin	id.	4B7	id.	4B7
Papiervezel	licht geelbruin	4B3	kleur nagenoeg afwezig	—
Cellofaan	id.	4B2/3	id.	—

De aanwezigheid van eiwit blijkt dus inderdaad zeer belangrijk voor het ontstaan van de kleur.

Een gelukkige bijkomstigheid is nog, dat het bovine collageen, de basis voor de beide eiwitdarmen, verwant is met de huideiwitten van vis (ichthyocollageen); het is dan ook aannemelijk dat de verkleuring van de vishuid tijdens het roken op dezelfde wijze verloopt.

3.3.1. De rol der aminogroepen

Hoewel het door het werk van ZIEMBA (1967a) waarschijnlijk is geworden, dat de vrije aminogroepen voor de kleurvorming op gerookte produkten verantwoordelijk zijn, ontbreekt het strikte bewijs nog — een bewijs dat echter zal kunnen worden geleverd zodra we eiwitmaterialen kunnen bestuderen waarvan de vrije aminogroepen zijn geblokkeerd of verwijderd.

Nu is dit laatste in principe zeer eenvoudig, dank zij de bekende reactie van Piria, waarin een amine met salpeterigzuur wordt omgezet in een alkanol, terwijl de stikstof als N_2 ontwijkt. Alleen echte primaire aminen vertonen de reactie; amidogroepen worden niet aangegrepen en de guanidinogroep van arginine evenmin (KOSSEL en GAWRILOW, 1912). In een eiwit zullen dus de vrije ϵ -aminogroepen van lysine worden verwijderd, en ook de eindstandige aminogroepen der peptideketens.

Met de volgende methode, uitgevoerd in navolging van een voorschrift van de Association of Official Agricultural Chemists (Official methods of analysis, 1955), konden de vrije aminogroepen van eiwitten zeer goed worden verwijderd:

5 g visieiwitconcentraat werd gesuspenderd in 80 ml natriumnitrietoplossing (30% w/v), en tot 0° afgekoeld. Daarna werd langzaam 20 ml ijsazijn toegevoegd. Na 1½ uur roeren bij 0° werden de eiwitten afgecentrifugeerd, twee maal gewassen met gedestilleerd water en daarna gedroogd.

De hoeveelheid vrije aminogroepen werd bepaald vlg. CARPENTER (1960), door koppeling aan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeen; de gevonden waarden werden berekend als lysine ('available lysine'). Het bleek dat het lysinegehalte, door de behandeling met het nitriet-azijnzuurmengsel, daalde van 8,6% tot 0,19%.

Helaas ontwikkelde het eiwit tijdens de deaminering een intens gele kleur, die niet kon worden verwijderd. Deze gele kleur werd ook waargenomen door PHILPOT en SMALL (1938) bij de inwerking van salpeterigzuur op pepsine. Zij toonden aan dat tijdens de deaminering diazoverbindingen ontstaan, waarin de fenolgroep van tyrosine is betrokken. – Door deze kleurontwikkeling is het ge-deamineerde eiwit voor ons doel vrijwel onbruikbaar.

De Cutisindarm was in dit opzicht beter geschikt. Ten eerste is het tyrosinegehalte van collageen veel lager dan dat van de spiereiwitten waaruit ons eiwitconcentraat voor het grootste deel bestaat (BELITZ en SCHORMÜLLER, 1965); bovendien is de plaats van de eiwitmoleculen ten opzichte van elkaar meer gefixeerd, zodat de kans op diazokoppelingen om ruimtelijke redenen kleiner zal zijn. Inderdaad bleek de kleurontwikkeling tijdens het deamineren gering, doch ook het deamineren zelf verliep moeizamer. Twee maal 3½ uur behandelen met het nitriet-azijnzuurmengsel bleken nodig om het lysinegehalte op een voldoende laag peil te brengen. Naast de lysinebepaling werd, op de oorspronkelijke en de gedeamineerde darm, ook een argininebepaling uitgevoerd, teneinde ons ervan te vergewissen dat de arginineresten gedurende de behandeling intact bleven. We deden dit volgens het voorschrift van AKAMATSU en WATANABE (1961) die hierbij uitgingen van de Sakaguchi-reactie (kleurontwikkeling met chinoline en natriumhypobromiet).

De volgende gehalten werden gevonden:

	Lysine	Arginine
Cutisindarm	2,7%	5,5%
Dezelfde darm, na eenmaal deamineren	0,73%	
Id. na tweemaal deamineren	0,16%	5,4%

Zowel de onbehandelde als de gedeamineerde darm werden nu ingespannen en een uur lang in de hang gerookt. In de holte onder de darmen bevond zich ditmaal een 2%-agargel. Na het roken bleek het aan de rook blootgestelde gedeelte van de onbehandelde darm sterk bruin verkleurd, terwijl de gedeamineerde darm vrijwel geen kleurontwikkeling vertoonde. Een lichte aanslag kon worden verwijderd met wat methanol.

Hiermee is bewezen, dat de kleur bij het roken van eiwithoudende levensmiddelen slechts tot stand komt via de vrije aminogroepen, en ook dat de guanidino-groepen van arginine hierbij geen rol spelen. Mogelijk verlopen nog andere reacties tussen functionele groepen van het eiwit en rookbestanddelen (voor wat betreft de sulfhydrylgroep is dat zelfs zeer waarschijnlijk (SCHUBERT, 1935; KRYLOWA c.s., 1962; SZENT-GYÖRGYI c.s., 1967), doch deze reacties dragen niet bij tot de kleurvorming.

In een andere proef werd het lysine- en argininegehalte van een gerookte Cutisindarm vergeleken met de gehalten aan deze aminozuren van een onge-rookt stuk darm:

	Lysine	Arginine
Darm voor roken	2,9%	6,6%
Darm na roken	1,0%	6,6%

Uit deze cijfers volgt dat arginine, behalve dat het niet in de kleurvorming is betrokken, ook niet participeert in andere reacties. Dit resultaat is merkwaardig, daar door FRAENKEL- CONRAT, COOPER en OLCOTT (1945) wordt geponeerd dat onder andere de guanidylgroep zich vlot verbindt met formaldehyde. Rook bevat een vrij aanzienlijke hoeveelheid van deze verbinding, zoals we in hoofdstuk 4 zullen zien.

Vermeldenswaard is in dit verband ook nog een onderzoek van LEA, HANNAN en RHODES (1951). Zij gingen na welke reacties optraden tussen glucose en caseïne waarvan de vrije aminogroepen waren geblokkeerd door reacties met azijnzuuranhydride. Hier bleek een zeer langzame bruiningsreactie te verlopen, waarbij het gehalte aan vrije arginineresten geleidelijk afnam.

3.4. AANDEEL VAN ROOKBESTANDELEN IN DE KLEURVORMING

3.4.1. *Opvangen van rook*

Uiteraard is het vochtige oppervlak van een eiwithoudend levensmiddel zelf niet zeer geschikt om rook op te vangen; we kunnen immers verwachten dat reeds tijdens het roken reacties met de eiwitten zullen gaan optreden. Maar ook indien we deze faktor konden uitschakelen, door alle reactieve groepen te verwijderen of te blokkeren, zouden in dit medium, met zijn beperkte diffusiemogelijkheden en zijn snelle uitdroging aan de oppervlakte, hoge concentraties aan rookbestanddelen ontstaan. Allerlei reacties tussen rookcomponenten onderling zijn daarvan ongetwijfeld het gevolg, zodat toch een scheef beeld wordt verkregen van de samenstelling der geabsorbeerde stoffen.

Aan de opvangmethode moeten we derhalve de eis stellen, dat reacties tussen

de opgevangen rookbestanddelen tot een minimum dienen te worden beperkt. Deze eis is op de eenvoudigste wijze te realiseren door, evenals FOSTER en SIMPSON (1961a), gebruik te maken van met water gevulde Petrischalen. Na afloop van het rookproces kan dan worden nagegaan, welke stoffen een bruine kleur met aminoverbindingen kunnen geven.

3.4.2. *Onderzoek naar actieve rookbestanddelen*

Uitgaande van de veronderstelling dat carbonylverbindingen bij de kleurvorming een zeer belangrijke rol spelen, poogden we allereerst, enig inzicht te verkrijgen in de samenstelling der in rook aanwezige, tot deze groep behorende verbindingen.

Indien aan water, waarin rookbestanddelen zijn opgelost (deze vloeistof wordt verder aangeduid als „rookwater”) een oplossing van 2,4-dinitrofenylhydrazine (2% in 40% w/w H_2SO_4) wordt toegevoegd, ontstaat vrijwel onmiddellijk een volumineus oranje neerslag.

In een van onze eerste proeven werd dit neerslag, nadat het reaktiemengsel enige tijd (20 minuten) in een kokend waterbad was verwarmd en vervolgens bij 0° afgekoeld, afgefiltreerd, gedroogd en daarna onderzocht. Het bleek voor een gering deel oplosbaar in ethanol of petroleumether (kpt. 60°–80°), iets beter in ethylacetaat, en redelijk goed in dimethylformamide of pyridine.

Met behulp van dunnelaagchromatografie werd het neerslag nader onderzocht. Na enkele minder geslaagde pogingen bleek chromatografie op een zinkcarbonaatplaat met als loopvloeistof benzeen/pyridine 8:1 een geschikte methode om een hoeveelheid neerslag in zijn componenten te scheiden.

Een aantal neerslagen werd op deze wijze onderzocht. In alle gevallen traden twee componenten sterk op de voorgrond. De R_f -waarden van deze componenten waren variabel, hetgeen zijn verklaring vindt in de wisselende activiteit van de zinkcarbonaatlaag. De R_f -waarde voor de bovenste vlek bedroeg doorgaans omstreeks 0,8, die van de onderste vlek 0,6. Bij het drogen van de ontwikkelde plaat aan de lucht ontstond een voorbijgaande blauwe verkleuring van de beide vlekken, waaruit we konkludeerden dat het hier om bis-derivaten van α -dicarbonylverbindingen ging.

Vervolgens lieten we de bis-hydrazonen van enkele eenvoudige α -dicarbonylverbindingen: glyoxaal, methylglyoxaal en diacetyl, meelopen op het chromatogram; we konden op deze wijze vaststellen dat de onderste vlek overeenkwam met die van het glyoxaal- en de bovenste met die van het methylglyoxaalderivaat. De R_f -waarden waren hetzelfde en ook de voorbijgaande blauwe kleur vormde een goede indicatie voor de aard der vlekken: glyoxaal-bis-hydrazon wordt diepblauw en het methylglyoxaalderivaat paarsblauw.

Behalve deze twee vlekken is op het dunnelaagchromatogram vrijwel steeds een bruine startvlek te zien met vlak daarboven enkele onduidelijke vlekjes; boven de methylglyoxaalvlek zijn vaak nog vlekken aanwezig die door hydrazonen van monocarbonylverbindingen worden veroorzaakt. Uit de chromatogrammen bleek zeer duidelijk, dat de glyoxaal- en de methylglyoxaalvlek veruit de meerderheid van de neergeslagen derivaten vertegenwoordigen.

Een proef, op het Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO (CIVO) te Zeist met een zinkcarbonaatkolom uitgevoerd, gaf ongeveer hetzelfde beeld te zien. Behalve twee dikke blauwe banden was hier ook nog een zeer smal blauw bandje te zien dat zich sneller verplaatste dan de andere blauwe banden. Als loopvloeistof werd een mengsel van petroleumether (kookpunt 60°-80°), benzeen en pyridine (8:1:1) gebruikt, dat tijdens het experiment werd vervangen door benzeen/pyridine 9:1, teneinde de elutie sneller te doen plaatsvinden (DHONT en DIJKMAN, 1965).

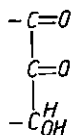
De beide dikke banden werden uitgesneden en de aldus geïsoleerde derivaten massaspectrometrisch onderzocht. De snelstlopende derivaten bleken in hoofdzaak uit een stof met M.G. = 432 te bestaan; de andere fraktie bevatte als belangrijkste component een stof met M.G. = 418. Deze molecuulgewichten wijzen op de aanwezigheid van de bis-dinitrofenylhydrazonen van methylglyoxaal resp. glyoxaal.

De spectra werden opgenomen met een Atlas CH4- enkelfocus massaspectrometer.

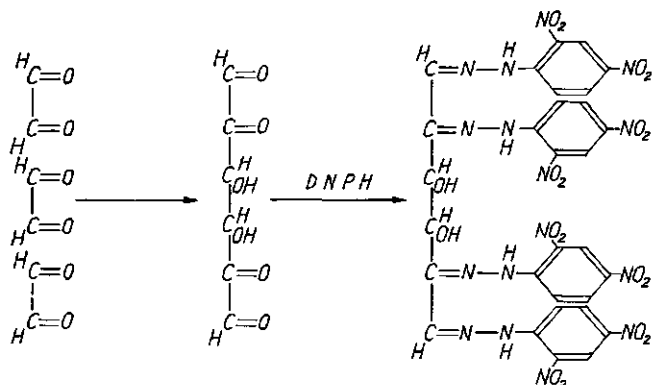
3.4.2.1. Het verband tussen het optreden van de blauwe kleur in alkalisch milieu en de structuur van het carbonylderivaat

Het is bekend dat oplossingen van dinitrofenylhydrazonen in een neutraal solvens geel zijn, doch door toevoeging van alcoholische loog een andere kleur verkrijgen, die kan variëren van helder rood (verzadigde aldehyden) tot roodviolet (meervoudig onverzadigde aldehyden). Van de bis-derivaten van α -hydroxy- of α -dicarbonylverbindingen, waartoe ook de osazonen behoren, is bekend dat zij in alkalisch milieu een blauwpaarse kleur vertonen. Deze kleurverschuiving is een gevolg van ionisatie der moleculen, die ook optreedt op de zinkcarbonaatzuil of -plaat indien zich pyridine in het solvens bevindt en water nagenoeg afwezig is.

Door DIEMAIR en SCHAMS (1962) is geponeerd, dat de blauwe kleur alleen optreedt bij bisderivaten van carbonylverbindingen met de volgende structuur:



Dat glyoxaal-bis-hydrazon ook deze blauwe kleur geeft, wordt door deze auteurs aannemelijk gemaakt door een voorafgaande trimerisatie van glyoxaal te veronderstellen, waarna een tetra-derivaat zou ontstaan:



Er ontstaat dus geen bis-hydrazon van glyoxaal zelf; dit zou in alkalisch milieu een rode kleur vertonen, zoals alle bis-derivaten waarin geen OH-groep aanwezig is.

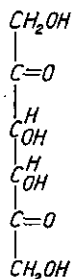
RONKAINEN c.s. (1964) zijn echter op goede gronden van mening dat het bis-hydrazon van glyoxaal wel degelijk zelf verantwoordelijk is voor de blauwe kleur en dat de door Diemair en Schams gestelde noodzaak van een hydroxylgroep aan het naburige C-atoom niet aanwezig is.

Daar in een latere publikatie (RADTKE c.s., 1966), toch weer wordt beweerd dat slechts α -hydroxydicarbonylverbindingen de blauwe kleur kunnen produceren, hebben wij zelf hieromtrent ook enige experimenten verricht; de theorie van Diemair en Schams zou immers ook voor ons onderzoek konsekwenties kunnen hebben.

Hun theorie blijkt echter onhoudbaar en wel om de volgende reden:

De verbinding 5-ketofructose hoort een dubbelosazon op te leveren, dat identiek is met het hierboven geformuleerde tetraderivaat van het glyoxaaltrimeer.

Het derivaat bleek evenwel volkomen af te wijken van het glyoxaalderivaat.



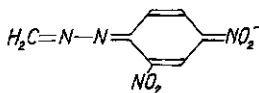
5-ketofructose

Dit laatste is helder oranje van kleur, het andere is bruin. Een oplossing van het glyoxaalderivaat in pyridine wordt na toevoeging van wat alcoholische loog diepblauw; bij 5-ketofructose ontstaat echter een violette kleur. Op de zink-carbonaatkolom is het glyoxaalderivaat als een enkele blauwe band zichtbaar. Het uit 5-ketofructose verkregen neerslag blijkt een zeer gekompliceerd mengsel van verbindingen, die uiterst langzaam door de kolom lopen en in kleur variëren van vuilpaars tot blauwgrijs. Tenslotte geeft het massaspectrum van het glyoxaalderivaat een zeer duidelijke piek bij M.G. = 418 te zien, hetgeen overeenkomt met het berekende molecuulgewicht van glyoxaal-bis-DNP-hydrazon. Het massaspectrum van het derivatenmengsel van 5-ketofructose geeft enkele fragmentpieken bij M.G. = 446 en 428, die in het andere spectrum niet aanwezig zijn.

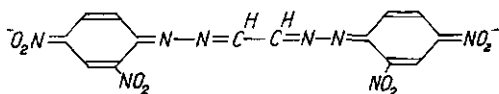
Voor het bereiden van beide derivaten werd de werkwijze van SPANYÁR, KEVEI en KISZEL (1960a) gevolgd. Het 5-ketofructose werd ons ter hand gesteld door Dr. C. G. WHITING van de Universiteit van Bristol, die het bereide volgens een door hem en COGGINS (1963) beschreven procedure. Het gebruikte glyoxaal was van BDH afkomstig (glyoxaalmonohydraat, kristallijn).

Voor het optreden van de blauwe kleur is dus geen OH-groep aan een naburig C-atoom nodig. Daarom ontstaat zij ook bij de bis-derivaten van methylglyoxaal en diacetyl, zoals trouwens al uit vele publikaties blijkt (STRAIN, 1935; MARTIN, 1958; SCHWARTZ, 1962; SCHWARTZ, KEENEY en PARKS, 1964). Voorafgaande di-, tri- of polymerisaties zijn hierbij niet nodig.

Deze blauwe kleur vindt dan ook een veel meer voor de hand liggende verklaring in het feit dat het systeem van geconjugeerde dubbele bindingen bij geïoniseerde bis-hydrazonen van α -dicarbonylverbindingen veel langer is dan dat van monocarbonylhydrazonen (TIMMONS, 1957):



geïoniseerde vorm van formaldehyde-DNP-hydrazon



geïoniseerde vorm van glyoxaal-bis-DNP-hydrazon

Daarom is deze kleur ook karakteristiek voor α -dicarbonylverbindingen. Bij bis-derivaten van andere dicarbonylverbindingen zal zij niet optreden. Inderdaad blijken de bis-derivaten van de γ -dicarbonylverbindingen barnsteendialdehyde (butaandial) en acetonylaceton (hexadion-2,5), in een geschikt solvens opgelost, na toevoeging van alcoholische loog geen blauwe maar een rode kleur te vertonen.

Een uitzondering vormen de γ -dicarbonylverbindingen met een dubbele binding tussen het tweede en het derde koolstofatoom, waar eveneens doorgaande

conjugatie van dubbele bindingen in het derivaat optreedt. Dit is waargenomen bij p-benzochinon en p-naftochinon (JOHNSON, CRITCHFIELD en RUCH, 1962).

3.4.2.2. Herkomst van glyoxaal- resp. methylglyoxaal-bis-hydrazon

Behalve α -dicarbonylverbindingen zijn ook α -hydroxycarbonylverbindingen in staat om met 2,4-dinitrofenylhydrazine (verder als DNPH aangeduid) een bis-hydrazon te geven, op dezelfde wijze als de osazonreactie bij suikers. Het is volkomen korrekt om de bis-hydrazonen van glyoxaal en methylglyoxaal als glyoxaalosazon resp. methylglyoxaalosazon aan te duiden, en dit zal dan ook verder worden gedaan.

Ook acetoïne (3-hydroxybutanon-2) kan op deze wijze in diacetyl-bis-hydrazon worden omgezet. Daar diacetyl geen oson is, mag men het ontstane derivaat in feite geen osazon noemen. Toch wordt dit vaak gedaan, bijvoorbeeld door SPANYÁR c.s. (1960a) en voor dit gebruik is veel te zeggen als men bedenkt dat de bis-derivaten van α -dicarbonylverbindingen een geheel eigen groep vormen; een eigen naam is dus op zijn plaats, ook al is er, zuiver formeel gezien, wel wat op die naam aan te merken.

Uit het voorgaande volgt, dat de vlek van methylglyoxaalosazon kan zijn veroorzaakt door methylglyoxaal, maar evengoed door de overeenkomstige α -hydroxycarbonylverbinding acetol. Zelfs esters van acetol bleken tot osazonvorming in staat, zoals volgde uit een proef waarin uit acetolacetaat op zeer eenvoudige wijze methylglyoxaalosazon kon worden bereid.

Het is echter mogelijk om de oxidatie van α -hydroxycarbonylverbindingen door DNPH te verhinderen. WOLFROM en ARSENAULT (1960) waren in staat, de mono-DNPH-derivaten van glycolaldehyde, acetol, dihydroxyaceton en DL-glycerose te bereiden door gebruik te maken van o.a. een oververzadigde oplossing van DNPH in 2 N zoutzuur, en bij 0° te werken. Onder deze condities trad geen osazonvorming op.

Wij vonden dat, bij behandeling van oplossingen van glycolaldehyde of acetol met zoutzuur DNPH-reagens, na een uur bij 0° vrijwel geen neerslag optrad, dus ook niet van het mono-derivaat, terwijl glyoxaal en methylglyoxaal in de kou wel osazonen geven. Op grond van deze eigenschap kon een methode worden uitgewerkt waarbij glyoxaal, methylglyoxaal, glycolaldehyde en acetol kwantitatief naast elkaar worden bepaald. Deze methode wordt onder 4.2.2 uitvoerig beschreven.

Een scheiding tussen α -hydroxycarbonylverbindingen en esters van deze verbindingen is op deze wijze niet mogelijk.

Uit een kwalitatief onderzoek verkregen we reeds de indruk dat weinig glyoxaal en veel glycolaldehyde aanwezig is, terwijl de hoeveelheden acetol en methylglyoxaal in dezelfde grootteorde moeten liggen.

3.4.2.3. Testen van actieve verbindingen

Van de verbindingen glyoxaal, glycolaldehyde, methylglyoxaal en acetol, waarvan althans de laatste drie in relatief grote hoeveelheden in rookwater aan-

wezig moeten zijn, kan, op grond van verscheidene publikaties, worden verwacht dat zij gemakkelijk met aminogroepen tot bruine verbindingen reageren (ENDERS, 1938, 1942, 1943a; SATTler en ZERBAN, 1949; BEACHAM en DULL, 1951; TRAITTEUR, 1951; CARSON, 1953).

Een van de mogelijkheden om rookoplossingen op hun bruinend vermogen te onderzoeken, is de reeds onder 2.5 genoemde gelatine/filtreerpapier-test van Ziemba. Deze verloopt als volgt:

Schijfjes filtreerpapier, met een diameter van 5,5 cm, worden bedekt met een laagje gelatine (134 mg per dm²). Op het filtreerpapier wordt 0,4 ml van een rookoplossing gebracht, waarna het geheel gedurende drie minuten bij 80° wordt gedroogd.

De kleurmeting geschiedt met een Lovibond-Schofield tintometer. De bruining zonder aminogroepen kan worden bepaald door 0,4 ml rookoplossing te brengen op niet met gelatine behandelde filtreerpapiertjes, waarna dezelfde procedure volgt.

Enige van de door ons verkregen rookwatermonsters werden aan deze behandeling onderworpen, waarbij echter bleek dat de kleurontwikkeling op de filtreerpapiertjes met gelatine gering was. Op het onbehandelde filtreerpapier kwam in het geheel geen kleur tot stand. Vermoedelijk werkte Ziemba met meer geconcentreerde rookoplossingen.

Er moet nog worden opgemerkt dat het ons niet gelukte, de filtreerpapiertjes in drie minuten te drogen, althans niet bij deze temperatuur. Meestal was hiervoor meer dan een kwartier nodig.

Oplossingen van methylglyoxaal of van glycolaldehyde – concentraties tot 5% werden getest – gaven eveneens een zwakke kleurvorming te zien op de met gelatine behandelde papiertjes; deze kleur was wat geler dan de kleur met rookwater.

Een andere mogelijkheid, die weliswaar minder overeenkomt met de praktische situatie, doch anderzijds meer gedetailleerde waarnemingen toelaat, is de bestudering van de kleurvorming in waterige oplossingen. Als aminoverbinding is gelatine hier wellicht ook bruikbaar. We kozen echter het aminozuur glycine, dat per gewichtseenheid veel aminogroepen bevat en een sterke bruiningsreactie met rookwater geeft.

We hebben getracht, de reactie zoveel mogelijk te standaardiseren door een grote overmaat glycine toe te voegen. De actieve rookcomponenten zullen dan wellicht meer neigen tot reactie met glycine dan tot reacties met elkaar of met reeds gevormde reactieproducten, en waarschijnlijk wordt de kleurvorming op deze wijze dan beter beheerst. Doordat evenwel een bepaald type reacties naar de achtergrond wordt gedrongen, kan een enigszins scheef beeld worden verkregen van de bruining als zodanig, zie 5.1.4.

De uitvoering van de test geschiedt op de volgende wijze:

In een reageerbuis wordt 100 mg glycine afgewogen en hierbij 1,00 ml rookwater gepipetteerd. De reageerbuis wordt los afgesloten met een rubber stop en gedurende 1 uur in een kokend waterbad geplaatst, waarna het mengsel tot 50 ml wordt verdund en de extinctie bij 400 en 500 nm gemeten.

De reaktietijd van 1 uur werd gekozen, omdat na die tijd weinig verandering meer in de bruining optreedt, zoals blijkt uit tabel V.

TABEL V. Verband tussen reaktietijd en extinctie bij 400 nm in mengsels van glycine en rookwater

Reaktietijd	E ₄₀₀
5 minuten	0,473
10 „	0,71
15 „	0,78
20 „	0,82
30 „	0,865
45 „	0,92
1 uur	0,955
1½ „	1,00
2 „	1,05
3 „	1,10

Uit een proef met een aantal verdunningen van een monster rookwater bleek, dat de wet van Beer bij beide golflengten ten naastebij wordt gevolgd:

Verdunning	E ₄₀₀	E ₅₀₀	pH (na menging)
als zodanig	0,84	0,266	3,75
1 + 1	0,439	0,140	
1 + 3	0,211	0,066	
1 + 9	0,087	0,027	4,45

Tevens blijkt, dat deze test niet zeer gevoelig is voor kleine variaties in de pH.

Een aantal oplossingen van de bovengenoemde vier hydroxy- en dicarbonylverbindingen werden nu op deze wijze onderzocht. Deze oplossingen bezitten een zwak zure reaktie. De meest verdunde oplossingen werden echter met azijn-

TABEL VI. Bruining van een viertal hydroxy- en dicarbonylverbindingen, en van enkele monsters rookwater, met glycine

Oplossing	E ₄₀₀	E ₅₀₀	E ₄₀₀ /E ₅₀₀
0,2% glyoxaal	0,197	0,046	4,28
0,2% glycolaldehyde	0,260	0,074	3,51
0,5% „	0,700	0,227	3,08
0,2% methylglyoxaal	0,184	0,040	4,60
0,5% „	0,600	0,155	3,87
0,5% acetol	0,010	0,002	-
1,0% „	0,019	0,008	-
Rookwater uit de hang (1 uur gerookt)	0,505	0,160	3,16
Rookwater uit de tunnel (2½ uur gerookt)	0,347	0,113	3,07
Rookwater uit de rookinstallatie van het CIVO te Zeist (2½ uur gerookt)	0,84	0,266	3,16

zuur op een pH van ongeveer 3 gebracht, teneinde een betere vergelijking met rookwater mogelijk te maken.

De gevonden extinctiewaarden zijn vermeld in tabel VI.

De bruining van rookwater met een overmaat glycine is dus ongeveer te vergelijken met de bruining van 0,3–0,6% glycolaldehydeoplossingen.

Acetol vertoont weinig reactie. Methylglyoxaal en glyoxaal zijn wel zeer actief, doch de verhouding E_{400}/E_{500} wijkt enigszins af van die van rookwater. Overigens blijkt deze verhouding bij de afzonderlijke stoffen niet konstant. Ook aan de wet van Beer wordt geenszins voldaan.

Een goede vergelijking met rookwater wordt pas mogelijk indien we over meer analytische gegevens omtrent dit rookwater beschikken. Dan kan ook worden vastgesteld of de gevonden actieve verbindingen alleen verantwoordelijk zijn voor de kleurvorming. Een en ander komt onder 5.1.4 ter sprake.

3.5. AFBAKENING VAN VERDER ONDERZOEK

3.5.1. *Analytische problemen*

Dikwijls wordt een rookoplossing of rookcondensaat getypeerd door het gehalte aan carbonylverbindingen, titreerbare zuren en fenolachtige verbindingen te bepalen (RUSZ, 1962; SIKORSKI, 1962a; PORTER, BRATZLER en PEARSON, 1965; SIMON, RYPINSKI en TAUBER, 1966). SIMON c.s. achten deze groepen in hoofdzaak verantwoordelijk voor kleur en smaak van het gerookte produkt, waarbij zij verwijzen naar gegevens van WILSON (1961), HOLLENBECK (1964) en SIMPSON (1964). SIKORSKI en TILGNER (1964) deden enkele jaren geleden het voorstel om voor controle-doeleinden slechts de totale hoeveelheden van deze drie groepen te bepalen.

In het onderzoek van RUSZ (1962) werden, behalve de drie genoemde groepen, ook enkele carbonylverbindingen afzonderlijk bepaald, namelijk formaldehyde, acetaldehyde, furfural en diacetyl; dit geschiedde via een polarografische techniek.

SPANYÁR, KEVEI en KISZEL (1960a, b) splitsten de carbonylfractie in monocarbonylverbindingen enerzijds en osazonvormende hydroxy- en dicarbonylverbindingen anderzijds. Zij bepaalden formaldehyde, acetaldehyde, aceton en furfural afzonderlijk en voerden bovendien analyses uit waarbij zij het gehalte aan in alkalische oplossing reducerende bestanddelen, reduktonen, dehydro-reduktonen en esters bepaalden; ook werd door hen het water- en asgehalte en de pH bepaald.

TILGNER, ZIEMBA en DJU-HAK-DJU (1962b) bepaalden naast fenolen, carbonylverbindingen en zuren ook het gehalte aan in ether onoplosbare bestanddelen, vrije basen en neutrale componenten. (Bij deze laatste groep zijn de carbonylverbindingen niet meer inbegrepen).

Het is zeer merkwaardig dat in al deze studies zo weinig aandacht is geschonken aan de hydroxy- en dicarbonylverbindingen in rook. Slechts Spanyol c.s. bepalen de osazonvormende hydroxy- en dicarbonylverbindingen afzonderlijk; dat zij de gevonden waarden als diacetyl omrekenen lijkt echter minder juist.

Het onderzoek naar bruikbare analysemethoden is beschreven in hoofdstuk 4. De volgende carbonylverbindingen konden afzonderlijk worden bepaald: glycolaldehyde, glyoxaal, acetol, methylglyoxaal, formaldehyde, furfural, aceton en tot op zekere hoogte ook diacetyl. Tevens bepaalden we het totale gehalte aan carbonylverbindingen; de andere analyses behelsden een fenolbepaling en een zuurtitratie. Ook werd de pH gemeten en de bruiningstest met glycine uitgevoerd. Enkele bestaande methoden werden kritisch onderzocht.

3.5.2. *Reaktiemechanismen*

Het mag merkwaardig genoemd worden, dat zeer veel werk is verricht omtrent het verloop van de reacties tussen reducerende suikers en aminozuren (alleen al over glucose-glycinesystemen bestaan tientallen publikaties), terwijl tot nu toe weinig aandacht is besteed aan de reacties van α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen met aminogroepen. Deze hydroxy- en dicarbonylverbindingen worden immers beschouwd als tussenproducten bij de reacties van suikers met aminozuren of eiwitten (HODGE, 1953) en zijn bekend om hun grote reactiviteit (BEACHAM en DULL, 1951; LENTO, UNDERWOOD en WILLITS, 1960). Voorzover we konden nagaan, zijn op dit gebied slechts twee onderzoeken van enige omvang verricht: dat van ENDERS (1943a, b) over de reactie van methylglyoxaal met glycine, en dat van HURD (1952, 1956) over de reacties tussen eenvoudige hydroxyketonen en aminozuren. Het – overigens uitstekende – werk van Enders is echter al vijfentwintig jaar oud, en op het onderzoek van Hurd valt wel wat aan te merken. Nu we hier weer worden geconfronteerd met deze hydroxy- en dicarbonylverbindingen, is er reden genoeg om enige aandacht te besteden aan het mechanisme van de reactie met aminogroepen. Het onderzoek in deze richting is beschreven in hoofdstuk 5.

3.5.3. *Technologische aspecten*

Globaal genomen zijn vier factoren bij de kleurvorming op gerookte vis van groot belang: de diffusie van rookcomponenten naar binnen, de vochtigheid van het oppervlak, de relatieve vochtigheidsgraad van de rook, en de temperatuur. Allerlei andere factoren laten we voorlopig buiten beschouwing.

Deze factoren staan geenszins op zichzelf, doch hangen op ingewikkelde wijze met elkaar samen.

De diffusie van rookbestanddelen in levensmiddelen heeft reeds vele onderzoekers beziggehouden (MAZJAKIN en ROGAČEVSKAJA, 1938; TUCKER, 1942; SHEWAN, 1949; JUDIČKAJA, 1959; SPANYÁR en KEVEI, 1961; KURKO, 1963 en HAMID, 1964, 1966). In het algemeen komt men tot de konklusie dat de op het produkt gedeponeerde rookstoffen in hoofdzaak op of vlak onder het oppervlak blijven, en dat zeer weinig van dit materiaal naar binnen dringt.

Dit geldt natuurlijk a fortiori voor de reactieve rookbestanddelen, zoals die welke de kleur tweegbrengen. Het lijkt ons overigens zeer goed mogelijk dat met name de aromavormende componenten via eventueel aanwezige vetten of oliën dieper het levensmiddel kunnen binnendringen.

Voor wat betreft de kleurvorming door uitdroging moet allereerst worden ver-

wezen naar het welhaast klassieke werk van C.H. Lea en medewerkers te Cambridge. Zij onderzochten in eerste instantie de reactie tussen caseïne en glucose in mengsels van deze twee stoffen, waarvan het vochtgehalte in evenwicht was met de relatieve vochtigheid van de omringende lucht. Zowel bij 37° als bij 70° en 90° bleek het gehalte aan vrije aminogroepen het snelst af te nemen bij een relatieve vochtigheid van 65 à 70%. De kleurontwikkeling verliep sneller naarmate de relatieve vochtigheid hoger was (LEA en HANNAN, 1949). – Later vond SHARP (1957) echter, dat de ontwikkeling van een bruine kleur in gedroogd vlees maximaal was bij de betrekkelijk lage evenwichtsrelatieve vochtigheid (E.R.V.) van 57%.

De E.R.V. waarbij de aminogroepen het snelst worden geblokkeerd, bleek intussen nogal afhankelijk van de eiwitsoort. LEA c.s. vonden een optimale E.R.V. van 55% in een bloedplasma-glucosesysteem (1950) en van ongeveer 45% in een mengsel van glucose en polylysine-hydrochloride (HANNAN en LEA, 1951). In dit laatste systeem was de kleurontwikkeling maximaal bij een E.R.V. van ongeveer 60%. In een insuline-glucosesysteem verdwijnen de vrije aminogroepen het snelst bij een E.R.V. van omstreeks 70% (SCHWARTZ en LEA, 1950). In het algemeen is de optimale E.R.V. laag bij eiwitten met veel vrije aminogroepen (LEA, 1958).

Dat eiwitten het vermogen bezitten, ook bij lage relatieve vochtigheden water te kunnen vasthouden, is bekend. Met name de peptidegroep speelt bij deze waterbinding een grote rol. Volgens MELLON c.s. (1948) wordt 45% van het in caseïne aanwezige water vastgehouden door de peptidegroep. De vrije aminogroepen spelen echter eveneens een belangrijke rol (MELLON c.s., 1947). Reeds bij een E.R.V. van 6% wordt per aminogroep 1 molecuul water vastgehouden. Deze hoeveelheid neemt bij stijgende E.R.V. gestadig toe.

In caseïne houden de aminogroepen, afhankelijk van de E.R.V., 24 tot 33% van het totaal aanwezige water vast. Hoe groot dit waterbindend vermogen is, wordt duidelijk als men bedenkt dat de gewichtsbijdrage van deze groep minder dan 1% is!

Nu lijkt het waarschijnlijk, dat in de watermantels rond de aminogroepen glucosemoleculen, of moleculen van andere actieve verbindingen, kunnen binnendringen die, op deze wijze in de onmiddellijke nabijheid van de aminogroep verkerend, zeer snel tot reactie kunnen komen.

Waarom de optimale E.R.V. in eiwitten met een verhoudingsgewijs grote hoeveelheid aminogroepen lager blijkt te zijn, is niet geheel duidelijk. LEA (1958) wijst er op, dat deze eiwitten ook meer-hygroscopische-suikermoleculen kunnen binden, en zegt dat deze suikermoleculen uiteindelijk de optimale E.R.V. bepalen. Deze redenering bevredigt o.i. niet helemaal, omdat de hoeveelheid hydratiewater van bijvoorbeeld glucose vrij klein is, zeker in verhouding tot de aminogroep.

In feite is de snelle verbruining van suiker/eiwitmengsels in deze 'droge' toestand niets anders dan een concentratiekwestie. Het zal geen verbazing wekken dat dergelijke verschijnselen ook worden gevonden bij suiker/aminozuurmengsels (WOLGUNOV en POCHNO, 1950; MAŠKOVČEV, 1951; WOLFROM en ROONEY,

1953; RICHARDS, 1956).

Gezien de sleutelpositie van de aminogroep in de bruining van eiwitten met rookbestanddelen is er geen enkel beletsel, de door Lea en medewerkers verkregen inzichten ook op die situatie toe te passen. Het moet zonder meer mogelijk zijn om hier experimenten te verrichten, analoog aan die van Lea en met soortgelijke resultaten. Deze experimenten zijn evenwel in het kader van deze studie niet ondernomen.

Wel hebben we getracht, een beter inzicht te verkrijgen in het aandeel van de disperse fase van rook in de kleurvorming. In 2.5 werd al gewezen op verschillende inzichten hieromtrent. In hoofdstuk 6 wordt beschreven hoe we in deze materie wat meer klaarheid poogden te brengen.

4. SYSTEMATISCHE ANALYSE VAN ROOKBESTANDDELEN

4.1. MONSTERNAME

De in de hoofdstukken 2 en 3 beschreven Petrischalen met water zijn door ons ook voor de kwantitatieve analyse van rookbestanddelen gebruikt. De resultaten van deze opvangmethode zullen in principe vergelijkbaar zijn met via gaswasflessen verkregen resultaten, omdat in beide gevallen sprake is van gasabsorptie door water. We kozen de schalenmethode vanwege zijn eenvoud, en ook omdat de overeenkomst met de praktische situatie groter is. Bij de gaswasflesmethode wordt de absorptie geforceerd, hetgeen tot een snellere opname van rookbestanddelen leidt; een voordeel evenwel, dat bij onze experimenten nauwelijks van belang is. De schalenmethode heeft verder nog het voordeel dat bij gelijkblijvend oppervlak het watervolume kan worden gewijzigd, waardoor het mogelijk wordt om na te gaan in hoeverre de dikte van de waterlaag invloed heeft op de onderlinge verhouding der opgevangen rookbestanddelen.

Bij de interpretatie van de met de schalenmethode verkregen resultaten dient men te bedenken, dat hier in feite de allereerste fase van de rookabsorptie kunstmatig wordt verlengd. De resultaten geven dus aan wat er op een levensmiddel aan rookbestanddelen zou worden gevonden indien de absorptie per tijdseenheid niet zou afnemen en geen reacties zouden gaan optreden.

Indien we, in navolging van FOSTER en SIMPSON (1961a), het rookproces slechts als een absorptie van gasvormige bestanddelen beschouwen, moet met deze opvangmethode een goede informatie kunnen worden verkregen omtrent aard en hoeveelheid van de rookcomponenten, die bij het bereiden van gerookte levensmiddelen zijn betrokken. Indien evenwel ook de disperse deeltjes belangrijk bijdragen, bijvoorbeeld in de ontwikkeling van de kleur, dan zal het duidelijk zijn dat we ook hier een scheef beeld verkrijgen, omdat de voorwaarden voor gasabsorptie veel gunstiger worden gemaakt, terwijl de disperse deeltjes in dezelfde mate blijven neerslaan. Het opvangen en analyseren van de disperse fase behoort intussen tot de moeilijkste problemen van het onderzoek van rook.

De omstandigheden waaronder wordt gerookt buiten beschouwing latend, kan worden gezegd dat de hoeveelheid geabsorbeerde rook in hoofdzaak zal afhangen van de grootte van het aan rook blootgestelde oppervlak, en in mindere mate ook van de dikte van de waterlaag (zie 4.3.3). Een en ander werd als volgt gestandaardiseerd:

Een aantal uniforme Petrischalen, 2 cm hoog en met een doorsnede van 9 cm, werden van 20 ml gedestilleerd water voorzien. Tijdens het rookproces verdampte een gedeelte van dit water, dat hierna weer tot het oorspronkelijke gewicht werd aangevuld. Daar doorgaans vijf schalen werden gebruikt, kon op deze wijze 100 gram rookwater worden verkregen.

Doorgaans bevatte dit rookwater een hoeveelheid onoplosbaar, zeer fijn materiaal, dat donker van kleur was. We filtreerden dan ook eerst door een blauwbandfilter (Schleicher & Schüll 589³), maar vaak was na het filtreren nog

een lichte opalescentie aanwezig. Na enige tijd ontstond weer een neerslag van bruinzwarte partikeltjes; indien ook deze deeltjes werden afgefilterd was de vloeistof helder. Het opnieuw ontstaan van deze deeltjes hoeft niet te wijzen op reacties in de vloeistof, maar kan ook het gevolg zijn van het uitvlokken van kolloïdale deeltjes. In 4.3.4 wordt beschreven in hoeverre de analyseresultaten veranderen, als het rookwater enige tijd wordt bewaard.

4.2. METHODEN VOOR DE KWANTITATIEVE ANALYSE VAN ROOKWATER

4.2.1. *Bepaling van het totale gehalte aan carbonylverbindingen*

De bepaling van het totale carbonylgehalte werd uitgevoerd volgens een aan SPANYÁR c.s. (1960a) ontleende methode.

Een hoeveelheid rookwater, meestal 2 ml, wordt hierbij aangevuld tot 10 ml met gedestilleerd water. Vervolgens wordt 10 ml DNPH-reagens toegevoegd. Dit bestaat uit een 2%-ige oplossing van 2,4-dinitrofenylhydrazine (AnalaR) in 40% w/w zwavelzuur (bereid uit H_2SO_4 Merck p.a.). Het mengsel wordt 20 minuten in een kokend waterbad geplaatst, waarna 25 ml water wordt toegevoegd en het geheel 30 minuten in ijswater gekoeld. Het gevormde neerslag wordt afgezogen door een gewogen glasfilter G4, uitgewassen met water tot het filtraat vrijwel kleurloos is, gedroogd en gewogen. Daar de aldus geïsoleerde derivaten van zeer uiteenlopende samenstelling zijn, werd steeds het gewicht van het neerslag als analyseresultaat opgegeven en niet omgerekend naar een bepaalde carbonylverbinding.

Het verschil met de door Spanyol beschreven werkwijze wordt veroorzaakt door de veel grotere concentratie aan carbonylverbindingen, die bij onze monsters optreedt. Daardoor is het mogelijk, de hoeveelheid neerslag gravimetrisch te bepalen.

Spanyár c.s. werkten in hun analyses met een lagere concentratie aan reagens zowel als aan zwavelzuur in het reaktiemengsel, door tevoren een vrij grote hoeveelheid water toe te voegen. In onze analyses was een grotere concentratie aan reagens wenselijk, omdat anders de kans zou bestaan dat de osazonvorming uit hydroxycarbonylverbindingen onvolledig is.

Een hoge zuurconcentratie kan echter het kwantitatief neerslaan van sommige hydroxycarbonylverbindingen belemmeren. Hoewel dit verschijnsel bij hoge concentraties minder hinderlijk is, werd toch besloten om het reaktiemengsel na verwarming te verdunnen, teneinde dit effect tegen te gaan. Voorwaarde hierbij is dat een voldoende hoeveelheid derivaten zijn ontstaan, dus voldoende reagens is verbruikt, omdat anders het DNPH zelf gedeeltelijk kan neerslaan.

Ondanks bovenvermelde voorzorgsmaatregel moet er rekening mee worden gehouden dat sommige monocarbonylverbindingen, waaronder aceton, ook onder deze omstandigheden onvolledig neerslaan. Bij zeer lage concentraties, die bijvoorbeeld optreden in de oplossingen waarop Spanyol c.s. hun analyses verrichtten, slaat aceton in 't geheel niet neer, ook niet bij lagere temperaturen. Nu blijkt acetonhydrazon merkbaar op te lossen in gedestilleerd water, waardoor bovengenoemd verschijnsel opgehelderd is. De bewering van SPANYÁR en

KEVEI (1961), dat een acetonbepaling met hun DNPH-methode altijd gelukt, is voor ons echter onverklaarbaar.

4.2.2. *Hydroxy- en dicarbonylverbindingen*

4.2.2.1. *Scheiding van osazonen*

Zoals reeds onder 3.4.2 werd vermeld, kunnen de osazonen van hydroxy- en dicarbonylverbindingen zeer goed op een zinkcarbonaatkolom worden gechromatografeerd en aldus van elkaar gescheiden. Genoemde kolom is uitvoerig beschreven door VAN DUIN (1961). Hij vermeldt dat de 'analytisch moeilijk toegankelijke' osazonen van alifatische α -dicarbonylverbindingen ermee kunnen worden gescheiden in het osazon van glyoxaal, osazonen van eenzijdig gesubstitueerde en osazonen van tweezijdig gesubstitueerde glyoxalen. Als loopvloeistof gebruikte hij een mengsel van gelijke delen benzeen en pyridine, waaraan een bepaalde hoeveelheid ethanol was toegevoegd; een goede scheiding kwam tot stand na toevoeging van 10% ethanol aan het eluens.

Het (basische) zinkcarbonaat (BDH for chromatographic analysis) werd als volgt behandeld: Een gedeelte werd gedurende enige uren in een dunne laag bij 110° gedroogd (actief adsorbens). Tevens wordt een portie adsorbens in een exsiccator gedurende minstens 48 uur boven een verzadigde NaCl-oplossing geaccomodeerd (inactief adsorbens). Men mengt 80 tot 85 delen actief adsorbens met 20 tot 15 gewichtsdelen inactief adsorbens en suspendeert in een drie- tot vijfvoudige hoeveelheid eluens'.

Van belang is ook nog, dat van Duin bij voorkeur niet meer dan 1 mg derivaten per g eluens opbrengt.

De door van Duin beschreven methode is op zijn bruikbaarheid onderzocht met behulp van een oplossing van osazonen van glyoxaal, methylglyoxaal en diacetyl in pyridine. In de eerste experimenten werd een hoeveelheid van deze oplossing vermengd met een gelijke hoeveelheid benzeen, waarna 10% alcohol werd toegevoegd. Later werd dit achterwege gelaten en de pyridineoplossing direct op de kolom gebracht.

Bij de elutie kwam al spoedig een scheiding tot stand, maar de banden verplaatsten zich steeds langzamer en het bleek onmogelijk, ze van de kolom af te elueren. Toevoeging van 20 in plaats van 10% alcohol gaf enige verbetering, doch ook hier was de elutiesnelheid onbevredigend. Indien echter enkele druppels water aan het eluens werden toegevoegd, kwam een snelle elutie tot stand, die – mits niet teveel water werd toegevoegd – geenszins ten koste van de scheiding ging.

Het verschil tussen de waarnemingen van van Duin en de onze zou kunnen worden verklaard door aan te nemen dat hij 96%-ige alcohol gebruikte; wij maakten gebruik van absolute alcohol (Zuidnederlandse Spiritusfabriek, Bergen op Zoom).

Een prettige bijkomstigheid was, dat het osazon van diacetyl slechts een spoor water behoeft om snel van de kolom te elueren, terwijl voor de elutie van glyoxaalosazon vrij veel water nodig was. Door de hoeveelheid aan de elutievloeistof toegevoegd water langzaam op te voeren kon een zeer goede scheiding wor-

den verkregen, waarbij ook glyoxaalosazon in een redelijke tijd van de kolom af kwam.

Bij deze werkwijze was het niet nodig, van inactief adsorbens gebruik te maken. Door te beginnen met een volkomen actieve kolom en droog eluens konden de opgebrachte derivaten in een zeer klein gebied worden geconcentreerd, hetgeen de scheiding ten goede kwam.

Voorts werd nog nagegaan of opgebracht glyoxaalosazon en ook de osazonen van methylglyoxaal en diacetyl kwantitatief in het eluaat werden teruggevonden. Dit bleek voor alle drie stoffen het geval.

Het opbrengen van 1 mg derivaten per g adsorbens leidde bij ons niet tot goede scheidingen. Deze werden wel verkregen met hoeveelheden die tienmaal zo klein waren.

Op grond van de opgedane ervaringen besloten we tot de volgende werkwijze voor het scheiden en kwantitatief analyseren van uit rook neergeslagen osazonen:

1 gram actief zinkcarbonaat (bereid volgens van Duin) wordt gesuspenderd in een hoeveelheid pyridine/benzeen/absolute ethanol-mengsel (5:5:2), en in een glazen chromatografiebuis gebracht (inwendige diameter 10 mm; voorzien van glassinter en kraan). De lengte van de zinkcarbonaatkolom bedraagt bijna 2 cm.

Op de kolom wordt 1,00 of 2,00 ml van een oplossing van osazonen in pyridine gebracht (totale hoeveelheid der derivaten variërend van 0,05 tot 0,15 mg). Daarna wordt geëluëerd met bovengenoemde loopvloeistof tot zich een scheiding begint af te tekenen.

Aan het eluens wordt nu voorzichtig wat gedestilleerd water toegevoegd (enkele druppels per 10 ml). Deze hoeveelheid is niet precies aan te geven, daar zij enigszins kan variëren. Het vereist enige ervaring om goed te doseren. De kleur van de osazonen op de kolom geeft echter een goede informatie omtrent de snelheid waarmee de banden zullen elueren. Bij afwezigheid van water is deze kleur diepblauw (glyoxaalosazon) tot paarsblauw (diacetylosazon); bij aanwezigheid van veel water zijn de osazonbanden vuilgrijs.

Het watergehalte van het eluens wordt opgevoerd nadat het diacetylosazon van de kolom is afgeëluëerd; dit geschiedt nogmaals nadat ook het methylglyoxaalosazon volledig is opgevangen.

De elutiesnelheid dient 1 à 1½ ml per minuut te zijn. Voor het bereiken van deze snelheid is enige overdruk op de kolom nodig. Onder deze omstandigheden duurt een volledige elutie één tot anderhalf uur.

De concentraties van de aldus gescheiden osazonen in de eluaten worden spectrofotometrisch bepaald; zie 4.2.2.3.

4.2.2.2. Scheiding van α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen

Onder 3.4.2.2 werd beschreven dat osazonvorming van α -hydroxycarbonylverbindingen kan worden voorkomen door bij 0° neer te slaan.

Indien de α -dicarbonylverbindingen onder dezelfde omstandigheden kwantitatief kunnen worden neergeslagen, is een bepaling van beide groepen naast elkaar in principe mogelijk. We hebben dit nagegaan voor glyoxaal, methyl-

glyoxaal, diacetyl en de overeenkomstige hydroxycarbonylverbindingen glycolaldehyde, acetol en acetoïne. Deze verbindingen zijn twee aan twee onderzocht.

4.2.2.2.1. Glyoxaal en glycolaldehyde

Het gehalte van de gebruikte preparaten (glyoxaalmonohydraat BDH en glycolaldehyde Fluka -purum-) werd bepaald volgens de onder 4.2.1. beschreven methode. In het glyoxaalpreparaat bleek 81,7% glyoxaal aanwezig; het gehalte van het glycolaldehydpreparaat bedroeg 93,5%.

De gevormde osazonen werden ter controle over een zinkcarbonaatkolom geëluëerd op de hierboven beschreven wijze. Het glycolaldehydederivaat bleek zuiver; bij het glyoxaalderivaat bleef een zwakke blauwe band achter, die ongeveer 4% van het totaal uitmaakte.

Glyoxaal: 10 ml van een ca 0,003%-ige oplossing in water werd voorzien van 10 ml DNPH-reagens (2% in 40% w/w zwavelzuur). Dit geschiedde in viervoud; twee mengsels werden op de gebruikelijke manier behandeld (20 minuten in een kokend waterbad; 30 minuten afkoelen), de twee andere gedurende 1 uur bij 0° weggezet.

De neerslagen werden afgefiltreerd, gedroogd en opgelost in 25 ml pyridine. 2 ml van deze oplossing werd tot 25 ml uitverdund en van deze verdunning werd de extinctie bij 450 nm gemeten in een Beckman B-spectrofotometer.

De gemeten waarden bedroegen:

	E_{450}
a. Warm neergeslagen	0,726/0,720
b. Koud neergeslagen	0,655/0,649

Deze proef werd herhaald met een even sterke oplossing van glyoxaal in 90% methanol. Het verschil tussen de hoeveelheden neerslag was hier kleiner, zoals bleek uit de volgende extinctiemetingen:

	E_{450}
c. Warm neergeslagen	0,729/0,722
d. Koud neergeslagen	0,696/0,695

Teneinde een verklaring voor deze afwijkingen te vinden, werden de onverdunde oplossingen b. c. en d. onderzocht op de zinkcarbonaatkolom.

Bij b. was boven de band van glyoxaalosazon nog een zeer duidelijke grijsblauwe band zichtbaar. In de koud neergeslagen methanolische oplossing was deze band veel smaller; de extinctie bij 450 nm bedroeg hier 6% van de totale extinctie. Bij de warm neergeslagen oplossing was de band vrijwel niet aanwezig.

We vermoeden dat een gedeelte van het glyoxaal, dat in de oplossing waarschijnlijk als di- of trimeer voorkomt, osazonen kan geven zonder dat de verbinding in het monomeer is omgezet. Indien 90% van het water door methanol wordt vervangen, of bij verhitting, ontleden deze verbindingen grotendeels (of ontstaan in veel mindere mate).

Het is zeer wel mogelijk, dat het osazon van bijvoorbeeld een trimeer van glyoxaal overeenkomt met het gekompliceerde derivaat, dat Diemair en Schams

beschrijven. De mogelijkheid, dat zulke derivaten onder bepaalde omstandigheden ontstaan, moet genoemde auteurs dan ook niet worden betwist; het zijn hun gevolgtrekkingen die onjuist zijn.

Vervolgens werd nog een oplossing van 0,0003 % (3 p.p.m.) glyoxaal in 90 % methanol gemaakt en aan dezelfde behandeling onderworpen.

Het neerslag werd opgelost in 50 ml pyridine en direct gemeten:

	E ₄₅₀ (na correctie voor chemicaliënblanco)
Warm neergeslagen	0,431/0,434
Koud neergeslagen	0,442/0,447
Berekend	0,441

Bij zeer kleine concentraties wordt glyoxaal dus wel kwantitatief teruggevonden als bij 0° wordt neergeslagen. Daar in rook weinig glyoxaal aanwezig is, kunnen we konkluderen dat hier geen problemen meer aanwezig zijn.

Glycolaldehyde: Ook hier werd een 0,003 %-ige oplossing in 90 % methanol gemaakt en 10 ml hiervan met 10 ml reagens behandeld. Na 1 uur bij 0° was een zeer lichte troebeling aanwezig, die werd afgefiltreerd en opgelost in 10 ml pyridine. Van deze oplossing bedroeg de extinctie bij 450 nm 0,035. Uit een berekening blijkt, dat dit 0,14 % is van de hoeveelheid die zou zijn verkregen indien alles als glyoxaalosazon was neergeslagen. Deze hoeveelheid is te verwaarlozen.

Er dient nog te worden vermeld dat de gebruikte methanol carbonylvrij was gemaakt door behandeling met 2,4-dinitrofenylhydrazine en trichloorazijnzuur, gevolgd door destillatie (GADDIS c.s., 1964). Soms werd op deze wijze een lichtgeel gekleurd destillaat verkregen. Herhaalde destillatie leverde dan wel een kleurloos produkt op.

4.2.2.2.2. Methylglyoxaal en acetol

Het gebruikte methylglyoxaalpreparaat (Fluka pract., 27–39 % in water) bevatte volgens de gravimetrische analyse 51,2 % methylglyoxaal. De osazonen bleken echter niet geheel zuiver; na elutie over de zinkcarbonaatkolom bevatte de methylglyoxaalfractie ongeveer 95 % van het oorspronkelijke materiaal, de rest bleef achter in de vorm van enkele vaalblauwe en bruine bandjes.

Het acetolpreparaat (K & K, 40 % in methanol) bevatte 27,6 % acetol. Ook hier waren enkele verontreinigingen te bespeuren.

Methylglyoxaal: 4 × 10 ml van een 0,004 %-ige oplossing in 90 % methanol werd voorzien van 10 ml DNPH-reagens. (Methanol was hier nodig omdat in waterige oplossing een klein gedeelte van het methylglyoxaal als monohydrazon kan neerslaan).

Twee mengsels werden 20 minuten in een kokend waterbad geplaatst en daarna gekoeld; de twee andere werden gedurende 1 uur bij 0° geplaatst.

Na affiltreren door een G4-kroes en drogen werden de neerslagen opgelost in pyridine en verdund zoals bij glyoxaal werd beschreven, en de extincties bij

415 nm gemeten op de Beckman B-spectrofotometer:

	E_{415}
Warm neergeslagen	0,685/0,690
Koud neergeslagen	0,615/0,642

De lagere resultaten bij het koud neerslaan zijn niet het gevolg van een te korte reaktietijd, zoals uit de volgende gegevens blijkt:

Reaktietijd (bij 0°)	E_{415}
1/4 uur	0,621
1/2 uur	0,617
1 uur	0,618
2 uur	0,631
4 uur	0,626

Bij een oplossing van methylglyoxaal die bereid was door een hoeveelheid van het Fluka-preparaat aan stoomdestillatie te onderwerpen, waren de verschillen veel kleiner:

	E_{415}
Warm neergeslagen	0,752/0,737
Koud neergeslagen	0,719/0,715

Weinig vluchtige verontreinigingen, die bij 0° niet en bij 100° wel neerslaan, zijn dus wellicht verantwoordelijk voor een gedeelte van dit verschil.

Het nu nog resterende verschil zou kunnen worden veroorzaakt door de aanwezigheid van wat acetol in het preparaat. Deze veronderstelling is langs deze weg echter niet te bevestigen.

Acetol: Een 0,004 %-ige oplossing in methanol gaf na 1 uur bij 0° geen neerslag met het DNPH-reagens.

Acetolacetaat (Fluka, pract.) bleek zich te gedragen als acetol. Een 0,005 %-ige oplossing in 90 % methanol gaf in de koude geen neerslag met DNPH en werd bij 100°, evenals acetol, kwantitatief in methylglyoxaalosazon omgezet.

4.2.2.3. Dihydroxyaceton en glycerinealdehyde

Door ROUDIER (1963) is er op gewezen, dat het osazon van methylglyoxaal uit vijf verschillende verbindingen kan worden verkregen: behalve methylglyoxaal en acetol noemt hij melkzuuraldehyde, glycerinealdehyde en dihydroxyaceton. Ten aanzien van melkzuuraldehyde is deze overweging niet zo belangrijk, omdat melkzuuraldehyde en acetol in waterige oplossing zeer gemakkelijk in elkaar overgaan; er is dus geen bezwaar tegen om de gehalten van beide stoffen te zamen als het gehalte aan acetol aan te duiden.

De beide triosen zijn echter andere verbindingen met andere eigenschappen. We hebben enkele experimenten met dihydroxyaceton uitgevoerd, teneinde na te gaan hoe deze verbinding onder de bovenbeschreven omstandigheden reageert, welke derivaten eruit ontstaan en in hoeverre we hier bij de interpretatie van onze analyseresultaten rekening mee moeten houden.

Daartoe werd een 0,001 %-ige oplossing van dihydroxyaceton (BDH) in

methanol bereid. Aan 10 ml van deze oplossing werd 10 ml DNPH-reagens toegevoegd. Na 1 uur bij 0° was de oplossing nog volkomen helder. Hoewel een omzetting van dihydroxyaceton in methylglyoxaal in zuur milieu zeker kan plaats vinden (BERNIER en EVANS, 1938), is dit hier niet het geval, getuige het uitblijven van een neerslag.

Bij verhitten in een kokend waterbad ontstaat echter al spoedig een oranje-rood precipitaat. Chromatografie van een oplossing van dit neerslag in pyridine gaf drie banden op de zinkcarbonaatkolom te zien: een brede blauwe band, daarboven een smallere blauwe band en bovenin de kolom een zich zeer traag verplaatsende grijze band.

De eerste band was spectrofotometrisch identiek aan methylglyoxaalosazon; het spectrum van de tweede band leek vrij veel op dat van glyoxaalosazon, terwijl de laatste band een volkomen ander spectrum vertoonde met een hoge top bij 415 nm en een wat lagere bij ongeveer 475 nm. Massaspectrografisch kon worden vastgesteld dat de eerste band inderdaad uit methylglyoxaalosazon bestond en de tweede uit het „normale” osazon van hydroxymethylglyoxaal (M.G. = 448).

Het massaspectrum van de laatste band bevatte slechts fragmentpieken, die nog voorkwamen bij M.G.-waarden boven 500. Vermoedelijk is deze verbinding het tris-hydraxon (M.G. = 626). Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een dubbelfocuserende A.E.I.-massaspectrograaf van het Analytisch-Chemisch Laboratorium der Rijkuniversiteit te Utrecht, type M.S.- 9.

Het ontstaan van de eerste twee derivaten wordt ook vermeld door REICH en SAMUELS (1956) en door WOLFROM en ARSENAULT (1960); het optreden van het tris-hydraxon niet.

Verder chromatografisch onderzoek leerde nog, dat de band van hydroxymethylglyoxaalosazon zich op de zinkcarbonaatkolom niet laat scheiden van glyoxaalosazon. Daar het eerstgenoemde derivaat pas in de warmte ontstaat uit dihydroxyaceton, zou het dus in de glycolaldehydefractie terechtkomen. Indien nu in het massaspectrum van deze fractie geen piek bij M.G. = 448 voorkomt, mogen we zeggen dat dihydroxyaceton (en waarschijnlijk ook glycerinealdehyde) afwezig zijn. Inderdaad bleek dit het geval; zie 4.2.2.5.2.

4.2.2.2.4. Diacetyl en acetoïne

De scheiding van diacetyl en acetoïne op de beschreven wijze levert moeilijkheden op, daar de kwantitatieve omzetting van diacetyl in zijn bis-derivaat niet zeer gemakkelijk verloopt. Bovendien lost dit osazon enigszins op in het reaktiemengsel, zodat de bepaling van zeer kleine hoeveelheden diacetyl op deze wijze niet uitvoerbaar is. Hetzelfde geldt uiteraard voor acetoïne.

Daar geen van beide stoffen bij de bruinsingsreactie een rol van betekenis speelt, hebben we er van afgezien, ze afzonderlijk te bepalen. In plaats daarvan werd het neerslag dat bij de bepaling van het totale carbonylgehalte werd verkregen, opgelost in pyridine en een gedeelte over de zinkcarbonaatkolom gechromatografeerd. De blauwe band direkt onder de methylglyoxaalband werd geïsoleerd en de extinctie van het tot 10 ml aangevulde eluaat bepaald, waarna de gemeten waarde werd berekend als diacetyl.

Naast diacetyl kunnen ook andere dubbel gesubstitueerde glyoxalen aan de extinctie bijdragen en eveneens dubbel gesubstitueerde α -hydroxycarbonyl-verbindingen.

4.2.2.3. Spectrofotometrische bepaling van de verschillende osazonen in de elutievloeistof

Van zo zuiver mogelijke osazonpreparaten werd een oplossing in pyridine/benzeen/ethanol 5:5:2 gemaakt en hiervan een extinctiecurve opgenomen (met een Beckman DU spectrofotometer), waarna de molaire extinctie in het absorptiemaximum kon worden bepaald.

Glyoxaalosazon: Bereid uit glyoxaalmonohydraat (BDH). Gezuiverd op ZnCO_3 -kolom.

Methylglyoxaalosazon: Bereid uit acetolacetaat (Fluka pract.). Gezuiverd als boven.

Diacetylosazon: Bereid uit diacetyl (Fluka puriss.). Bleek vrijwel zuiver op de zinkcarbonaatkolom.

De volgende waarden werden gevonden:

	Maxima	Molaire extinctie
Glyoxaalosazon	447 nm; schouder bij ca 414 nm	45.500 (447 nm)
Methylglyoxaalosazon	410 nm; schouder bij ca 435 nm	39.000 (410 nm)
Diacetylosazon	403 nm; schouder bij ca 445 nm	41.500 (403 nm)

De molaire extincties zijn berekend na een correctie voor onzuiverheden in de preparaten.

Plaats en hoogte van de toppen veranderen maar weinig indien de osazonen niet in de elutievloeistof maar in pyridine worden opgelost. Het effect van een spoor water in de elutievloeistof is verwaarloosbaar.

In de figuren 14 t.e.m. 16 zijn de extinctiecurven van glyoxaalosazon, methylglyoxaalosazon en diacetylosazon weergegeven.

Door UNDERWOOD, LENTO en WILLITS (1956) zijn vroeger ook curven van het acetol- en van het methylglyoxaalderivaat opgenomen, de eerste in dioxaan, de tweede in methanol. Deze laatste curve is volkomen anders dan de door ons gevonden absorptiecurve; die van het acetolderivaat lijkt er wél veel op.

De auteurs vermelden dat het acetolderivaat zeer moeilijk in methanol oplost en dat daarom dioxaan als solvens werd gebruikt. Deze moeilijkheden deden zich bij het methylglyoxaalderivaat niet voor!

Het vermoeden lijkt gerechtvaardigd, dat Underwood c.s. een monoderivaat van methylglyoxaal, of een mengsel van hydrazonen, hebben geïsoleerd.

4.2.2.4. Analyse van enkele mengsels

4.2.2.4.1. Glyoxaal, glycolaldehyde, methylglyoxaal en acetol moeten in een oplossing waarin zij in concentraties van enkele tientallen p.p.m. naast elkaar voorkomen, kwantitatief naast elkaar kunnen worden bepaald. Dit kon worden bevestigd met het volgende experiment:

Een 90%-methanolische oplossing werd bereid die per 10 ml 0,281 mg glyo-

xaal, 0,293 mg glycolaldehyde, 0,345 mg methylglyoxaal en 0,342 mg acetol bevatte. Voor het maken van deze oplossing werden de reeds genoemde preparaten gebruikt.

Aan 2×10 ml werd 10 ml DNPH-reagens toegevoegd, waarna de mengsels 1 uur bij 0° werden geplaatst. Na affiltreren en uitwassen van het ontstane neerslag werd het filtraat 20 minuten in een kokend waterbad geplaatst en vervolgens een half uur gekoeld, waarna ook het nu ontstane neerslag werd afgefiltreerd en gedroogd.

Alle neerslagen werden opgelost in 50 ml pyridine; 1 ml van deze oplossingen werd op de zinkcarbonaatkolom gebracht en geëluëerd.

De frakties die osazonen bevatten werden tot 10 ml aangevuld met loopvloei-stof en de extincties bij 450 resp. 410 nm gemeten (Beckman B-spectrofotometer). Hieruit kon worden berekend hoeveel van de betreffende component werd teruggevonden.

Component	Aanwezig per 10 ml	Gemeten E_{top}	Berekende hoeveelheid per 10 ml	Teruggevonden in procenten
Glyoxaal	0,281 mg	0,421–0,423	0,266–0,268 mg	95–95
Glycolaldehyde	0,293 mg	0,449–0,458	0,293–0,299 mg	100–102
Methylglyoxaal	0,328 mg	0,338–0,353	0,316–0,330 mg	96–101
Acetol	0,342 mg	0,368–0,369	0,352–0,353 mg	103–103

4.2.2.4.2. Door chromatografische analyse van volgens 4.3.1 verkregen neerslagen kan diacetyl kwantitatief worden bepaald, zoals als volgt wordt geïllustreerd:

In 100 ml water werd opgelost: 21,9 mg diacetyl, ca 200 mg glyoxaal en ca 200 mg acetol. 2 ml van de oplossing werd volgens 4.2.1 behandeld en een gedeelte van het verkregen neerslag gechromatografeerd. Het eluaat dat de band van diacetylosazon bevatte, werd tot 10 ml aangevuld en de extinctie bij 405 nm op de Beckman B-spectrofotometer gemeten. Deze procedure werd ook uitgevoerd met een 1:1-verdunning van de oorspronkelijke oplossing.

Teruggevonden:

in oorspronkelijke oplossing 22,2–21,6 mg diacetyl (101–99%)

in 1:1-verdunning 10,0– 9,9 mg diacetyl (91–90%)

4.2.2.5. Nader onderzoek van osazonfrakties van uit rook afkomstige carbonylverbindingen

Hoewel uit rook een aantal derivaten van carbonylverbindingen kunnen worden afgezonderd die zeer veel overeenkomst lijken te vertonen met de derivaten van de hiervoor genoemde hydroxy- en dicarbonylverbindingen, is het toch nodig, deze frakties nader te identificeren.

4.2.2.5.1. Spectrografisch onderzoek

De electronenspectra van genoemde frakties zijn vergeleken met die van de zuivere osazonen. Bij glycolaldehyde, acetol en methylglyoxaal traden hier geen moeilijkheden op. De gevonden extinctiewaarden werden zodanig herleid dat de extinctie in de top van de curve op 0,500 kwam.

De concentraties van glyoxaal en diacetyl in het betreffende eluaat waren hiervoor echter te laag. Voor de isolatie van een voldoende hoeveelheid werd gebruik gemaakt van een dikkere kolom (inwendige diameter 2,0 cm), die met 10 g adsorbens werd gevuld en waarop 10 in plaats van 1 ml van de osazonoplossing werd gebracht. Het eluaat met de glyoxaal- of de diacetylfractie werd in een roterende vacuumverdamper (Büchi Rotavapor, R') bij ca 40° drooggedampt en vervolgens opnieuw gechromatografeerd, nu op de kleine kolom. De concentraties van de osazonen waren nu hoog genoeg om een betrouwbare meting te waarborgen.

Bij de hernieuwde chromatografie van de diacetyl- en vooral de glyoxaalband waren vaag enige andere banden te zien, die slecht van de hoofdcomponent loskwamen. Ze werden niet geïsoleerd, maar tezamen met de hoofdcomponent opgevangen.

De spectra van de glycolaldehyde-, de methylglyoxaal- en de diacetylband bleken praktisch identiek met die van hun referentiestoffen. Het spectrum van de glyoxaalband vertoonde een lichte afwijking; dat van de acetolband week nog iets meer af; zie de figuren 14, 15 en 16.

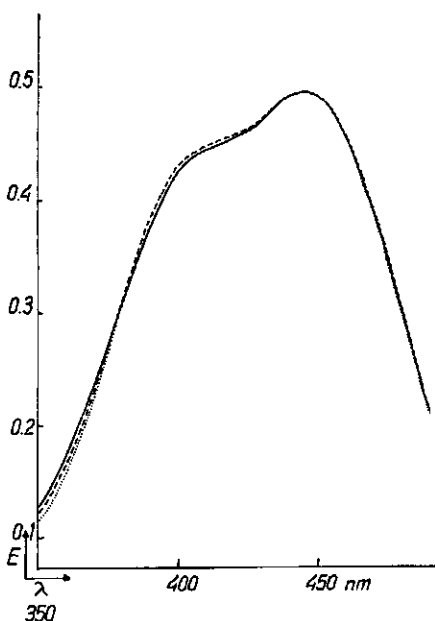


FIG. 14. Extinctiecurven van glyoxaal-DNP-osazon (—) en van de overeenkomstige derivaten uit rook (---, glyoxaal; . . . , glycolaldehyde), in pyridine/benzeen/ethanol 5:5:2.

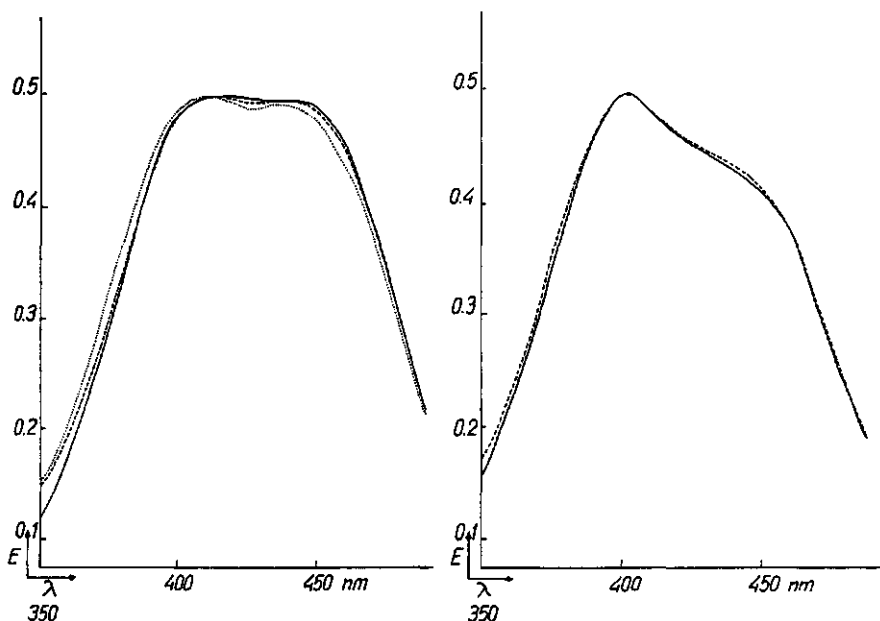


FIG. 15. Extinctiecurven van methylglyoxaal-DNP-osazon (—) en van de overeenkomstige derivaten uit rook (---, methylglyoxaal; . . . , acetol), in pyridine/benzeen/ethanol 5:5:2.

FIG. 16. Extinctiecurven van diacetyl-DNP-osazon (—) en van de overeenkomstige derivaten uit rook (---) in pyridine/benzeen/ethanol 5:5:2.

4.2.2.5.2. Massaspectrografisch onderzoek

De vijf frakties zijn ook nog aan een massaspectrografisch onderzoek onderworpen. Hiervoor was het nodig, de reeds geïsoleerde derivaten volkomen te bevrijden van allerlei verontreinigingen, bijvoorbeeld sporen vet uit de oplosmiddelen. Al het benodigde glaswerk werd daartoe zorgvuldig gereinigd met bichromaat/zwavelzuur, terwijl de elutie plaatsvond met solvens, waarvan alle bestanddelen tweemaal vanuit een geheel glazen apparatuur waren gedestilleerd. De te onderzoeken eluaten werden bij 40° drooggedampt aan de vacuumverdampers, weer opgelost in wat droge pyridine en opnieuw op een zinkcarbonaatkolom gebracht. Teneinde eventuele vetresten volledig te verwijderen werden 25 ml droog solvens door de kolom gevoerd. Gedurende deze handeling bleven de blauwe osazonbanden vrijwel op hun plaats bovenin de kolom.

Vervolgens werd met zeer nat solvens geëluëerd. Alle banden verplaatsten zich nu snel en konden in zeer kleine eluaatvolumina worden geconcentreerd. Deze eluaten, waarvan het volume steeds kleiner dan 1 ml was, werden vervolgens aan de vacuumverdampers drooggedampt. Hoewel dit waarschijnlijk niet meer nodig was, werd de gehele procedure voor alle zekerheid nog een keer herhaald.

Daarna werden van de aldus gezuiverde frakties massaspectra opgenomen

met de reeds genoemde A.E.I.-M.S.-9-massaspectrometer. Deze gaven het volgende te zien:

Methylglyoxaalfractie: Een zeer hoge piek bij M.G. = 432 (methylglyoxaal-DNP-osazon), met bijbehorende fragmentpiek op M.G. = 415 (1 H- en 1 O-atoom minder). Verder een duidelijke piek bij M.G. = 446, met bijbehorende fragmentpiek op M.G. = 429. Bij lagere M.G.-waarden vele fragmentpieken.

De piek bij M.G. = 446 kan veroorzaakt zijn door het osazon van diacetyl of van ethylglyoxaal (2-ketobutanal). Butaandial en 3-ketobutanal vallen als mogelijkheid af vanwege de totaal andere eigenschappen van hun bis-hydrasonen, die zich op de zinkcarbonaatkolom veel sneller zullen verplaatsen. Mogelijk is een staart van de vorige band (diacetyl) in de methylglyoxaalfractie terechtgekomen; waarschijnlijk is dit echter niet, omdat deze diacetylband zeer smal is ten opzichte van die van methylglyoxaal, en omdat deze banden bovendien zeer goed van elkaar zijn gescheiden. In elk geval zouden we niet de duidelijke piek verwachten die we nu waarnemen.

Het massaspectrum suggereert een hoeveelheid van de component met M.G. = 446, die ongeveer 5 à 10% van het totaal bedraagt. Zo'n hoeveelheid zou echter een merkbare afwijking in het electronenspectrum te zien geven. Dit is geenszins het geval; zie 4.2.2.5.1. We nemen daarom voorlopig aan dat de piek bij M.G. = 446 is veroorzaakt door de aanwezigheid van ethylglyoxaal.

Glyoxaalfractie: Een hoge piek bij M.G. = 418 (glyoxaal-DNP-osazon), met fragmentpiek bij M.G. = 401. Verder duidelijke pieken bij M.G. = 432 en 446, en een zeer kleine bij M.G. = 458.

In dit geval is het wel waarschijnlijk dat een staart van de (brede) methylglyoxaalband bij de (zeer smalle) glyoxaalband is terechtgekomen. De verhouding tussen de pieken bij M.G. = 432 en 446 was dezelfde als in de vorige band.

Aan het kleine piekje bij M.G. = 458 is verder geen aandacht besteed.

Acetolfractie: Alleen methylglyoxaalosazon was duidelijk herkenbaar (M.G. = 432; fragmentpiek bij M.G. = 415).

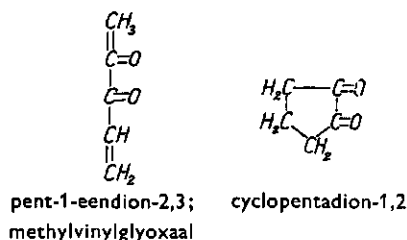
Glycolaldehydefractie: Piek bij M.G. = 418; fragmentpiek bij M.G. = 401.

Geen piek bij M.G. = 448, dus geen triose-osazonen aanwezig. Ook geen andere osazonpieken waargenomen.

Diacetylfractie: Piek bij M.G. = 446 (diacetylosazon) met bijbehorende fragmentpiek op M.G. = 429. Daarnaast een zeer hoge piek bij M.G. = 458; een fragmentpiek bij M.G. = 441 ontbrak echter. Verder nog vrij duidelijke pieken bij M.G. = 472 en 476, en zwakke bij M.G. = 486 en 498.

Van de stof met M.G. = 458 werd de brutoformule bepaald: deze was $C_{17}H_{14}N_8O_8$. (Diacetyl-DNP-osazon heeft als brutoformule $C_{16}H_{14}N_8O_8$, dus 1 C-atoom minder).

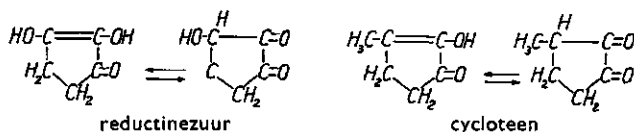
Voor de structuur van de oorspronkelijke verbinding uit rook bestaan de volgende mogelijkheden:



en de overeenkomstige hydroxycarbonylverbindingen.

De piek bij M.G. = 472 zal wel zijn veroorzaakt door het bis-hydrizon van cycloteen.

Evenals het verwante reductinezuur, dat onder meer uit pectine en uit xylose kan ontstaan (ZERBAN en SATTLER, 1955), zal bij deze verbinding een keto-enol-evenwicht optreden, waarbij de ketovorm het bis-hydrizon kan geven. Overigens bleek cycloteen pas bij verhitten met 2,4-dinitrofenylhydrazine een neerslag te geven; dit neerslag is het bis-hydrizon.



De piekjes bij M.G. = 476, 486 en 498 zijn niet verder onderzocht.

Behalve bij de diacetylfractie blijkt uit deze waarnemingen inderdaad, dat de geïsoleerde fracties uit de osazonen van respectievelijk methylglyoxaal, acetol, glyoxaal en glycolaldehyde bestaan, en dus als zodanig mogen worden aangeduid. Met enig voorbehoud kan ook de diacetylfractie, mede gezien haar electronenspectrum, als 'diacetyl' worden vermeld.

4.2.2.6. Nabeschuwing

De in deze afdeling besproken hydroxy- en dicarbonylverbindingen behoren niet tot de thans algemeen bekende rookbestanddelen, hoewel met name glycolaldehyde, acetol en methylglyoxaal belangrijke rookcomponenten blijken te zijn, zie 4.3.1 en 4.3.2. Diacetyl is de enige van deze verbindingen die regelmatig als rookbestanddeel vermeld wordt.

Methylglyoxaal is, voor zover we konden nagaan, slechts éénmaal gevonden in houtrook (HOLLENBECK en MARINELLI, 1963), glyoxaal eveneens (LANGNER, 1966). MARTIN (1958) noemt glyoxaal als bestanddeel van tabaksrook, naast diacetyl en pentadion-2,3. Door FIDDLER c.s. (1966) wordt acetol echter genoemd als één van de belangrijkste rookbestanddelen. GOOS (1952) vermeldt acetol, glyoxaal en ook glycolaldehyde als bestanddelen van houtdestillaat.

ROUDIER (1963) konstateerde de aanwezigheid van methylglyoxaal in 'Tollensdestillaat' (de vloeistof die wordt verkregen door destillatie van hout of cellulose met een sterk zuur).

GROENEN (1966) vond langs gaschromatografische weg de azijnzure esters van acetol en glycolaldehyde in rookcondensaten. Vermoedelijk zijn deze esters door secundaire reacties ontstaan. – Acetol heeft hij langs deze weg eveneens kunnen vinden; glycolaldehyde, glyoxaal en methylglyoxaal echter nooit. Waarschijnlijk zijn deze zeer reactieve stoffen niet tegen een gaschromatografische analyse bestand. Zelfs van het minder reactieve diacetyl is bekend, dat het in de gaschromatograaf ontleeft (SPANYÁR c.s., 1966). Mogelijk is dit een van de redenen waarom deze stoffen vrijwel onbekend zijn als rookbestanddelen.

Ook bij de kwantitatieve analyse van carbonylverbindingen met behulp van dinitrofenylhydrazine is de kans echter groot, dat zij niet als zodanig worden herkend. Glycolaldehyde en acetol slaan in de koude vrijwel niet neer, en indien zij wel neerslaan kunnen zij voor glyoxaal resp. methylglyoxaal worden aangezien. De osazonen van deze verbindingen zijn zeer slecht oplosbaar in de meeste organische oplosmiddelen; sporen die er toch in oplossen zijn waarschijnlijk meermalen als 'onbekende carbonylverbinding' betiteld. JAHNSEN (1961) nam, bij kolomchromatografisch onderzoek van DNPH-derivaten van carbonylverbindingen uit rookcondensaten, vier osazonbanden waar die hij, op grond van hun electronenspectra, alle als diacetyl aanduidde.

Regeneratie met levulinezuur (KEENEY, 1957), een methode die door Love en Bratzler werd toegepast en waarbij de oorspronkelijke carbonylverbindingen uit hun DNP-hydrazonen worden vrijgemaakt, verloopt zeer moeizaam bij diacetyl en is waarschijnlijk onmogelijk bij methylglyoxaal en glyoxaal.

Voorts moet er nog op worden gewezen dat genoemde verbindingen in geconcentreerde oplossingen als bijvoorbeeld rookcondensaten wellicht spoedig verdwijnen door polymerisatie- of condensatiereacties. SPANYÁR c.s. (1960b) evenwel vinden grote hoeveelheden 'osazonvormende oxi- en dicarbonylverbindingen' in rook; deze groep is altijd groter dan die der monocarbonylverbindingen.

Het voorkomen van α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen – die onder meer ontstaan als splitsings- en dehydratieprodukten van koolhydraten, zie 3.5.2 – is zeer plausibel in al die gevallen waar koolhydraten aan een warmtebehandeling werden onderworpen. Inderdaad zijn glyoxaal en glycolaldehyde genoemd als belangrijke pyrolyseprodukten van cellulose (SCHWENKER en PASCU, 1957). Acetol wordt gevonden in ahornstroop (FILIPIC, UNDERWOOD en WILLITS, 1965), in rietsuikermelasse (ZERBAN en SATTLER, 1955) en zelfs in verhitte melk (KEENEY c.s., 1950).

Tenslotte moeten nog enige andere mogelijkheden voor het bepalen van α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen naast elkaar worden genoemd.

SATTLER en ZERBAN (1949) beschrijven de condensatie van acetol met o-aminobenzaldehyde tot 3-hydroxychinaldine; methylglyoxaal reageert niet met deze verbinding. Het chinolinederivaat kan worden gekoppeld aan gediazoteerd sulfanilzuur, en vervolgens in de spectrofotometer gemeten. – Methylglyoxaal kan,

volgens dezelfde auteurs, worden gecondenseerd met 5,6-diaminouracil tot methyllumazine, dat zeer sterke ultravioletabsorptie vertoont en dus eveneens spectrofotometrisch kan worden bepaald.

Waarschijnlijk verlopen deze reacties ook bij andere α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen.

LENTO, UNDERWOOD en WILLITS (1960) scheidden acetol, methylglyoxaal en diacetyl op een kolom met anionenwisselaar in de bisulfietvorm.

Geen van deze methoden, of een combinatie van deze methoden, lijkt echter de voordelen te bieden van het hier beschreven analyseschema.

4.2.3. Andere carbonylverbindingen

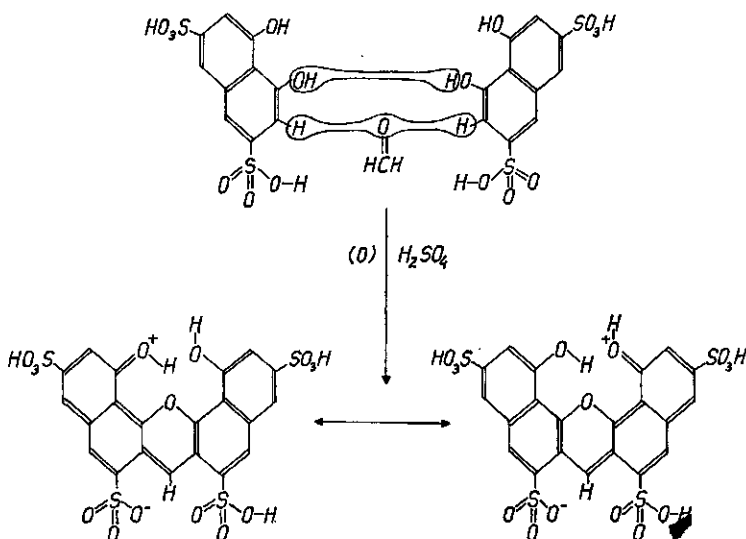
4.2.3.1. Formaldehyde

Algemeen wordt formaldehyde als een van de belangrijkste rookcomponenten beschouwd; de looiende eigenschappen van rook zouden zijn te danken aan de aanwezigheid van deze verbinding. (GUSTAVSSON (1947) vermeldt echter dat ook methylglyoxaal sterk looiende eigenschappen bezit, en hierin nauwelijks voor formaldehyde onderdoet).

Voorts is van formaldehyde beweerd, dat het bruiningsreacties tegengaat (HALL en NEDVIDEK, 1941; HAAS c.s., 1948; NOMURA, 1955). In hoofdstuk 5 zal blijken dat dit niet geldt voor de bruiningsreacties tussen rookcomponenten en aminogroepen. In ieder geval is duidelijk dat formaldehyde een belangrijk bestanddeel van rook is, vandaar ook dat wij aan onze rookanalyse een formaldehydebepaling wensen toe te voegen.

Formaldehyde kan worden bepaald met chromotroopzuur (1,8-dihydroxy-naftaleen-3,6-disulfonzuur) in geconcentreerd zwavelzuur. Hierbij ontstaat een, voor formaldehyde specifieke, paarse kleur.

Deze reactie, die in 1937 door EGGRIWE werd beschreven, berust waarschijnlijk op het volgende mechanisme (KAMEL en WIZINGER, 1960):



SAWICKI (1961) veronderstelt, dat de opbouw van een dergelijk kleurstofmolecuul met andere aldehyden wordt verhinderd door de aanwezigheid der sulfonzuurgroepen; de specificiteit van de reactie zou dus op sterische hindering berusten. Door WEST en SEN wordt echter een kleurreactie op formaldehyde met 2,7-dihydroxynaftaleen beschreven, die eveneens specifiek is. Dit feit maakt bovengenoemde veronderstelling weer minder waarschijnlijk.

Verbindingen die tijdens de behandeling met zwavelzuur formaldehyde afsplitsen geven de reactie ook. Dit doet zich onder meer bij diacetyl voor, en wel in een zodanige mate dat hierop een kwantitatieve diacetylbepaling kan worden gebaseerd (SPECK, 1948).

West en Sen hebben de condities van de formaldehyde-chromotroopzuur-reactie uitvoerig bestudeerd. Zij vonden, dat tijdens de reactie een zwavelzuur-concentratie van minstens 86 % nodig is, daar de kleurontwikkeling anders onvoldoende tot stand komt. Aan de formaldehydeoplossing moet dus zoveel zwavelzuur worden toegevoegd, dat de eindconcentratie hiervan meer dan 86 % bedraagt. De optredende mengwarmte is voldoende om de reactie kwantitatief te laten verlopen.

De top van de extinctiecurve ligt bij ongeveer 570 nm; de molaire extinctie bedraagt daar 11.400. Verdunnen met water na de reactie heeft, behalve natuurlijk het normale verdunningseffect, geen kleurvermindering tot gevolg.

De volgende uitvoering wordt door West en Sen aanbevolen: Aan 1 ml formaldehydeoplossing wordt 1 ml 1 % chromotroopzuuroplossing in geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. Onmiddellijk hierna wordt zoveel geconcentreerd zwavelzuur bijgevoegd dat in het reaktiemengsel minstens 86 % aanwezig is. Na enige minuten wordt met water verdund en na afkoeling tot het gewenste volume aangevuld. Men meet de extinctie der oplossing bij 570 nm.

Spányár c.s. voeren de reactie uit in een oplossing die ongeveer 65 % zwavelzuur bevat. Uit de door hen opgegeven omrekeningsfaktor valt merkwaardigerwijze een veel hogere ϵ -waarde te berekenen, namelijk 21.000.

De methode volgens West en Sen gaf bij ons hogere extinctiewaarden en ook trad een afwijking van de wet van Beer op. Wij vonden de top niet bij 570 doch bij 580 nm. De metingen werden uitgevoerd op de Beckman B-spectrofotometer.

De gevonden molaire extincties varieerden van 12.750 (100 μ g formaldehyde in bewerking) tot 14.400 (25 μ g in bewerking). De oplossingen werden uitverdund tot 50 ml.

De methode wordt natuurlijk veel gevoeliger indien slechts tot 10 ml wordt uitverdund (dit volume is nauwelijks meer dan dat van het reaktiemengsel). De wet van Beer werd nu wel gehoorzaamd; de molaire extinctie bedroeg 17.250 (2 tot 20 μ g formaldehyde in bewerking). SAWICKI vermeldt een molaire extinctie van 15.700.

Door West en Sen wordt acroleïne genoemd als het enige aldehyde dat de bepaling ernstig stoort. De storing kan echter worden verminderd door de overmaat reagens te vergroten.

Volgens Sawicki kan de kleurvorming ook door glyoxaal en methylglyoxaal

worden gehinderd. Diacetyl geeft, zoals reeds werd vermeld, een positieve storing.

Wij vonden dat de aanwezigheid van een vijfvoudige overmaat methylglyoxaal of glycolaldehyde de kleurvorming ernstig remt: minder dan de helft van het aanwezige formaldehyde werd teruggevonden. In eerste instantie ontstaan afwijkende kleuren (geelgroen bij methylglyoxaal, olijfgroen bij glycolaldehyde), die echter bij het verdunnen met water verdwijnen. Vergroting van de overmaat reagens gaf geen verbetering. In een verdunning van rookwater, op deze wijze behandeld, ontstond eveneens een afwijkende groene kleur en was pas na verdunning een zwakke paarse kleur te zien.

Het vooraf verwijderen van de storende stoffen zou een goede oplossing kunnen geven. Een mogelijkheid daartoe biedt de methode van BRICKER en VAIL (1950). Volgens deze auteurs storen vele organische stoffen de reactie, doordat formaldehyde in sterk zwavelzuur milieu met deze stoffen reageert en daarbij zijn vermogen verliest om een paarse kleur met chromotroopzuur te produceren. Nu bleek echter dat formaldehyde zich reeds bij afwezigheid van zwavelzuur met chromotroopzuur kan verbinden. Deze verbinding is kleurloos; wordt hierna zwavelzuur toegevoegd, dan ontstaat de paarse kleur.

Bricker en Vail zagen hierin een mogelijkheid om storende verbindingen te verwijderen. Na reactie met chromotroopzuur wordt het reaktiemengsel drooggedampt; storende verbindingen die voldoende vluchtig zijn zullen dan eveneens verdwijnen. Daarna wordt zwavelzuur toegevoegd en enige tijd verwarmd; de kleur komt nu tot stand en kan na uitverdunnen worden gemeten.

De volgende procedure wordt aanbevolen: Weeg 100 mg chromotroopzuur af en voeg 1 ml van de te onderzoeken formaldehydeoplossing toe, die niet meer dan 0,1 mg van deze stof mag bevatten. Damp droog op een kookplaat of in een oliebad dat niet warmer is dan 200°. Voeg 5 ml zwavelzuur toe, verhit 30 minuten in een kokend waterbad en verdun daarna tot 50 ml. Meet bij 570 nm. De wet van Beer geldt voor formaldehydeconcentraties tot 100 µg/ml; de molaire extinctie bedraagt 12.300.

Het is ons niet gelukt, met deze methode goed reproduceerbare resultaten te verkrijgen. Alle door ons gevonden waarden waren veel lager dan die van Bricker en Vail.

Iets hogere waarden verkregen we door bij lagere temperaturen droog te dampen. We konkludeerden dat een gedeelte van het formaldehyde blijkbaar toch verdampt, en wel des te meer naarmate de temperatuur hoger is.

Een mengsel van 0,1 mg formaldehyde en 1 mg natriummetabisulfiet ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), in 1 ml water opgelost en voorzien van reagens, bleek na droogdampen een kleur te ontwikkelen die sterker was dan de door Bricker en Vail gemeten kleur en gelijk aan het via de methode West en Sen verkregen resultaat. We vermoeden dat ook Bricker en Vail een gedeelte van hun formaldehyde door verdamping zijn kwijtgeraakt.

Uit proeven met een aantal hydroxy- en dicarbonylverbindingen bleek nog, dat met name glyoxaal en methylglyoxaal de reactie blijven storen, zij het dan nu in positieve zin. Daar beide stoffen de paarse kleur blijken te produceren, moet

worden aangenomen dat tijdens het droogdampen uit deze stoffen verbindingen ontstaan die bij behandeling met geconcentreerd zwavelzuur formaldehyde afsplitsen. Bij gelijke hoeveelheden formaldehyde en glyoxaal of methylglyoxaal bedraagt de fout, door de dicarbonylverbinding veroorzaakt, 2 tot 5%. Ook glycolaldehyde veroorzaakt een fout, in de orde van 1% (onder deze omstandigheden). Diacetyl stoort niet.

We achten deze afwijking te groot om ons zonder meer met deze onelegante methode tevreden te stellen.

Rest nog de door Spanyol c.s. beschreven werkwijze. Deze luidt als volgt: Aan 1 ml van de te onderzoeken oplossing wordt 1 ml 0,5% chromotroopzuuroplossing toegevoegd en vervolgens 8 ml zwavelzuur van ca 81% w/w (bereid door 3 volumedelen geconcentreerd zwavelzuur te mengen met 1 volume-deel water). Dit mengsel wordt 15 minuten in een kokend waterbad geplaatst, afgekoeld en gemeten in een Pulfrich- spectrofotometer met gebruikmaking van het filter S 57.

We stonden sceptisch tegenover dit voorschrift vanwege de lage zwavelzuurconcentratie (65%) in het reaktiemengsel. Volgens West en Sen dient deze concentratie immers minstens 86% te bedragen. We konden evenwel op deze wijze een fraaie ijkcurve verkrijgen en vonden een molaire extinctie van 17.600, ongeveer even hoog als in de gemodificeerde West en Sen- bepaling. De storing door glycolaldehyde is hier minder ernstig. Methylglyoxaal geeft ditmaal een positieve storing. – De volgende afwijkingen werden gevonden (in oplossingen met ongeveer 5 µg formaldehyde/ml):

Verhouding formaldehyde: glycolaldehyde	Fout
1:1	-11%
1:2	-13%
1:5	-25%
1:10	-34%

Verhouding formaldehyde: methylglyoxaal	
1:1	+ 5%
1:2	+ 9%
1:5	+ 19%
1:10	+ 33%

Diacetyl vertoonde nog iets grotere afwijkingen dan methylglyoxaal; acetol stoorde vrijwel niet.

Hoewel ook deze uitvoering nog verre van ideaal kan worden genoemd; is zij door haar eenvoud toch wel een bruikbaar hulpmiddel bij de rookanalyse; er kan in elk geval op snelle wijze een indruk van het formaldehydegehalte van rookwater mee worden verkregen.

Voor een nauwkeuriger bepaling van dit gehalte echter moet naar een andere methode worden omgezien. Het lijkt zeer wel mogelijk, deze stof te bepalen zoals ook de dicarbonylverbindingen zijn bepaald, namelijk door isolatie van het DNPH- derivaat op een kolom, gevolgd door een extinctiemeting.

Elutie van het hydrazon van formaldehyde over de zinkcarbonaatkolom leidt

niet tot verliezen. Hoewel deze kolom in hoofdzaak naar groepen scheidt en niet zozeer naar ketenlengte (VAN DUIN, 1961), kon het formaldehydehydrazon toch van de derivaten van andere alifatische aldehyden worden gescheiden.

De curve van formaldehydehydrazon in het eluens heeft een top bij 355 nm met een molaire extinctie van 19.600.

Helaas lost het formaldehydehydrazon merkbaar op in water en nog beter in verdund zwavelzuur, hetgeen bij lage concentraties aan formaldehyde tot merkbare verliezen kan leiden. PIHA c.s. (1960) wezen er echter op dat de oplosbaarheid van sommige hydrazonen wordt teruggedrongen door de aanwezigheid van andere carbonylderivaten.

Een en ander is door ons nagegaan voor een mengsel van glycolaldehyde, methylglyoxaal en formaldehyde, dat volgens de in 4.2.1 beschreven procedure werd neergeslagen.

Daarbij werden de volgende gegevens verkregen:

Samenstelling mengsel (per 100 ml water)	Teruggevonden formaldehyde:
100 mg methylglyoxaal, 200 mg glycolaldehyde, 40 mg formaldehyde	74 %
50 mg methylglyoxaal, 100 mg glycolaldehyde, 20 mg formaldehyde	15 %
25 mg methylglyoxaal, 50 mg glycolaldehyde, 10 mg formaldehyde	7 %
40 mg formaldehyde	67 %
20 mg formaldehyde	28 %
10 mg formaldehyde	4 %

Bij lage formaldehydeconcentraties schiet deze methode dus volkomen tekort. De aanwezigheid van andere carbonylverbindingen geeft niet de gewenste verbetering.

Redelijk goede resultaten werden tenslotte verkregen met de volgende methode: Aan 1 ml rookwater werd 5 ml water en 1 ml DNPH-reagens toegevoegd. Dit mengsel werd gedurende 1 uur op 37° gehouden, daarna afgekoeld tot 0°. Het gevormde neerslag werd afgefilterd, gedroogd en opgelost in 25 ml pyridine. Een gedeelte hiervan, meestal 1 ml, wordt op de zinkcarbonaatkolom gebracht, waarna de formaldehydeband kan worden afgescheiden en gemeten.

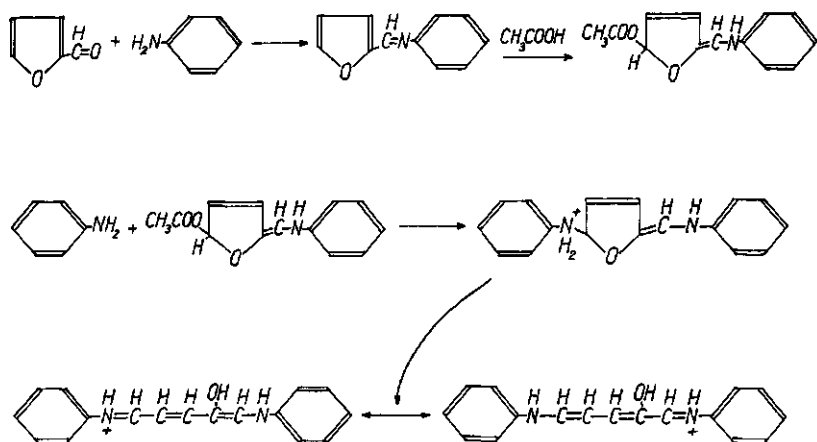
Het is bij deze bepaling nodig om met zeer droog solvens te werken. Desnoods kan de ethanol hieruit worden weggelaten.

4.2.3.2. Furfural

Furfural ontstaat bij de pyrolyse van hout als eerste afbraakprodukt van pentosanen, die rijkelijk zijn vertegenwoordigd in de vorm van hemicellulose.

Hoewel furfural vrijwel geen rol speelt bij de bruiningsreacties van rook met aminogroepen, heeft een bepaling toch zin omdat furfural door velen als een van de belangrijkste componenten van rook wordt gezien. Wellicht is furfural de precursor van actievere verbindingen, die er door pyrolyse uit kunnen ontstaan.

Furfural kan zeer goed worden bepaald door middel van de Stenhouse-reaktie. Dit is een reaktie van furfural met een aromatisch amine in zuur milieu, waarbij een intensief rode kleurstof wordt gevormd (AESCHLIMANN c.s., 1958):



De door SPANYÁR c.s. (1960a) vermelde uitvoering leidde tot goede resultaten. Hun voorschrift luidt als volgt:

Men vult 10 ml vers gedestilleerde aniline aan tot 100 ml met ijsazijn. Ook wordt een oplossing bereid van 0,3% NaCl in 90% ethanol.

Aan 5 ml van de furfuralbevattende oplossing wordt nu 5 ml van de NaCl-bevattende ethanol en 5 ml anilineoplossing toegevoegd. Het reaktiemengsel wordt even geschud en daarna 1/2 uur in het donker in ijswater geplaatst. De ontwikkelde kleur wordt gemeten in een Pulfrich-fotometer, met gebruikmaking van filter S 50. De kleur blijft nog ruim een half uur stabiel.

Uit de door de auteurs opgegeven omrekeningsfaktor kan een molaire extinctie van 19.200 worden berekend.

Op deze wijze konden wij een goed reproduceerbare ijklijn verkrijgen. Afwijkingen van de wet van Beer werden niet geconstateerd. De top van de extinctiecurve lag bij 520 nm. Voor de molaire extinctie in het maximum vonden wij iets meer, namelijk 20.400.

Aan de standaard-furfuraloplossingen dient wat zuur te worden toegevoegd, daar zij in neutraal milieu niet stabiel zijn. Wij maakten elke oplossing ongeveer 2% aan azijnzuur.

Van deze bepaling is bekend, dat zij door formaldehyde wordt gestoord (AESCHLIMANN, 1960). Ons bleek evenwel, dat de aanwezigheid van een tienmaal zo grote hoeveelheid formaldehyde geen extinctieverlaging tengevolge had, en dat pas een vijftigvoudige overmaat een extinctievermindering van bijna 20% opleverde. Hierbij moet worden aangetekend dat de overmaat aniline in de methode-Spanyár zeer veel groter is dan in de methode-Aeschlimann.

Indien methylglyoxaal en/of glycolaldehyde in zeer grote overmaat aanwezig zijn (100:1 ten opzichte van furfural), bestaat de mogelijkheid, dat deze componenten een bruingele kleur ontwikkelen, die de bepaling stoort. Deze kleur neemt gestadig toe en is na een etmaal al vrij donker. Wellicht is deze bruiningsreactie verwant aan die welke we reeds kennen. Bij onze analyses traden hierdoor zelden storingen op; indien wel, werd de gevonden extinctiewaarde gecorrigeerd

met behulp van een driepuntsmethode, waarvoor dan ook nog extinctiemetingen bij 500 en 540 nm nodig zijn.

4.2.3.3. Aceetaldehyde

Door SPANYÁR c.s. (1960a) wordt een methode beschreven voor de bepaling van aceetaldehyde, die berust op de vorming van een staalblauwe kleur met natriumnitroprusside en piperazine, waarvan de intensiteit evenredig is met de concentratie van dit aldehyde.

Volgens FEIGL (1960) is het reactiemechanisme niet bekend. AWE (1951) geeft een overzicht van aan deze reactie gewijde publikaties. Hierin wordt onder meer vermeld dat de blauwe kleur allerminst bestendig is, doch geleidelijk aan over roodviolet en rood naar geel omslaat. De reactie wordt ook gegeven door propionaldehyde en door acroleïne, doch in mindere mate. Voorts blijkt piperazine ook door andere secundaire aminen te kunnen worden vervangen.

Het voorschrift van Spanyol c.s. voor de aceetaldehydebepaling in rookcondensaten, luidt als volgt:

1-8 ml van de te onderzoeken oplossing wordt in een gecalibreerde 15 ml-reageerbuis met stop gebracht en met water tot 8 ml aangevuld. Daarna voegt men 1,5 ml verzadigde piperazine-oplossing toe en zet het reactiemengsel korte tijd in ijswater.

Na afkoeling wordt 0,5 ml 4%-ige natriumnitroprusside-oplossing toegevoegd en het reactiemengsel weer in ijswater geplaatst. De staalblauwe kleur, die zich nu ontwikkelt, moet na 20 minuten binnen 5 minuten worden gemeten. Deze meting geschiedt in een Pulfrich-fotometer, met het filter S 57.

Met behulp van dit voorschrift, dat op enige ondergeschikte punten werd gewijzigd (de meetoplossing werd in een maatkolffje van 10 ml bereid, de meting werd met een Beckman B-spectrofotometer uitgevoerd), kon een redelijk reproduceerbare ijklijn worden verkregen. De metingen werden uitgevoerd bij 580 nm; de extinctie bleek bij ongeveer deze waarde maximaal.

Methylglyoxaal bleek onder deze omstandigheden een rode kleur te geven – een reactie die overigens ook door BARRENSCHEEN en BRAUN (1931) is vermeld. De aceetaldehydebepaling werd hierdoor in hoge mate gehinderd, zoals de volgende tabel te zien geeft:

Verhouding aceetaldehyde:methylglyoxaal Fout in de aceetaldehydebepaling

1:1	+ 16%
1:2	+ 19%
1:3	+ 25%
1:5	+ 43%

Toepassing van de reactie op enkele monsters rookwater gaf de rode kleur van methylglyoxaal te zien, en niet de blauwe kleur van aceetaldehyde. We konkluderen hieruit dat de methode, althans in deze vorm, niet bruikbaar is voor de bepaling van aceetaldehyde in onze rookoplossingen.

Wel werden de rode analyseoplossingen, uit rookwater afkomstig, nog geme-

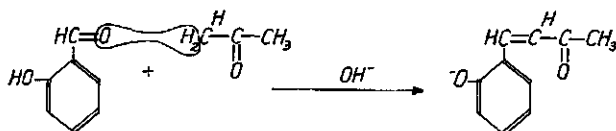
ten bij 580 nm en de resultaten omgerekend op acetaldehyde. We vonden 10 à 20 mg/100 ml rookwater, hetgeen veel lager is dan de doorgaans gevonden gehalten aan formaldehyde, zie 4.3.1 en 4.3.2. Daarbij komt dan nog, dat deze berekende waarden veel te hoog zijn, omdat de kleurontwikkeling grotendeels op rekening van het – rijkelijk aanwezige – methylglyoxaal zal komen. Het gehalte aan acetaldehyde in rookwater moet dus zeer laag zijn. Om die reden hebben we er van afgezien, deze bepaling voor onze monsters bruikbaar te maken.

Merkwaardig is, dat dikwijls meer acetaldehyde dan formaldehyde in rook wordt gevonden (SPANYÁR c.s., 1960b; RUSZ, 1962; LOVE en BRATZLER, 1966). Voor deze paradox zijn verschillende verklaringen te bedenken, die we hier echter, vanwege hun enigszins speculatieve karakter, achterwege zullen laten.

4.2.3.4. Aceton

Aceton wordt dikwijls genoemd als een belangrijk bestanddeel van rook en van houtdestillaten. Soms wordt het gehalte aan carbonylverbindingen in rookoplossingen berekend als aceton (SPANYÁR, 1960a; RUSZ, 1962). Om deze redenen hebben wij enige aandacht besteed aan de bepaling van het acetongehalte in onze rookwatermonsters.

Een bekende acetonbepaling, reeds door LINTON en FRENCH (1945) toegepast op gerookte produkten, berust op de condensatie met salicylaldehyde in alkalisch milieu:



De gevormde verbinding, methyl-o-hydroxycinnamylketon, vertoont in alkalisch milieu een sterke bruinoranje kleur, die een spectrofotometrische bepaling mogelijk maakt. Het ion van salicylaldehyde is in alkalisch milieu lichtgeel.

THOMSON (1946) heeft de specificiteit van deze reactie onderzocht. Alle verbindingen met de groep $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ vertonen de reactie; aceton echter in zeer sterke mate.

Spanyár c.s. geven voor de bepaling van aceton in rookcondensaten het volgende voorschrift:

In een gecalibreerde 15 ml-reageerbuis met ingeslepen stop wordt 1 ml van de te onderzoeken oplossing met 0,5 ml salicylaldehyde (20% v/v in alcohol) en 1 ml kaliloog (63,5% w/v) aangevuld. Na schudden wordt de buis 20 minuten in een waterbad van 50° geplaatst. Daarna koelt men het reactiemengsel af, vult aan met water tot 15 ml en laat het 30 minuten in het donker staan. De meting van de ontwikkelde kleur geschiedt in een Pulfrich-spectrofotometer, met gebruikmaking van het filter S 47. De compensatieoplossing is een chemicaliën-blanco.

Dit voorschrift is door ons overgenomen, met dien verstande dat de oplossingen niet tot 15 doch tot 10 ml werden aangevuld, en met de Beckman B-spectrofotometer werden gemeten bij 470 nm.

De bepaling bleek echter niet zo goed reproduceerbaar. De oorzaak lag in een nogal wisselvallige blancowaarde. We geven hier, ter illustratie, de extinctiewaarden van twee blancobepalingen in het golflengtegebied van 450 tot 500 nm, gemeten tegen water:

Golflengte	Extinctie der blancobepalingen	
450 nm	>2	2,0
460	0,86	0,775
470	0,277	0,247
480	0,104	0,099
490	0,050	0,051
500	0,030	0,036

Een gelukkige bijkomstigheid is, dat de extinctiecurve van het reactieproduct een zeer stompe top heeft tussen 460 en 480 nm vrijwel niet verandert. Derhalve besloten we, de metingen bij 480 nm te verrichten. Bij deze golflengte werd inderdaad een rechte en goed reproduceerbare ijkcurve verkregen.

Ook bij 490 nm kon goed worden gemeten. De bepaling was hier iets minder gevoelig (molaire extinctie 14.500; bij 480 nm 15.400).

Glycolaldehyde en methylglyoxaal geven geen reactie. Het aan aceton zeer verwante methylethylketon geeft – merkwaardigerwijze – ook vrijwel geen reactie. Het is daarom o.i. de vraag of het bovenbeschreven reactiemechanisme (o.m. door Thomson gepostuleerd) wel juist is.

Acetol reageert zeer traag. Furfural zou enige storing in de bepaling kunnen veroorzaken, doordat het in alkalisch milieu een bruine kleur ontwikkelt. De fout in de analyse bedraagt, bij aanwezigheid van een vijfvoudige hoeveelheid furfural, ongeveer 10 %. Een dergelijke hoeveelheid acetol geeft een fout van 17 %, diacetyl 30 %. – Slechts acetol zou als storende stof van enig belang kunnen zijn.

Op rookwater uitgevoerd, blijken de bij 480 nm gevonden acetongehaltes steeds hoger dan de cijfers die volgen uit de metingen bij 490 nm. De verschillen bedragen ongeveer 10 tot 15 %. Mogelijk treedt nog een ander storend effect op. We hebben de bij 490 nm verkregen waarden als de zuiverste beschouwd, en die dan ook vermeld.

De hoeveelheid aceton in rookwater blijkt vrij onbeduidend, zie 4.3.1 en 4.3.2.

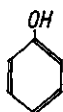
4.2.4. Fenolen

De fenolen in houtrook spelen een belangrijke rol in de vorming van het karakteristieke rookaroma. Ze zijn afkomstig uit lignine.

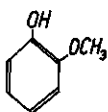
Ligninen zijn polymere verbindingen van gekompliceerde samenstelling, die kunnen worden beschouwd als te zijn opgebouwd uit fenylpropaaneenheden (PEARL, 1964; BLAND en LOGAN, 1965).

In ligninen van naaktzadigen (waartoe de coniferen behoren) komen in hoofdzaak 3-methoxy-4-hydroxyfenylpropaanresten voor, terwijl de ligninen van bedektzadigen daarnaast ook 4-hydroxyfenylpropaan- en 3,5-dimethoxy-4-hydroxyfenylpropaanresten bevatten.

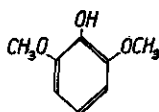
Wordt lignine aan pyrolyse onderworpen, dan kunnen in principe drie groepen van fenolen ontstaan; deze groepen kan men afleiden van de volgende verbindingen, die er zelf ook toe behoren:



fenol



2-methoxyfenol;
guaiacol

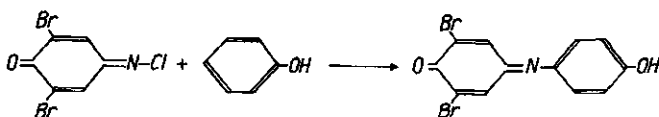


2,6-dimethoxyfenol

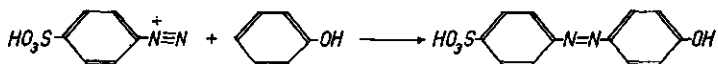
In vele gevallen zijn zij in de 4-positie gesubstitueerd; substituenten op andere plaatsen zijn echter ook mogelijk.

Voor de analyse van deze fenolische verbindingen in rook wordt meestal een van de volgende drie analysemethoden gebruikt:

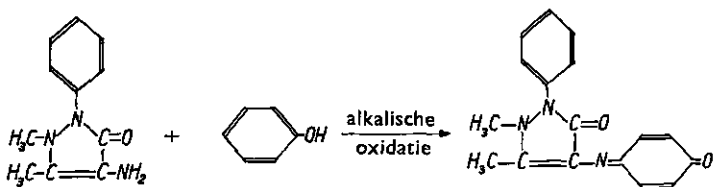
1. de methode volgens Gibbs (DOLEŽAL, 1958; KURKO, 1959a; SIMON c.s., 1966; ZIEMBA, 1964, 1967); 2,6-dibroomchinon-chloorimide (of 2,6-dichloorchinon-chloorimide) wordt hierbij gecondenseerd met een fenol volgens



2. de sulfanilzuurmethode (DOLEŽAL, 1957; SPANYÁR c.s., 1960a, 1961), waarbij de fenolen aan gediazoteerd sulfanilzuur worden gekoppeld, zodat een diazokleurstof ontstaat:



3. de aminoantipyrine-methode (FOSTER en SIMPSON, 1961a; HUSAINI en COOPER, 1957; RUSZ, 1962; TILGNER c.s., 1962a); de te onderzoeken vloeistof wordt hierbij voorzien van een overmaat 4-aminoantipyrine, waarna in zwak alkalisch milieu wordt geoxydeerd met $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$:



In alle gevallen ontstaan gekleurde oplossingen, waarvan de intensiteit evenredig is met het gehalte aan fenol(en).

Het bezwaar van deze analysemethoden is, dat de para-positie van het fenol-derivaat vrij moet zijn en dat p-gesubstitueerde fenolen dus niet reageren, of zeer onvolledig via een van hun o-posities. Het is bekend (en op grond van de

structuur van lignine ook te verwachten) dat de p-gesubstitueerde fenolen in rook zeer rijkelijk zijn vertegenwoordigd; geen van deze bepalingen zal dus het werkelijke gehalte aan fenolen in rookwater kunnen aangeven.

Volgens KURKO zijn met name de para-gesubstitueerde fenolen verantwoordelijk voor de rookgeur en -smaak (1963) en derhalve zouden met bovengenoemde methodes precies de verkeerde fenolen worden bepaald.

DAUN (1966) zegt goede waarden te vinden voor het totale fenolgehalte uit het verschil tussen twee titraties met loog, waarbij in de ene titratie op fenolftaleïne en in de andere op nijlblauw wordt getitreerd. Hij verkrijgt drie- tot vijfmaal hogere resultaten dan met een van de reeds genoemde methoden.

Ook met het fenolreagens van FOLIN en CIICALTEU (1927; MILLER, 1959; RIEDER, 1959) worden in principe alle verbindingen met fenolische OH-groepen bepaald. Deze methode is echter zeer gevoelig voor storingen en in het gekomplieerde mengsel, dat wij onderzoeken, bestaat geen enkele garantie dat inderdaad alleen fenolen worden bepaald. Inderdaad bleken, bij toepassing op rookwater, komplikaties op te treden, zoals ernstige afwijkingen van de wet van Beer.

Uiteindelijk hebben we ons toch gewend tot een der bepalingen van p-ongesubstitueerde fenolen, omdat het ons in dit onderzoek minder te doen was om een nauwkeurige bepaling van het totale gehalte aan fenolen, dan wel om een vergelijking met resultaten van andere onderzoekers mogelijk te maken.

De 4-aminoantipyrinemethode verdient zonder meer de voorkeur. De methode volgens Gibbs, die onder meer door KURKO (1959a) wordt aanbevolen, is bewerkelijk en bovendien duurt het meer dan 24 uur voor de reactie compleet is (STANLEY C.S., 1965). SPANYÁR en KEVEI (1961) gebruikten deze reactie in geval van nood, nl. als de sulfanilzuurmethode, door aanwezigheid van eiwitten, niet kon worden uitgevoerd. De sulfanilzuurmethode is echter eveneens bewerkelijk.

De bepaling met 4-aminoantipyrine is zeer eenvoudig uit te voeren. In eerste instantie deden we dit volgens het voorschrift van SNELL en SNELL (1953).

Een rechtstreekse bepaling in rookwater had onder meer het bezwaar, dat na toevoeging van de benodigde loog een bruingele verkleuring tot stand kwam als gevolg van de polymerisatie van o.a. furfural en methylglyoxaal. Na verdunning van het rookwater met een faktor 10 was deze storing praktisch verdwenen, doch nu bleek het wenselijk, door verkleining van de volumina der toegevoegde hulpstoffen de bepaling wat gevoeliger te maken. Deze bepaling werd uiteindelijk als volgt uitgevoerd:

Voeg toe aan 1,00 ml van de te onderzoeken oplossing: 1,00 ml 0,2 N natronloog, 2 ml boraatbuffer (24,7 g H_3BO_3 en 4 g NaOH per liter), 0,05 ml 4-aminoantipyrinereagens (3% w/v in water) en 0,10 ml kaliumferricyanideoplossing (10% w/v in water).

De kleur kan vrijwel direkt worden gemeten, en wel bij 510 nm. Hoewel deze kleur vrij lang konstant blijft (teruggang ca 1% per uur), verdient het toch aanbeveling, direkt te meten, daar p-gesubstitueerde fenolen op de duur ook enigszins gaan reageren, zodat de bepaling onzeker wordt.

Het gehalte aan fenolen in de onderzochte oplossing is gelijk aan $28,4 \cdot E_{510} \mu g/ml$, berekend als fenol.

De pH van het reaktiemengsel bedraagt 9,1 à 9,2. Door SINGER en STERN (1951) is als nadeel van deze methode genoemd, dat ze extreem gevoelig is voor kleine variaties in de pH. Wij kregen echter de indruk dat deze waarde niet zo kritisch is: bij een pH van 8,9 bleek de uitkomst slechts 1 % lager, bij een pH van 9,7 eveneens. Ook de kleur van de blanco bepaling bleek weinig pH-gevoelig.

Van een viertal rookoplossingen werden de met de aminoantipyrinemethode verkregen resultaten vergeleken met die van de sulfanilzuurmethode en de methode-Folin. De bepaling met sulfanilzuur werd uitgevoerd volgens SNELL en SNELL (1953), de Folinbepaling volgens MILLER (1959). We vonden de volgende waarden (alle uitgedrukt als mg C_6H_5OH per 100 ml rookwater):

	4-aminoantipyrine	Sulfanilzuur	Folin-Ciocalteu
1	11,5	12,8	45
2	25,8	25,0	159
3	20,3	24,2	112
4	12,0	14,3	61

De eerste twee bepalingsmethoden geven resultaten die in dezelfde grootte-orde liggen; de met de Folinbepaling gevonden waarden zijn vier- tot zesmaal zo hoog.

De Gibbs-methode is niet onderzocht.

4.2.5. Zuren

Het gehalte aan zuren werd bepaald door titratie met 0,1 N natronloog tot kleuromslag op fenolftaleïne. De gevonden hoeveelheid zuur werd als azijnzuur berekend, zoals algemeen gebruikelijk is (HUSAINI en COOPER, 1957; SPANYÁR c.s., 1960; RUSZ, 1962; ZIEMBA, 1964; SIMON c.s., 1966).

HUSAINI en COOPER (1957) vonden, dat in rookcondensaten azijnzuur het belangrijkste zuur is, gevolgd door mierzuur. Volgens SPANYÁR en SZEREDY (1962) bestaat 40% van de in rook aanwezige zuren uit azijnzuur en 30% uit mierzuur. SIKORSKI (1962) vindt 66% azijnzuur en 19% mierzuur in de vluchtige zuren van rook. PORTER, BRATZLER en PEARSON (1965) hebben alle termen van de vetzuurreeks tot en met C_{10} in rook aangetoond; in de gasfase van rook waren echter alleen de C_1 t/m C_4 -zuren aantoonbaar.

Geheel afwijkend zijn de resultaten van HAMID en SAFFLE (1965), die veel propionzuur, isovaleriaanzuur en isocapronzuur in rook vinden, het laatste zuur zelfs in grotere hoeveelheden dan azijnzuur.

4.2.5.1. pH

De pH werd gemeten met een Polymetron pH/mV-meter, type 42 B, voorzien van een gekombineerde elektrode.

4.2.6. Bruining

De onder 3.4.2.2 beschreven test met glycine werd gebezigd als een maat voor

de bruinende eigenschappen van de diverse rookwatermonsters ten opzichte van aminogroepen.

4.3. BESCHRIJVING DER ANALYSERESULTATEN EN KONKLUSIES

4.3.1. *Analyse van een aantal op dezelfde wijze verkregen rookwatermonsters*

In de tunnel werd gedurende $2\frac{1}{2}$ uur rook geleid, die afkomstig was van een smeulend houtvuur (vuremot, bedekt met eikezaagsel).

Dit proces werd een aantal malen herhaald, waarbij de roker werd opgedragen zoveel mogelijk onder dezelfde kondities te werken. Het was onze bedoeling, op deze wijze een indruk te verkrijgen van de reproduceerbaarheid van het proces.

Een gedeelte van de rook werd opgevangen zoals onder 4.1 is beschreven, waarna de onder 4.2 besproken analyses werden uitgevoerd. De resultaten der analyses, betrokken op 100 ml rookwater en opgegeven in mg, zijn vermeld in tabel VII. Hieruit blijkt het volgende:

TABEL VII. Resultaten van analyses, uitgevoerd op monsters rookwater uit de tunnel.

No. experiment	1	2	3	4	5	6
Carbonylderivaten	4130	3260	3630	3920	2590	3000
Glycolaldehyde	187	146	146	154	122	146
Glyoxaal	8	5	7	6	5	6
Acetol	144	156	132	158	120	123
Methylglyoxaal	100	68	86	92	67	86
Diacetyl	14	15	13	16	13	12
Formaldehyde (met DNPH)			75	68		
Furfural	5	7	10	9	11	12
Aceton			15	19	16	
p-ongesubst. fenolen, als C_6H_5OH	15	16	14	15	12	11
Zuren, als CH_3COOH	509	448	504	540	390	458
pH	2,72	2,76	2,74	2,68	2,74	2,90
Bruining- E_{400}	0,541	0,401	0,413	0,438	0,347	0,416
- E_{500}	0,170	0,126	0,134	0,142	0,113	0,138
Gewichtsverlies tijdens het rook-proces	27%	23%	23%	25%	21%	30%

1. Glycolaldehyde, acetol en methylglyoxaal zijn de belangrijkste osazonvormende carbonylverbindingen. Hun derivaten vertegenwoordigen 63 tot 75% van de totale hoeveelheid neergeslagen carbonylderivaten. Glyoxaal speelt geen rol van betekenis; diacetyl evenmin.

2. Tussen het vermogen tot bruining en het gehalte aan glycolaldehyde en methylglyoxaal tezamen bestaat een correlatie. Het quotient van de extinctie bij 400 nm en het gehalte aan deze beide verbindingen varieert binnen vrij nauwe grenzen, namelijk tussen 1,78 en 1,88.

In al deze gevallen treedt dezelfde geelbruine kleur op, zoals blijkt uit de vrijwel constante verhouding van E_{400} en E_{500} (variërend tussen 3,02 en 3,18).

3. Bedenkend dat in ons geval de meeste DNPH-derivaten vijf tot zeven maal

zo zwaar zijn als de carbonylverbindingen waaruit ze ontstonden, kan worden gekonkludeerd dat de totale hoeveelheid carbonylverbindingen in dezelfde grootteorde ligt als de totale hoeveelheid zuur; het gehalte aan fenolen ligt daar ver onder, ook indien we rekening houden met het feit dat slechts de p-ongesubstitueerde fenolen worden bepaald, zie 4.2.4.

4. De onderlinge verschillen in de analyseresultaten zijn aanzienlijk. Het was ook nauwelijks te verwachten dat een slecht controleerbaar proces als het roken met een smeulend houtvuur tot reproduceerbare resultaten zou leiden.

Het verschil tussen de hoogste en de laagste waarden die werden gevonden, bedraagt (berekend op de laagste)

voor de zuren	38 %
voor de carbonylderivaten	60 %
en voor de fenolen	33 %

De schommelingen in het gehalte aan zuren en aan carbonylverbindingen houden ongeveer gelijke tred met elkaar; de schommelingen in het fenolgehalte zijn hiervan niet afhankelijk.

5. Bij de gevonden waarden voor de afzonderlijke carbonylverbindingen vallen de nogal uiteenlopende resultaten van de furfuralbepaling op. Deze getallen lijken geen verband te houden met de waarden, die voor de andere carbonylverbindingen werden gevonden.

4.3.2. *Analyse van een aantal rookwatermonsters, uit verschillende rookinrichtingen afkomstig*

De in tabel VIII beschreven analyses zijn hoofdzakelijk uitgevoerd als illustratie van het in dit hoofdstuk uitgewerkte analyseschema. Het zal duidelijk zijn, dat de hoeveelheid geabsorbeerde rook afhankelijk is van de capaciteit van de rookontwikkelaar en van de ruimte waarin wordt gerookt, de rooktunnel of -kast dus. Vergelijkingen tussen gevonden gehalten, verkregen uit proeven met verschillende rookinstallaties, hebben in het algemeen slechts zin als de efficiency van zulke installaties moet worden bestudeerd. Wel kunnen uit zo'n vergelijkend onderzoek konklusies worden getrokken omtrent de verschillen in samenstelling tussen de diverse rookmonsters.

De monsters zijn uit de volgende installaties betrokken:

7 en 8: onze eigen hang. De schalen met water stonden hier ca $1\frac{1}{2}$ meter boven het smeulende vuur (vuremot/eikezaagsel); temperatuur in de kast schommelend om 80°; rooktijd 1 uur.

9: onze rooktunnel, doch met een wrijvingsrookontwikkelaar als rookgenerator. Rookbron: eikehout; rooktijd 2 uur.

10: een rookkast volgens Fessmann met bijbehorende generator, opgesteld in een fabriek waar vleesprodukten worden vervaardigd. Grondstof: beukehout; rooktijd 1 uur.

11: een Atmos-rookkast met een Halfdan Olsen-rookontwikkelaar, opgesteld in het CIVO te Zeist. Eikehout als brandstof; rooktijd $2\frac{1}{2}$ uur.

Ter vergelijking zijn in tabel VIII ook de gemiddelde resultaten van de monsters 1 tot en met 6 opgenomen.

TABEL VIII. Resultaten van analyses, uitgevoerd op monsters rookwater van verschillende herkomst

No. experiment	7	8	9	10	11	1 t/m 6 (gem.)
Carbonylderivaten	3120	3530	1450	1230	5420	3420
Glycolaldehyde	187	205	66	67	296	150
Glyoxaal	10	13	3	4	7	6
Acetol	94	122	20	58	167	139
Methylglyoxaal	62	75	40	30	116	83
Diacetyl	8	13	3	5	18	14
Formaldehyde (met DNPH)		92		21	73	71
Furfural	3	5	18	3	30	9
Aceton		13		5	23	17
p-ongesubst. fenolen, als C_6H_5OH	12	14	3	5	16	14
Zuren, als CH_3COOH	359	415	234	116	1380	475
pH	2,85	2,74	2,92	3,12	2,60	2,7
Bruining- E_{400}	0,442	0,540	0,235	0,163	0,805	0,426
- E_{500}	0,136	0,174	0,060	0,049	0,260	0,137
Gewichtsverlies tijdens rookproces	46%	47%	11%	9%	52%	25%

Het zou niet juist zijn, aan dit geringe aantal analyses veel konklusies te verbinden. Niettemin vallen enkele dingen op:

1. De onderlinge verschillen in de samenstelling der rookmonsters zijn nu aanmerkelijk groter, hetgeen ook te verwachten was. Merkwaaardigerwijze vertoont het monster uit de Fessmann-installatie, waar de rook op totaal andere wijze ontstaat dan in alle overige generatoren (nl. door oververhite stoom over houtspaanders te leiden, zie 1.4.2.2), weinig afwijkingen van de op conventionele wijze verkregen rook.

2. In alle gevallen zijn weer aanzienlijke hoeveelheden glycolaldehyde en methylglyoxaal aanwezig. Het ligt voor de hand, de bruinende eigenschappen van deze oplossingen t.o.v. aminogroepen ook hier weer aan de aanwezigheid van deze beide verbindingen toe te schrijven. Het verband tussen de bruining en de hoeveelheden van deze beide stoffen is echter minder duidelijk dan bij de vorige serie proeven: het quotient van E_{400} en de som der concentraties aan methylglyoxaal en glycolaldehyde varieert nu tussen 1,68 en 2,22.

3. De verhouding $E_{400}:E_{500}$ ligt overal tussen 3,1 en 3,33, monster 9 uitgezonderd. Dat dit monster niet in de rij past, vindt vermoedelijk zijn oorzaak in de relatief grote hoeveelheid methylglyoxaal, zie 3.4.2.3.

In de monsters 9 en 11 valt het hoge gehalte aan zuren en furfural op. De rook is in beide gevallen afkomstig uit eikenhout. Het is bekend dat deze rook rijk is aan beide bestanddelen.

In verband met het hoge furfuralgehalte is het nuttig, er op te wijzen dat harde houtsoorten, zoals eikenhout, een hoog gehalte aan pentosanen (hemicellulose) bezitten. Goos (1952) vermeldt, dat de pyrolyse van pentosanen een grote hoeveelheid furaanderivaten kan opleveren – hetgeen, gezien vanuit de structuur der pentosanen met hun furanosideringen, zeer begrijpelijk is.

Overigens wijst Goos er op dat de furaanring, onder de omstandigheden die optreden bij de destrukatieve destillatie van hout, niet zeer stabiel is, en dat dan ook moet worden verwacht, dat de pentosanen voor een groot deel in nog kleinere brokstukken uiteenvallen.

4.3.3. *Verband tussen de hoeveelheid der opgevangen rookcomponenten en de dikte van de absorberende waterlaag*

In 4.1 is besproken hoe de opvangmethode werd gestandaardiseerd. De vraag rijst, of een verandering van het watervolume in de schalen tot andere resultaten zal leiden.

In een en dezelfde proef zal de hoeveelheid der geabsorbeerde rookcomponenten voor een belangrijk deel afhangen van de grootte van het aan rook blootgestelde wateroppervlak. Indien de oplosbaarheid en de diffusiesnelheid van deze componenten voldoende groot is, speelt de dikte van deze waterlaag geen rol. Het is echter denkbaar dat verzadigingseffekten zullen optreden (in de praktijk, bij het roken van levensmiddelen, gebeurt dit zeker!) en in dit geval zal het volume van de opvangvloeistof ook van invloed zijn op de hoeveelheid geabsorbeerde rookbestanddelen.

In een drietal experimenten werden, naast vijf Petrischalen met elk 20 ml water, ook vijf schalen met 40 ml water in de rooktunnel geplaatst en de resultaten vergeleken. Uiteraard werden ook deze schalen, evenals die van 20 ml, op hun oorspronkelijke gewicht teruggebracht. De gehalten aan de diverse rookbestanddelen zijn bij de 20 ml-schalen berekend als mg per 100 ml en bij de 40 ml-schalen als mg per 200 ml.

De gevonden waarden zijn vervat in tabel IX.

Door vergroting van het volume van 20 tot 40 ml bij gelijkblijvend oppervlak wordt dus van alle door ons bepaalde rookcomponenten wat meer opgevangen. Voor een groot aantal bestanddelen is deze toename ongeveer gelijk. De toename van de hoeveelheid fenolen is duidelijk groter en die van de hoeveelheid furfural bepaald spektakulair. Het is niet geheel duidelijk wat de oorzaak is van deze sterke toename. In elk geval blijkt hieruit, dat de hoeveelheid furfural, die wordt gevonden, sterk zal afhangen van de hoeveelheid water waarin de rook wordt geabsorbeerd, en dat onze furfuralanalyses niet representatief kunnen zijn voor de hoeveelheid die op een gerookt levensmiddel is terechtgekomen. Wel is duidelijk, dat deze hoeveelheid zeer klein moet zijn, althans indien we alleen de absorptie in de waterfase in ogenschouw nemen. Mogelijk wordt furfural wel via de vetfase opgenomen.

Hetzelfde geldt, in iets mindere mate, voor de fenolen. – Deze konklusie heeft natuurlijk konsekwenties voor de techniek van het roken, daar fenolen tot de belangrijkste smaakstoffen van gerookte produkten behoren.

De hoeveelheden van de stoffen glycolaldehyde en formaldehyde blijken het minst toe te nemen bij de volumevergroting.

Tenslotte moet nog worden vermeld, dat bij het rookwater uit de 40 ml-schalen een wijziging in het meten der bruining werd aangebracht; hier werd niet tot 50 doch tot 25 ml aangevuld.

TABEL IX. Analyseresultaten van drie experimenten, waarin de invloed van de dikte der absorberende waterlaag op de hoeveelheid geabsorbeerde rookcomponenten werd nagegaan.

	Experiment I			Experiment II			Experiment III		
	20 ml- schalen	40 ml- schalen	Toename in pro- centen	20 ml- schalen	40 ml- schalen	Toename in pro- centen	20 ml- schalen	40 ml- schalen	Toename in pro- centen
Carbonylderivaten	3920	4350	11	2590	2790	8	3630	4100	13
Glycolaldehyde	154	168	9	122	125	2,5	146	152	4
Glyoxaal	6	7		4	5		7	8	
Acetol	158	183	16	121	133	10	132	149	13
Methylglyoxaal	92	106	15	67	72	7	86	100	16
Diacetyl	16	18		14	12		13	18	
Formaldehyde (met DNPH)	68	72	6	84	86	2,5			
Id. (met chromotroopzuur)	50	52	4	72	73	1,4			
Furfural	9	22	144	11	20	82	10	18	80
Aceton	19	22	16	12	14	17			
p-Ongesubst. fenolen, als C ₆ H ₅ OH	15	19	27	12	14	17	14	18	29
Zuren, als CH ₃ COOH	540	612	13	390	418	7	504	560	11
Bruining - E ₂₀₀	0,438	0,496	13	0,347	0,366	5	0,413	0,445	8
- E ₅₀₀	0,143	0,163	14	0,112	0,113	1	0,134	0,141	5
Gewichtsverlies tijdens rookproces	25%	14%		21%	12%		23%	11,5%	

4.3.4. Veroudering van monsters rookwater

Een hoeveelheid rookwater, uit de tunnel verkregen, werd ongeveer 1 en 2 maanden na de eerste reeks analyses nog eens geanalyseerd, teneinde na te gaan in hoeverre de oplossing stabiel was. Zij werd bij kamertemperatuur bewaard en niet in het donker geplaatst.

Dit experiment werd tweemaal uitgevoerd. Tabel X geeft een overzicht van de analysesresultaten.

TABEL X. Analysesresultaten van twee experimenten waarin de invloed van de bewaartijd op de samenstelling van rookwater werd nagegaan.

	Experiment I			Experiment II		
	Direkt na mon- stername	Na 1 maand	Na 2 maan- den	Direkt na mon- stername	Na 1 maand	Na 2 maan- den
Carbonylderivaten	3630	3360	3260	3000	3160	2930
Glycolaldehyde	146	148	145	146	150	146
Glyoxaal	7	6	5	6	6	6
Acetol	132	138	134	133	130	128
Methylglyoxaal	86	73	70	86	72	68
Diacetyl	12	12	13	12	11	12
Furfural	10	9	10	12	11	11
p-Ongesubst. fenolen, als						
C ₆ H ₅ OH	14	14	13	12	11	11
Zuren, als CH ₃ COOH	504	544	562	458	502	524
Bruining-E ₄₀₀	0,412	0,441	0,434	0,416	0,418	0,426
-E ₅₀₀	0,135	0,144	0,144	0,138	0,135	0,145
pH	2,74	2,84	2,82	2,90	2,81	2,68
Het onderzoek naar het gedrag van formaldehyde en aceton werd met twee andere rookwatermonsters uitgevoerd:						
Formaldehyde (met DNPH)	68	64	68	84		82
Id. (met chromotroopzuur)	51	52	51	72	73	71
Aceton	19	19	18	12	12	11

Behalve bij methylglyoxaal is nergens een duidelijke afname vast te stellen. De hoeveelheid titreerbaar zuur blijkt op te lopen; het is niet duidelijk waarom dit gebeurt. Ontleding van esters zal zeker geen rol spelen; acetolacetaat bijvoorbeeld blijkt niet merkbaar te hydrolyseren gedurende deze tijd en onder deze omstandigheden.

Verder is nog gebleken dat een 0,5%-ige oplossing van methylglyoxaal, bij een pH van ongeveer 3, gedurende twee maanden bij kamertemperatuur stabiel blijft. De hoeveelheid titreerbaar zuur neemt in deze oplossing niet toe. - De oorzaak van het langzaam verdwijnen van methylglyoxaal is dus evenmin duidelijk.

Duidelijke afnamen van de hoeveelheden diacetyl, formaldehyde, furfural en fenolen werden echter wel gekonstateerd in een monster rookwater uit de hang, dat 3 weken bij 24° in het donker werd bewaard; zie 5.1.3.

4.3.5. *Vergelijking van onze resultaten met die van anderen*

Uit de in 4.3.1 en 4.3.2 beschreven resultaten vinden we, dat de hoeveelheid zuren zich tot de hoeveelheid bepaalde fenolen verhoudt als ongeveer 30:1, enkele uitzonderingen daargelaten.

Uit het gewicht van de neergeslagen DNPH-derivaten valt af te leiden, dat de totale hoeveelheid carbonylverbindingen in het algemeen iets hoger is dan de totale hoeveelheid zuren (geschatte verhouding ongeveer $1\frac{1}{2}$:1).

Onze opvangmethode komt het meest overeen met de waterworst-methode, die onder meer door SIMON, RYPINSKI en TAUBER (1966) werd toegepast. Men vult cellulosedarmen met een zekere hoeveelheid water en stelt ze vervolgens bloot aan de inwerking van rook. Simon c.s., die ahornzaagsel als rookbron gebruikten, vonden de verhouding zuren:fenolen in het algemeen wat hoger, namelijk 50 tot 70:1. De fenolen werden hier bepaald volgens de methode van Gibbs. – De hoeveelheid carbonylderivaten, die werd gevonden (gravimetrisch met 2,4-dinitrofenylhydrazine) was steeds lager dan de hoeveelheid titreerbaar zuur. Vermoedelijk geschiedde de precipitatie der carbonylverbindingen in de koude of bij kamertemperatuur en zijn de hydroxycarbonylverbindingen niet of zeer onvolledig neergeslagen.

SPANYÁR, KEVEI en KISZEL (1960b) vinden wel een $1\frac{1}{2}$:1-verhouding voor de carbonylverbindingen ten opzichte van de zuren, maar komen op veel hogere fenolgehaltes (ongeveer de helft van het gehalte aan zuren). Zij bepaalden dit gehalte met de sulfanilzuurmethode.

RUSZ (1962), die evenals de vorige auteurs met verschillende houtsoorten en bij verschillende pyrolysetemperaturen werkte, vond in het algemeen ongeveer drie maal zoveel carbonylverbindingen als zuren, en vijftien- tot twintigmaal zoveel zuren als fenolen. De carbonylverbindingen werden bepaald door spectrofotometrische analyse van hun DNPH-derivaten; de bepaling der fenolen geschiedde met 4-aminoantipyrine.

Rusz vindt verder zeer grote hoeveelheden formaldehyde en acetaldehyde in zijn monsters; samen vormen deze verbindingen 25 tot 30% van de totale hoeveelheid der carbonylverbindingen. Ook diacetyl zou hier voor 5 tot 8% aan bijdragen.

HUSAINI en COOPER (1957), die rookcondensaten onderzochten, vinden twintig maal zo veel zuren als fenolen; de verhouding zuren:carbonylverbindingen varieert van 2:1 (normale rook) tot 1:1 (wrijvingsrook).

PORTER, BRATZLER en PEARSON (1965), die ook met rookcondensaten werkten, vinden daarentegen weer bijzonder veel carbonylverbindingen (ongeveer vijf maal zoveel als de hoeveelheid zuur).

Het is duidelijk, dat de zeer verschillende omstandigheden in genoemde onderzoeken, die zowel het roken, de opvangmethode en de analyses betreffen, onderlinge vergelijkingen sterk bemoeilijken.

4.4. SLOTOPMERKINGEN

De hier beschreven systematische analyse van rookbestanddelen laat zien, dat de groep der α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen kwantitatief zeer belangrijk is in de samenstelling van rookwater. Mede gezien de in 4.3.3 verkregen resultaten achten wij het geoorloofd, aan te nemen dat zij ook bij het roken van vis – en andere levensmiddelen – een belangrijke rol spelen.

Voor het verkrijgen van een indruk van de efficiency van een rookinstallatie, of ter ondersteuning van technologische experimenten, is dit analyseschema wellicht een bruikbaar hulpmiddel; het zal echter in lang niet alle gevallen nodig zijn om alle bepalingen uit te voeren.

De analyses van hydroxy- en dicarbonylverbindingen, van furfural en van formaldehyde in rookwater zouden ons inlichtingen kunnen verschaffen omtrent de vraag, bij welke omstandigheden de pyrolyse van hout zodanig verloopt dat de vorming van bruinende componenten maximaal is. Ook ten aanzien van de pyrolyse zelf zouden wellicht nieuwe informatieën kunnen worden verkregen.

Het oplossen van deze vragen valt evenwel buiten het kader van dit onderzoek; we willen er hier slechts op attenderen dat de analyse van deze verbindingen meer mogelijkheden biedt dan hier kon worden beschreven.

5. NADER ONDERZOEK OMTRENT DE KLEURVORMING

Hoewel in de hoofdstukken 3 en 4 is aangetoond, dat de aanwezigheid van relatief grote hoeveelheden glycolaldehyde en methylglyoxaal in rookwater een plausibele verklaring geeft van de bruinende eigenschappen van houtrook ten opzichte van aminogroepen, is het bewijs hiervoor tot nu toe nog niet gegeven.

In dit hoofdstuk wordt nu eerst nagegaan welke carbonylverbindingen zich, onder vorming van een bruine kleur, met aminogroepen verbinden. Daarna wordt een experiment beschreven waarin de veranderingen in rookwater, na toevoeging van een aminoverbinding, worden nagegaan. Vervolgens wordt de bruining van een monster rookwater ten opzichte van glycine vergeleken met de bruining van oplossingen die gelijke hoeveelheden aan actieve carbonylverbindingen bevatten. Tenslotte komt nog een meer fundamenteel onderzoek naar de optredende reaktiemechanismen aan de orde.

5.1. GEDRAG VAN VERSCHILLENDE CARBONYLVERBINDINGEN TEN OPZICHTE VAN AMINOGROEPEN

5.1.1. *Gedrag van een aantal carbonylverbindingen ten opzichte van de vrije aminogroepen in viseiwitconcentraat*

Van een verbinding als formaldehyde is algemeen bekend, dat zij irreversibel kan worden gebonden aan met name de vrije aminogroepen van eiwitten, waarbij de eigenschappen van deze eiwitten aanzienlijk veranderen. Men spreekt, als het om huideiwitten gaat, dikwijls van 'looien'.

GUSTAVSSON (1940) vermeldt dat, naast formaldehyde, acroleïne en crotonaldehyde deze eigenschap eveneens bezitten en acetaldehyde, zij het in veel geringere mate, ook. In een recente publikatie over de behandeling van caseïne met acetaldehyde (SCHORMÜLLER c.s., 1968) wordt echter een duidelijke werking van deze stof vermeld: er ontstaat een produkt met een hoger moleculuurgewicht en een lager gehalte aan beschikbaar lysine, terwijl bij de inwerking van enzymen op dit produkt hogere Michaeliskonstanten worden waargenomen.

Glyoxaal is een matige en methylglyoxaal een sterke looistof (GUSTAVSSON, 1947). Beide stoffen vinden als zodanig toepassing (RÖMPP, 1966).

De looiende eigenschappen van een carbonylverbinding zullen in hoge mate afhangen van de affiniteit van deze verbinding tot de vrije aminogroep. Nu zal in principe elke carbonylverbinding de neiging hebben om een min of meer losse binding met aminogroepen aan te gaan. De mate waarin deze reactie irreversibel is zal echter afhangen van de al of niet optredende volgrekties, die op hun beurt weer afhangen van de aard der carbonylverbinding.

Ter oriëntering werd het volgende experiment uitgevoerd:

Aan hoeveelheden van 500 mg viseiwitconcentraat werden 5 ml van 1 %-ige oplossingen van een aantal verschillende carbonylverbindingen toegevoegd. Deze mengsels, die alle een pH van omstreeks 5 bezaten, werden gedurende een uur bij kamertemperatuur weggezet, of een uur aan de terugvloeiakoeler gekookt.

TABEL XI. Effect van een aantal 1%-ige oplossingen van carbonylverbindingen op de vrije aminogroepen van viseiwitconcentraat

Carbonylverbinding	Reaktietemperatuur	Afname vrije aminogroepen
Formaldehyde	kamertemperatuur	niet waarneembaar
Formaldehyde	100°	50%
Acetaldehyde	100°	niet waarneembaar
n-Propanal	100°	niet waarneembaar
n-Butanal	100°	niet waarneembaar
Crotonaldehyde	100°	25%
Methylvinylketon	100°	10%
Glycolaldehyde	kamertemperatuur	niet waarneembaar
Glycolaldehyde	100°	75%
Acetol	100°	niet waarneembaar
Glyoxaal	100°	80%
Methylglyoxaal	100°	50%
Diacetyl	100°	niet waarneembaar
Furfural	100°	niet waarneembaar

Hierna werd het eiwit afgefiltreerd, uitgewasser met weinig water en vervolgens onderworpen aan een bepaling van het gehalte aan vrije aminogroepen met 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeen volgens CARPENTER (1960).

De resultaten zijn vervat in tabel XI. De bepalingen werden alle in duplo uitgevoerd. De resultaten zijn afgerond op vijfvoudigen van procenten.

Glycolaldehyde, glyoxaal, methylglyoxaal en formaldehyde bezitten de eigenschap om aminogroepen te blokkeren in hoge mate, althans bij 100°. (De reaktiesnelheid is waarschijnlijk sterk afhankelijk van de temperatuur: voor de – naar straks zal blijken – verwante bruiningsreactie tussen glucose en eiwitten vinden LEA en HANNAN (1949) een hoge Q_{10} -waarde).

De onverzadigde carbonylverbindingen crotonaldehyde en methylvinylketon blokkeren in mindere mate; de rest in 't geheel niet, althans onder deze condities.

Het viseiwitconcentraat was na de behandeling met glyoxaal, methylglyoxaal en glycolaldehyde bij 100° donkerbruin verkleurd. Het met crotonaldehyde behandelde eiwit was lichtbruin. In alle andere gevallen werd geen kleurvorming waargenomen.

5.1.2. Gedrag van een aantal carbonylverbindingen ten opzichte van glycine

Bij dit experiment werd uitsluitend gelet op de mate waarin een aantal verbindingen een bruine kleur met glycine ontwikkelt. De uitvoering van deze test is gelijk aan die welke onder 3.4.2.3 is beschreven.

Slechts enkele verbindingen, waarvan bekend is dat zij – in meerdere of mindere mate – verbruinen met glycine, zijn in tabel XII vermeld, waarbij, ter vergelijking, ook de reeds onder 3.4.2.3 beschreven resultaten zijn opgenomen.

Uit deze waarnemingen blijkt dat glyoxaal, methylglyoxaal en glycolaldehyde relatief sterke 'bruinners' zijn. Slechts 5-ketofructose bruint onder deze omstan-

TABEL XII. Bruining van een aantal carbonylverbindingen met glycine

Oplossing	E ₄₀₀	E ₅₀₀	E ₄₀₀ /E ₅₀₀
0,2 % glyoxaal	0,197	0,046	4,28
0,2 % methylglyoxaal	0,184	0,040	4,60
0,5 % methylglyoxaal	0,600	0,155	3,87
0,5 % diacetyl	0,057	0,015	3,80
1,0 % diacetyl	0,084	0,021	4,00
0,2 % glycolaldehyde	0,260	0,074	3,51
0,5 % glycolaldehyde	0,700	0,227	3,08
0,5 % acetol	0,010	0,002	—
1,0 % acetol	0,019	0,008	—
0,2 % dihydroxyaceton	0,138	0,032	4,31
0,5 % dihydroxyaceton	0,337	0,075	4,49
1,0 % dihydroxyaceton	0,600	0,128	4,69
0,2 % ribose	0,048	0,015	3,20
0,5 % ribose	0,118	0,035	3,37
1,0 % ribose	0,258	0,078	3,31
0,5 % glucose	0,006	0,002	—
1,0 % glucose	0,011	0,003	—
2,0 % glucose	0,018	0,006	—
0,1 % 5-ketofructose	0,151	0,078	1,94
0,2 % 5-ketofructose	0,288	0,162	1,78
0,5 % acetaldehyde	0,168	0,040	4,20
1,0 % acetaldehyde	0,380	0,091	4,18
0,5 % crotonaldehyde	0,242	0,058	4,17
1,0 % crotonaldehyde	0,533	0,113	4,72

digheden nog heviger met glycine; het betreft hier evenwel een geheel ander soort bruining, waarop we in 5.4.1 nog terugkomen.

Diacetyl blijkt een zeer matige bruiner, dit in tegenstelling tot hetgeen hierover in de literatuur wordt beweerd (ENDERS, 1938, 1942; GUSS, 1952; CARSON, 1953).

De bruining met acetol is vrijwel nihil. Ook van deze stof is beweerd dat zij sterk verbruist met aminoverbindingen, en in dit opzicht zelfs vergelijkbaar is met methylglyoxaal (SATTILER en ZERBAN, 1949). HURD (1952) vermeldt dat glycolaldehyde, acetol en zelfs acetoïne zeer donkerbruine oplossingen met glycine geven. Bij al deze gegevens moet echter worden vermeld dat het bij beweringen blijft en nadere toelichtingen of bewijzen vrijwel ontbreken.

Wel goed beschreven is de bruining van onverzadigde aldehyden, zoals crotonaldehyde, met glycine (BURTON c.s., 1962b, 1963). Ook de bruinende eigenschappen van acetaldehyde ten opzichte van aminoverbindingen zijn bekend en goed onderzocht (ENDERS, 1943; MOHAMMAD, OLCOTT en FRAENKEL-CONRAT, 1949; CARSON en OLCOTT, 1954). De bruining vindt hier naar alle waarschijnlijkheid plaats via een aldolcondensatie, een reactie die door aminozuren wordt gekatalyseerd (FISCHER en MARSCHALL, 1931). – Na de bruiningstest met acetaldehyde bleek de inhoud van de buis zwak naar crotonaldehyde te ruiken.

5.1.3. Veranderingen in rookwater na toevoeging van een aminoverbinding

Met welke snelheid verdwijnen de actieve carbonylverbindingen, in rook-

water aanwezig, als hieraan een amine wordt toegevoegd? Met behulp van het in hoofdstuk 4 beschreven analyseschema kan hierover op vrij eenvoudige wijze informatie worden verkregen. In dit verband is het tevens nuttig, na te gaan of ook de gehalten aan andere verbindingen afnemen bij aanwezigheid van vrije aminogroepen.

Als aminoverbinding werd weer glycine gekozen. Door op gezette tijden analyses op het mengsel te verrichten, verkrijgen we gegevens over de afname van verschillende rookcomponenten als gevolg van de reactie met glycine, met dien verstande echter dat het participeren van deze componenten in reversibele reacties in vele gevallen niet zal worden opgemerkt. Dit is wel het geval als de aminoverbinding voor de aanvang der analyse uit het reaktiemengsel wordt verwijderd. Op zeer eenvoudige wijze kan dit worden gerealiseerd door met een onoplosbaar amine te werken. Viseiwitconcentraat, dat als zodanig kan worden opgevat, zou hiervoor zeer geschikt zijn, ware het niet dat, door toevoeging van viseiwitconcentraat aan rookwater, ook andere functionele groepen worden geïntroduceerd die het beeld kunnen verstoren. Beter geschikt is daarom het – voor chromatografische doeleinden in gebruik zijnde – aminoethylcellulose (Whatman AE 11), dat per gram ongeveer 1 mgeq Kjeldahl-N bleek te bezitten.

Voor ons experiment gebruikten we rookwater dat uit de hang werd verkregen. Direct na de bereiding werd hierop een volledige analyse uitgevoerd. Vervolgens werd aan een portie van 40 ml 200 mg (2,67 mgeq N) glycine toegevoegd, en aan een tweede portie van 40 ml 2,67 g aminoethylcellulose (AEC). De rest van het rookwater diende als controle.

De drie mengsels werden bij $24^{\circ} \pm 1^{\circ}$ bewaard en na 1 en 3 weken geanalyseerd. Dit leverde de resultaten op die in tabel XIII zijn samengevat. De gevonden gehalten zijn uitgedrukt in mg per 100 ml.

In het van AEC voorziene rookwater blijken de hoeveelheden van alle rookbestanddelen af te nemen. Dit is in veel mindere mate het geval in het rookwater waaraan glycine is toegevoegd.

De niet behandelde rookoplossing geeft uiteraard de laagste afnamen te zien. In afwijking van de onder 4.3.4 beschreven experimenten wordt nu ook een duidelijke afname geconstateerd van het gehalte aan fenolen, aan furfural, diacetyl en formaldehyde. Misschien speelt de bewaartemperatuur hierbij een rol: deze bedraagt hier 24° tegen ongeveer 18° in de vorige experimenten. Mogelijk echter is rookwater uit de hang minder stabiel dan rookwater uit de tunnel. We volstaan met een konstatering van dit verschil.

Het effect van de aanwezigheid van aminogroepen blijkt het duidelijkst bij glycolaldehyde, methylglyoxaal, diacetyl en formaldehyde. Glyoxaal schijnt onder deze omstandigheden vrijwel geen irreversibele reacties aan te gaan (waarschijnlijk omdat het als een redelijk stabiel trimeerhydraat aanwezig is).

Fysische adsorptie zal vermoedelijk wel een rol spelen bij de afname van alle rookcomponenten na behandeling met AEC, doch de sterke afname van met name formaldehyde en methylglyoxaal in het met AEC behandelde rookwater is zeker niet alleen door adsorptieverschijnselen te verklaren en berust naar alle waarschijnlijkheid inderdaad op het feit dat los gebonden moleculen voor de

TABEL XIII. Resultaten van analyses op rookwater, dat bij 24° met glycine resp. aminoethyl-cellulose (AEC) is behandeld.

Component of groep	Tijdstip van analyse	Blanco	Glycine	AEC
Carbonylderivaten (met 2,4-DNPH)	Begin (0)	3535	3535	3535
	Na 1 week (1)	3730	3120	1345
	Na 3 weken (3)	3345	2565	1030
Fenolen	0	14,5	14,5	14,5
	1	11,5	11,6	9,3
	3	10,6	10,5	7,5
Furfural	0	5,2	5,2	5,2
	1	4,7	4,7	2,5
	3	3,9	3,8	1,5
Glycolaldehyde	0	205	205	205
	1	196	184	51
	3	201	156	28
Glyoxaal	0	13	13	13
	1	12	12	5
	3	13	11	5
Acetol	0	122	122	122
	1	122	113	104
	3	125	108	100
Methylglyoxaal	0	75	75	75
	1	68	54	3
	3	61	44	1
Diacetyl	0	13	13	13
	1	11	6	spoor
	3	9	3	—
Formaldehyde (met chromotroopzuur bepaald)	0	52	52	52
	1	48	27	1
	3	41	11	0
Aceton	0	13	13	13
	1	11	9	7
	3	12	11	8

aanvang der analyse uit de oplossing worden verwijderd.

5.1.4. Bruining van mengsels van actieve carbonylverbindingen met glycine

Met het voorgaande is de belangrijke rol van glycolaldehyde en methylglyoxaal in de totstandkoming van de bruine kleur nog eens duidelijk onderstreept. Mag nu echter worden gezegd dat de kleurvorming inderdaad berust op de aanwezigheid van deze twee stoffen in rookwater? Pas als het gelukt, deze stoffen selectief te verwijderen, kan het definitieve antwoord hierop worden gegeven. Een dergelijke ingreep lijkt echter uiterst moeilijk realiseerbaar (zo zij al mogelijk is).

Een veel eenvoudiger benadering van het probleem is de bestudering van mengsels die hetzelfde gehalte aan actieve carbonylverbindingen bezitten als bepaalde monsters rookwater. Door de bruining van het rookwatermonster te vergelijken met die van het door ons samengestelde mengsel, kan eveneens informatie omtrent deze vraag worden verkregen.

In de tunnel werd nu een hoeveelheid rookwater bereid. Uit enkele op dit rookwater verrichte analyses verkregen wij de volgende resultaten (weer uitgedrukt in mg per 100 ml rookwater):

Carbonylderivaten	3210
glycolaldehyde	129
glyoxaal	13
acetol	156
methylglyoxaal	72
formaldehyde (met DNPH)	111
Zuren, als CH_3COOH	456
pH	2,80

Daarna werden vier oplossingen bereid met de volgende samenstellingen:

- A. 0,129 % glycolaldehyde, 0,013 % glyoxaal, 0,072 % methylglyoxaal en 0,111 % formaldehyde;
- B. idem, doch zonder formaldehyde;
- C. 0,129 % glycolaldehyde;
- D. 0,072 % methylglyoxaal.

Daar de bruining van rookoplossingen met aminoverbindingen enigszins afhangt van de pH (ZIEMBA, 1964, 1967a), werden deze vier oplossingen alle met azijnzuur op pH = 2,80 gebracht. Vervolgens werd van elk dezer oplossingen, alsmede van het rookwater, een bruiningstest in duplo uitgevoerd.

Door de toevoeging van glycine stijgt de pH tot omstreeks 4. We hebben aangenomen dat individuele verschillen in de oplossingen, na de toevoeging van glycine ontstaan, te klein zijn om duidelijke afwijkingen in de extinctie te veroorzaken.

Gevonden als gemiddelde waarden:

	E_{400}	E_{500}	E_{400}/E_{500}
Rookwater	0,366	0,119	3,08
A	0,308	0,106	2,91
B	0,335	0,097	3,45
C	0,172	0,048	3,58
D	0,060	0,015	4,0

De bruining van rookwater met glycine blijkt door mengsel A dicht te worden benaderd. De E_{400} wordt voor 84 % bereikt, de E_{500} voor 89 %.

Door het weglaten van formaldehyde wordt de E_{400} in positieve, de E_{500} echter in negatieve zin beïnvloed. Dit doet het vermoeden ontstaan dat formaldehyde, hoewel op zichzelf geen bruinende stof, in de zich vormende gekleurde complexen kan worden ingebouwd.

De som van de bruining van C en D is minder dan de bruining van B. De geringe hoeveelheid glyoxaal in B buiten beschouwing latend, kan worden gekonkludeerd dat hier een synergistisch effect optreedt. Daar echter ook bij concen-

tratieverhoging van elk dezer componenten de bruining meer dan evenredig toeneemt, zie 3.4.2.3, biedt deze waarneming op zichzelf geen nieuwe perspectieven.

Ter nadere illustratie werden ook nog andere, reeds eerder bereide, rookwater-monsters vergeleken met zelf samengestelde mengsels:

II. Rookwater uit de hang met 0,205 % glycolaldehyde, 0,013 % glyoxaal, 0,075 % methylglyoxaal en 0,091 % formaldehyde. De pH was 2,74. De door ons bereide mengsels bevatten weer dezelfde hoeveelheden van deze stoffen, en hadden dezelfde pH.

	E_{400}	E_{500}	E_{400}/E_{500}
Rookwater	0,540	0,175	3,09
Mengsel	0,479	0,160	2,99
Mengsel, zonder formaldehyde	0,441	0,134	3,29

III. Rookwater uit de tunnel met 0,110 % glycolaldehyde, 0,006 % glyoxaal, 0,071 % methylglyoxaal, 0,063 % formaldehyde en een pH van 2,80.

	E_{400}	E_{500}	E_{400}/E_{500}
Rookwater	0,297	0,096	3,09
Mengsel	0,265	0,088	3,01
Mengsel, zonder formaldehyde	0,274	0,077	3,56

De verkregen bruiningen in de mengsels met formaldehyde bedragen dus, uitgedrukt in procenten van de bruining van het betreffende rookwater:

	E_{400}	E_{500}
(I)	84	89
II	89	91
III	91	92

Duidelijk volgt hieruit, dat de bruining van rookwater met een grote overmaat glycine voor het overgrote deel kan worden verklaard door de aanwezigheid van genoemde vier stoffen. Glycolaldehyde en methylglyoxaal spelen hierbij de hoofdrol.

Het nog overblijvende verschil vindt zijn verklaring mogelijkerwijze in de aanwezigheid van sporen van meer ingewikkelde verbindingen, die we bij de kolomchromatografie van uit rookwater bereide DNP-osazonen steeds waarnamen als smalle blauwgrijze tot bruine bandjes bovenin de kolom. Ook de aanwezigheid van kleine hoeveelheden onverzadigde aldehyden (crotonaldehyde bijvoorbeeld wordt door zeer vele onderzoekers in rookoplossingen of -condensaten gevonden) zal wel een geringe bijdrage opleveren.

In hoofdstuk 3 werd opgemerkt dat de grote overmaat glycine, die we in deze bruiningstest toevoegen, een enigszins scheef beeld zou kunnen geven van de bruining als zodanig. Indien voor sommige rookcomponenten de keus openstaat tussen een reactie met een vrije aminogroep of met een reeds gevormd complex, is het duidelijk dat deze keus, en daarmee het type bruining, sterk zal af-

hangen van het aanbod van vrije aminogroepen. Teneinde na te gaan of ons synthetische mengsel, voor wat betreft het vermogen tot bruining, ook vergelijkbaar is met rookwater als het aanbod van aminogroepen veel lager is, werd het volgende experiment uitgevoerd:

10 ml rookwater, of 10 ml van een door ons zelf samengesteld mengsel, werd voorzien van 1mgmol (75 mg) glycine, op pH = 5,0 gebracht en aangevuld tot 25 ml. (Deze proefopzet is ontleend aan het onder 5.2 beschreven experiment, waarin verschillende aminoverbindingen zijn getest).

Tweemaal 5 ml werden nu in reageerbuizen gepipetteerd. Deze buizen werden met een rubber stop afgesloten en gedurende twee uur in een kokend waterbad geplaatst. Vervolgens werd verdund tot 50 ml, waarna de extincties bij 400 en 500 nm konden worden gemeten.

De 'kunstmatige' oplossingen bevatten glyoxaal (G), methylglyoxaal (MeG), glycolaldehyde (GA), formaldehyde (F), of mengsels van deze stoffen; de concentraties waren weer gelijk aan de concentraties in het eerstbeschreven rookwater: 0,013 % G, 0,072 % MeG, 0,129 % GA en 0,111 % F. De resultaten zijn in tabel XIV vermeld.

TABEL XIV. Bruining van enkele mengsels van in rook aanwezige carbonylverbindingen met een relatief geringe overmaat glycine

Mengsel	E ₄₀₀	E ₅₀₀	E ₄₀₀ /E ₅₀₀
Rookwater	0,488	0,162	3,01
id. zonder glycine (blanco)	0,070	0,015	4,7
G + MeG + GA + F	0,433	0,107	4,05
id. zonder glycine	0,082	0,007	12
G + MeG + GA	0,346	0,104	3,33
id. zonder glycine	0,145	0,022	7
MeG + GA	0,297	0,089	3,34
MeG	0,046	0,008	6
MeG + F	0,083	0,018	4,6
GA	0,198	0,054	3,67
GA + F	0,328	0,082	4,00
F	0,000	0,000	—

Het door ons samengestelde mengsel van actieve rookcomponenten vertoont in deze test een wat grotere afwijking ten opzichte van rookwater. Wel wordt de E₄₀₀ voor 89 % bereikt, doch de E₅₀₀ slechts voor 66 %. Opvallend is de rol van formaldehyde. De aanwezigheid van deze stof versterkt de bruining in aanzienlijke mate.

Hoewel het, op grond van deze summiere waarnemingen, niet mogelijk is om van een en ander een scherp beeld te verkrijgen, willen we toch, althans ten aanzien van de rol van formaldehyde, een suggestie doen.

De remmende werking van formaldehyde op de Maillardreactie, die onder meer door NOMURA (1955) is beschreven, berust mogelijk hierop, dat zowel reducerende suikers als formaldehyde irreversibele reacties met vrije aminogroepen kunnen aangaan. Indien de hoeveelheid vrije aminogroepen niet al te groot is, zullen formaldehyde en reducerende suikers elkaar hierin beconcurreren.

Daar deze irreversibele reacties bij formaldehyde sneller verlopen, is deze stof duidelijk in het voordeel en derhalve zal reeds van een niet al te grote hoeveelheid formaldehyde het remmend effect op de Maillardreactie merkbaar zijn.

Ten opzichte van zeer actieve verbindingen als glycolaldehyde en methylglyoxaal is de neiging van formaldehyde tot irreversibele reacties met de aminogroep minder spektakulair en derhalve het concurrerend effect minder uitgesproken.

De bovenbeschreven waarnemingen echter doen nog een andere, positieve rol van formaldehyde in bruiningsreacties vermoeden. We wezen reeds op de mogelijkheid van inbouw in reeds gevormde complexen. Van de aard der reactiepartners, en van de hoeveelheden waarin zij aanwezig zijn, zal het afhangen of het effect van formaldehyde op de bruining positief of negatief is.

In overeenstemming hiermee is de opmerking van ELLIS (1959), dat sporen formaldehyde de kleurvorming in lactose/aminozuurmengsels in positieve zin beïnvloeden, doch dat grotere hoeveelheden deze kleurvorming vertragen. Uit de proeven met mengsels zonder glycine blijkt evenwel, dat formaldehyde de hier optredende verkleuring vertraagt. Dit is in overeenstemming met waarnemingen van HAAS c.s. (1948). Mogelijk gaat het hier om een geheel ander reactiemechanisme.

Ten aanzien van de bruining van rookwater (of rook) met een relatief geringe hoeveelheid aminogroepen vermoeden we, dat een aantal stoffen, die op zich weinig reaktiviteit ten opzichte van deze aminogroepen vertonen, wel gemakkelijk in de ontstane complexen kunnen worden ingebouwd, en dan toch tot de kleurvorming bijdragen. We denken hier weer in het bijzonder aan de wat ingewikkelder verbindingen in rook, die al eerder werden genoemd en hier misschien een grotere rol spelen.

Bij deze suggestie moeten we het – in dit bestek – laten.

5.2. GEDRAG VAN VERSCHILLENDE AMINOVERBINDINGEN TEN OPZICHTE VAN ROOKWATER

Reeds door MAILLARD (1912, 1916) is er de aandacht op gevestigd, dat er verschillen tussen aminozuren bestaan voor wat betreft hun mogelijkheden tot verbruiningen met reducerende suikers. Ook nadien is dit door verscheidene onderzoekers vastgesteld. Zo onderzochten LENTO, UNDERWOOD en WILLIIS een aantal α -aminozuren, enkele ω -aminozuren en ook een aantal aminozuren met zowel een α - als een eindstandige aminogroep. Er bleken aanzienlijke verschillen te bestaan in het vermogen, met glucose een bruine kleur te ontwikkelen.

ZIEMBA (1967a) bestudeerde het gedrag van een aantal aminozuren en andere verbindingen ten opzichte van in water geabsorbeerde rook. Ook hij konstateerde grote verschillen in het bruinend vermogen van diverse aminoverbindingen.

Lento c.s. verhitten hun mengsels, die tevoren op pH = 8,0 waren gebracht, gedurende 20 minuten op 114° in een gesloten ampul. De kleur werd bij 500 nm gemeten.

Ziemba werkte ook met dichtgesmolten ampullen, doch vermeldt geen reactietemperatuur of -tijd en ook geen pH. Uit het feit dat deze laatste auteur een

sterkere bruining vindt voor lysine en arginine dan voor de hydrochloriden van deze aminozuren, moet worden gekonkludeerd dat hij de pH niet heeft ingesteld. (De bruining neemt toe bij toenemende pH). We hebben daarom een aantal van zijn experimenten herhaald bij een tevoren ingestelde pH, waarvoor we -vrij willekeurig- de waarde 5,0 kozen. Tevens werd de reeks enigszins uitgebreid.

De opzet van deze proef, waarvoor het onder 5.1.4 beschreven rookwater werd gebruikt, was als volgt: Aan 1 mgeq van de aminoverbinding werd 10 ml rookwater toegevoegd, waarna de pH op 5,0 werd ingesteld (met natronloog; in enkele gevallen met azijnzuur). Vervolgens werd de oplossing aangevuld tot 25 ml. 5 ml van deze oplossing werd nu gedurende twee uur in een kokend waterbad verhit, waarna werd uitverdund – doorgaans tot 50 ml – en de extincties bij 400 en 500 nm werden gemeten.

De gemeten waarden, die alle werden herleid tot verdunningen van 50 ml, zijn samengevat in tabel XV. De onderlinge verschillen blijken, evenals dat in de experimenten van Ziemba het geval was, aanzienlijk.

Uit de geringe reactie van di- en trimethylamine en van diethanolamine blijkt het belang van de aanwezigheid van een *primair* amine voor het totstandkomen der bruining. De bruiningspotentiaal van het ammoniumion is echter ook niet groot. Vermoedelijk zijn in dit geval meer reaktiemogelijkheden aanwezig, die niet alle tot verbruining leiden.

TABEL XV. Bruining van een aantal aminoverbindingen met rookwater bij pH = 5,0

Aminoverbinding	E ₄₀₀		E ₅₀₀		E ₄₀₀ /E ₅₀₀
	gemeten	t.o.v. glycine	gemeten	t.o.v. glycine	
Blanco	0,070	14 %	0,015	9 %	4,7
Glycine	0,488	100 %	0,162	100 %	3,0
α-Alanine	0,350	72 %	0,133	82 %	2,6
β-Alanine	0,514	106 %	0,160	99 %	3,2
Arginine (1 mgmol)	0,293	60 %	0,074	46 %	3,9
Cysteïne	0,101	21 %	0,016	10 %	–
Lysine (½ mgmol)	0,499	102 %	0,130	80 %	3,8
Methylamine	0,366	75 %	0,091	56 %	4,0
Dimethylamine	0,086	18 %	0,016	10 %	–
Trimethylamine	0,073	15 %	0,016	10 %	–
Hydrazine (½ mgmol)	0,108	22 %	0,012	7 %	–
1,2-Diaminoethaan (½ mgmol)	1,62	331 %	0,361	223 %	4,5
1,4-Diaminobutaan (½ mgmol)	0,576	118 %	0,144	89 %	4,0
Ethanolamine	0,521	107 %	0,143	88 %	3,6
Diethanolamine (NH ₄) ₂ SO ₄ (½ mgmol)	0,130	27 %	0,028	17 %	4,7
Acetamide	0,144	29 %	0,034	21 %	4,3
Hydroxylamine	0,064	13 %	0,012	7 %	–
	0,028	6 %	0,008	5 %	–

Acetamide vertoont de bruinsingsreactie niet. De amidogroep is dus in dit opzicht onwerkzaam. Dat met ureum een geringe reactie optreedt, vindt zijn verklaring in het feit dat deze verbinding nog duidelijke amine-eigenschappen bezit, zoals ook blijkt uit het kunnen ontwikkelen van stikstofgas met salpeterig-zuur.

Met hydrazine komt zeer weinig kleur tot stand, terwijl hydroxylamine de kleurvorming volkomen verhindert. Beide stoffen remmen ook de Maillard-reactie (BARNES en KAUFMAN, 1947). Het remmend effect van hydroxylamine is zelfs zo sterk, dat de kleurvorming nog bij die van de blanco proef achterblijft.

De bruiningen van glycine, β -alanine, lysine, 1,4-diaminobutaan (putrescine) en ethanolamine liggen alle in dezelfde orde van grootte. Methylamine blijft wat achter, α -alanine ook. Van α -alanine is bekend dat bruinsingsreacties met dit aminozuur minder snel verlopen dan met β -alanine (GUSS, 1952; LENTO c.s., 1958) en ook minder snel dat met glycine (NOMURA, 1955; LENTO c.s., 1958). KUBOTA (1941) vermeldt, dat de carboxylgroep de bruinsingsreactie stoort, doch dat deze storing minder is naarmate de COOH-groep verder van de NH₂-groep is verwijderd. Glycine vormt op deze regel een uitzondering. – Intussen blijkt uit dit alles de grote verwantschap van deze reacties met 'de' Maillardreactie.

De gemeten waarden bij arginine en vooral cysteine tonen aan hoezeer de aanwezigheid van een andere funktionele groep in het aminozuurmolecuul de bruining kan beïnvloeden. Van de sulfhydrylgroep is overigens bekend dat bruinsingsreacties er sterk door worden vertraagd (GUSS, 1952). Arginine daarentegen is genoemd als een van de sterkst bruinende aminozuren (MORRIS en FORDHAM, 1962).

Curieus is de sterke verbruining van 1,2-diaminoethaan met rookwater. De oorzaak van dit verschijnsel is niet duidelijk.

We volstaan met een opsomming van deze feiten. Overigens blijkt dat glycine zich, temidden van andere aminoverbindingen, niet onderscheidt door een sterk afwijkend gedrag. Op grond van deze experimenten bestaat dan ook geen reden, grote bezwaren te maken tegen deze verbinding als representant van de aminogroepen die reageren met de actieve verbindingen uit rook(water).

Intussen wijzen de schommelingen in de verhouding E_{400}/E_{500} op verschillende samenstellingen van de reaktiemengsels. Over de vraag of dit, behalve op het verschil in de – ingebouwde – aminoverbindingen, ook berust op een andere opbouw van de bruine complexen, geeft dit experiment uiteraard geen uitsluitsel.

5.2.1. Gedrag van rookwater ten opzichte van aminogroepen die aan een macromolecuul zijn gefixeerd

De hier geteste aminoverbindingen hebben alle gemeen, dat hun moleculen volkomen beweeglijk zijn ten opzichte van elkaar en van de zich vormende complexen. Indien zij zouden zijn gefixeerd aan een groot molecuul (zoals dat bij een eiwit het geval is) kan men zich indenken dat de bruinsingsreactie hierdoor wordt beïnvloed.

We hebben daarom de bruining van rookwater met polylysine nog nagegaan.

Doordat we over slechts weinig van deze stof (polylysine.HBr van Schuchardt M.G. 40.000–100.000) beschikten, werd de bruiningstest enigszins anders uitgevoerd:

10 ml van het in de vorige proef gebruikte rookwater werd met natronloog op $\text{pH} = 5,0$ gebracht en daarna verdund tot 25 ml. Aan 1 ml van deze oplossing werd 0,04 mgeq (8,36 mg) polylysine.HBr toegevoegd, waarna twee uur in een kokend waterbad werd verhit. (In wezen is deze proefopzet dus gelijk aan die uit de vorige reeks).

Ter vergelijking werd dezelfde test ook uitgevoerd met 0,04 mgeq lysine (3,65 mg lysine.HCl). Na afloop bleek in de buis met polylysine een hoeveelheid bruin, gelatineus materiaal te zijn uitgevlokt – een effect dat we voor de aanvang der proef al min of meer verwachtten. De kleur van de oplossing was iets lichter dan die in de buis met lysine. Er is echter wat bruin materiaal aan de oplossing onttrokken. Dit in aanmerking nemend, konkluderen we dat de bruiningspotentiaal van polylysine niet veel zal verschillen van die van lysine, en dat het gefixeerd zijn van aminogroepen aan macromoleculen, zoals dat bij eiwitten het geval is, geen ernstige belemmering vormt voor de bruiningsreactie.

5.3. INVLOED VAN REAKTIEOMSTANDIGHEDEN OP DE BRUINING

Door ZIEMBA (1964, 1967a) is uitvoerig onderzoek verricht omtrent de invloed van allerlei omstandigheden op de ontwikkeling van de rookkleur, zie 2.5. Slechts aan de invloed van de luchtzuurstof op de bruining willen we hier nog enige aandacht besteden.

Ziamba nam waar dat de luchtzuurstof de kleur op gerookte produkten deed toenemen, en wel des te sterker naarmate bij de rookontwikkeling minder lucht was toegetreden. Dit zou er op kunnen wijzen dat sommige rookbestanddelen kunnen worden geoxideerd tot stoffen die het vermogen tot verbruining met aminogroepen in sterkere mate bezitten; deze oxidatie zou dan zowel tijdens de rookvorming als na de absorptie van de rook in het produkt kunnen plaatsvinden.

In een monster rookwater hebben we nagegaan of de bruiningsreactie werd beïnvloed, indien op het reaktiemengsel lucht dan wel stikstof werd geleid.

Aan vier maal 10 ml rookwater werd 1,0 g glycine toegevoegd. Deze oplossingen werden gedurende een uur aan de terugvloeiakoeler gekookt, waarbij op twee mengsels lucht en op de andere twee stikstof werd geleid. Daarna werd verdund naar 500 ml en de extincties bij 400 en 500 nm gemeten.

	E_{400}	E_{500}
Lucht	0,370–0,379	0,128–0,129
Stikstof	0,340–0,340	0,104–0,104

Het experiment werd herhaald met een tienmaal zo kleine hoeveelheid glycine; nu werden de volgende waarden verkregen:

	E ₄₀₀	E ₅₀₀
Lucht	0,300–0,306	0,115–0,120
Stikstof	0,259–0,260	0,084–0,086

Onder een stikstofatmosfeer blijkt de bruining inderdaad minder. (Hoe groot de werkelijke invloed van de luchtzuurstof op de kleur van gerookte produkten is, valt uit deze proef uiteraard niet af te leiden; het werk van Ziemba geeft hierover betere informatie). Wel rijst de vraag, in hoeverre de bruining van individuele rookbestanddelen met glycine wordt beïnvloed door het al of niet aanwezig zijn van zuurstof. We hebben dit nagegaan voor glycolaldehyde, glyoxaal, acetol en methylglyoxaal.

Van elk dezer verbindingen werd een 0,5%-ige oplossing onderzocht. Aan 2×10 ml werd 1,0 of 0,1 g glycine toegevoegd; het mengsel werd een uur aan de terugvloeiakoeler gekookt – onder lucht of onder stikstof – en vervolgens uitverdund tot 500 ml (tenzij anders vermeld). De pH bedroeg in alle gevallen omstreeks 5.

Glycolaldehyde

	E ₄₀₀	E ₅₀₀
1,0 g glycine – lucht	0,777	0,268
– stikstof	0,688	0,205
0,1 g glycine – lucht	0,666	0,242
– stikstof	0,465	0,144

Glyoxaal

	E ₄₀₀	E ₅₀₀
1,0 g glycine – lucht	0,583	0,160
– stikstof	0,558	0,148
0,1 g glycine – lucht	0,140	0,041
– stikstof	0,172	0,054

Acetol (verdund naar 25 ml)

	E ₄₀₀	E ₅₀₀
1,0 g glycine – lucht	0,612	0,094
– stikstof	0,154	0,029
0,1 g glycine – lucht	0,050	0,015
– stikstof	0,034	0,013

Methylglyoxaal

	E ₄₀₀	E ₅₀₀
1,0 g glycine – lucht	0,708	0,203
– stikstof	0,668	0,176
0,1 g glycine – lucht	0,222	0,050
– stikstof	0,277	0,064

Uit deze cijfers valt geen duidelijk effect van luchtzuurstof op de bruining van de beide α -dicarbonylverbindingen met glycine af te leiden. Bij glycolaldehyde en

vooral bij acetol blijkt dit effect wel aanwezig. De bruining van acetol blijft echter zeer gering en derhalve kan het toenemen van de bruining van rookwater onder invloed van luchtzuurstof niet worden toegeschreven aan de oxidatie van acetol of van acetol/glycinecomplexen. De – zij het minder spektakulaire – toename van de bruining van glycolaldehyde door de aanwezigheid van luchtzuurstof kan de toename in rookwater wél verklaren. (Het door ons gebruikte rookwater bevat 0,129 % glycolaldehyde). Bij verder onderzoek naar de invloed van de luchtzuurstof bij de kleurontwikkeling op gerookte produkten kan het daarom van belang zijn, aandacht te besteden aan de rol die glycolaldehyde hierin speelt.

5.4. REAKTIES DIE AAN DE BRUINING TEN GRONDSLAG LIGGEN

De tot nu toe in dit hoofdstuk beschreven experimenten kunnen zonder twijfel in allerlei richtingen worden uitgebreid; waarschijnlijk zal dit vele nuttige en interessante gegevens opleveren. De gekompliceerdheid van ons onderwerp zal evenwel bijna zeker leiden tot een zeer onoverzichtelijk beeld van de situatie.

Daarom zal – in dit stadium – een fundamentele benadering van bepaalde aspecten van de bruiningsreactie(s) deze situatie wellicht meer verhelderen dan een groot aantal waarnemingen in de trant van de hierboven beschreven proeven, hoe nuttig deze op zichzelf ook zijn.

Nu zijn over bruiningsreacties, in het bijzonder over de Maillardreactie, honderden artikelen gepubliceerd en het ligt voor de hand, op deze kennis terug te grijpen bij onze verdere studie. Helaas echter wordt in vele publikaties volstaan met een beschrijving van waarnemingen; ten aanzien van de achtergronden van bruiningsreacties blijven nog steeds verscheidene vragen onbeantwoord. Zeker geldt dit voor reacties tussen aminogroepen en de actieve verbindingen welke wij in rookwater vonden.

We hebben derhalve een begin gemaakt met de bestudering van deze reacties. Ons onderzoek betrof in hoofdzaak de reacties met glycolaldehyde; daarnaast zijn ook enkele experimenten met methylglyoxaal en met mengsels van deze beide stoffen verricht.

5.4.1. *Onderzoek naar de reacties tussen aminogroepen en glycolaldehyde*

Glycolaldehyde kan worden opgevat als de eenvoudigste suiker, of als het eenvoudigste α -hydroxyaldehyde. Door enkele onderzoekers (HURD en KELSO, 1948; BEACHAM en DULL, 1951) is er op gewezen dat de α -hydroxylgroep in de bruiningsreactie essentieel is. Nu is dit in zijn algemeenheid niet juist, getuige de bruining van onverzadigde aldehyden en van acetaldehyde met aminogroepen; bovendien is door LEA en RHODES (1952) aangetoond dat 2-deoxygalactose zelfs sterker bruint dan galactose. Dat de α -hydroxygroep bij de bruining van suikers met aminoverbindingen een belangrijke rol kan spelen, lijkt echter geen twijfel.

Eveneens belangrijk is de verdere structuur van de α -hydroxycarbonylverbinding. Interessant is de afname van de bruining t.o.v. aminogroepen in de reeks glycolaldehyde-glycerinealdehyde-glucose (BEACHAM en DULL, 1951).

Door HURD c.s. (1952, 1956) is een studie gemaakt van de reactie van α -hydroxycarbonylverbindingen met aminozuren. Zij stelden vast, dat bij de reactie van benzoïne met aminozuren tetrafenylpyrrol en tetrafenylpyrazine ontstonden. De laatste verbinding zou zijn ontstaan via een oxidatief proces, de eerste door een aldoliseringsreactie, gevolgd door ringsluiting. Het ging deze onderzoekers hierbij met name om het aantonen van dit aldoliseringsmechanisme; de vorming van heterocyclische verbindingen was in feite bijzaak. Niettemin werd het optreden van pyrrolderivaten gezien als een belangrijke stap in de ontwikkeling van bruingekeurde macromoleculen.

Nu vindt men, in literatuur over de Maillardreactie, steeds weer opmerkingen die er op wijzen dat pyrrolderivaten bij deze reactie een rol spelen. Reeds in 1914 opperde RUCKDESCHEL deze veronderstelling. Hij isoleerde melanoïdinen, die door de reactie van glucose met aminozuren waren ontstaan, en onderwierp ze aan een destillatie met zinkstof. In het destillaat kon pyrrol worden aangetoond.

ENDERS (1938a) deed soortgelijke proeven en kon eveneens pyrrol aantonen. Het gelukte hem echter niet, deze stof te isoleren.

FRANCIS en WHEELER (1925) waren van mening dat in humuszuren – die een grote verwantschap vertonen met de melanoïdinen die bij de Maillardreactie ontstaan – pyrrolringen een integrerend bestanddeel vormen.

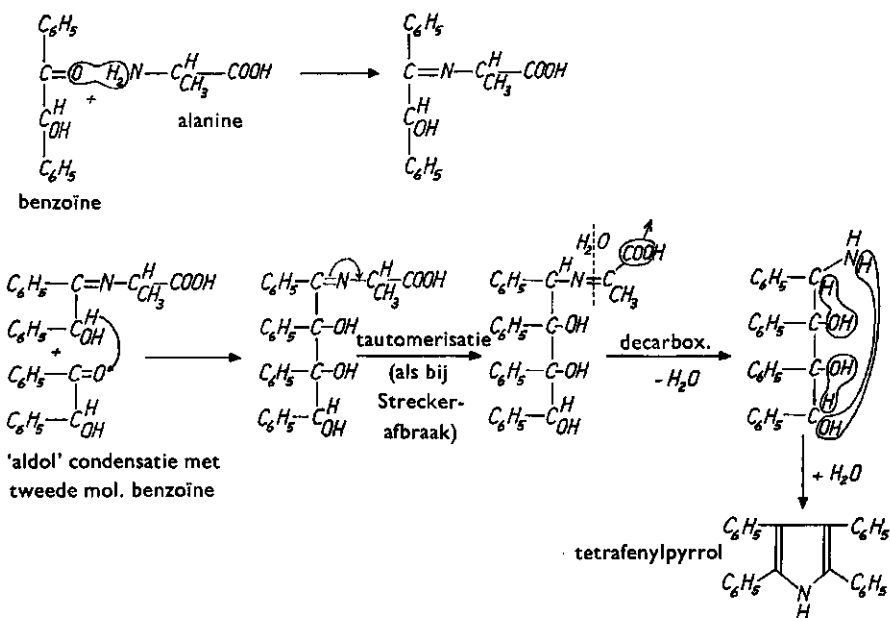
In later jaren werd de sterke fluorescentie, die vaak tijdens de bruiningsreactie wordt waargenomen (OLCOTT en DUTTON, 1945; KLINE en STEWART, 1948; HANNAN en LEA, 1951; REGIER en TAPPEL, 1956; BURTON c.s., 1962b, 1963) in verband gebracht met de aanwezigheid van pyrrolkernen. Zo konstateerden PEARCE en BRYCE (1947), dat eiopoeder van slechte kwaliteit, waarin Maillardreacties hadden plaatsgevonden, fluorescentiespectra vertoonden die vrijwel overeenkwamen met die van pyrrol.

Eigen onderzoek (RUITER, 1964) leerde dat 2,5-diketogluconzuur en ook 5-ketofructose, γ -diketoverbindingen die met aminogroepen direkt pyrrolderivaten kunnen vormen, een zeer intense verbruining met deze aminogroepen te zien geven. Dit is in overeenstemming met een publikatie van O'NEILL c.s. (1962) waar de gele verkleuring van drogende oliefilms wordt verklaard door aan te nemen dat γ -dicarbonylverbindingen met sporen ammoniak uit de atmosfeer tot pyrrolkernen condenseren, waarna autoxidatie en verdere condensatie volgt.

Op grond van deze aanwijzingen leek het ons de moeite waard, na te gaan of de bruiningsreactie met glycolaldehyde ook verloopt via de vorming van pyrrol of pyrrolderivaten.

5.4.1.1. *Onderzoek naar de eventuele rol van pyrrolderivaten bij de bruining van glycolaldehyde met glycine*

Door HURD en BUSS (1956) wordt voor de reactie tussen benzoïne en alanine het volgende schema gepostuleerd:



Op dezelfde wijze zou uit acetol en een aminozuur 2,4-dimethylpyrrol moeten ontstaan (en uit glycolaldehyde en een aminozuur pyrrol). Pogingen om 2,4-dimethylpyrrol aan te tonen in een reaktiemengsel van acetol en alanine faalden evenwel; wel werd 2,5-dimethylpyrazine gevonden. Hurd wijt dit falen aan de omstandigheid dat 2,4-dimethylpyrrol, in tegenstelling tot 2,5-dimethylpyrazine, direkt met acetol verder reageert tot bruine verbindingen. Reaktiemengsels van acetol en alanine enerzijds, en acetol en 2,4-dimethylpyrrol anderzijds, vertoonden echter niet geheel identieke UV-spectra.

De theorie van Hurd veronderstelt een Strecker-afbraak van het aminozuur. Bij de reactie van glycolaldehyde met glycine werd echter geen CO_2 ontwikkeld. Indien we een oplossing van glycolaldehyde kookten met wat aminoethylcellulose werd deze laatste stof donkerbruin, terwijl de oplossing volkomen kleurloos bleef. De donkerbruine kleur kon op geen enkele wijze van het AEC worden afgeëxtraheerd. De C-N-binding in het amine blijft dus, in tegenstelling tot hetgeen door Hurd wordt gesuggereerd, intact. Als er pyrrolkernen ontstaan, zijn dit in elk geval pyrrolkernen die met hun stikstofatoom aan het AEC-molecuul zijn verbonden.

De gedachte aan het op deze wijze ontstaan van pyrrolkernen blijkt evenwel volslagen onhoudbaar, en wel om de volgende redenen:

1. Voor pyrrol of pyrrolderivaten staan in principe drie wegen open naar de vorming van hoogmoleculaire verbindingen: polymerisatie zonder meer, polymerisatie na oxidatie en polymerisatie na reactie met andere verbindingen (hier dus een van de uitgangsstoffen). De polymerisatie van pyrrol en van de meeste pyrrolderivaten verloopt echter vrij traag en komt in feite pas goed op gang in zeer zuur milieu (vorming van zg. pyrrolrood). Ook de verkleuring van pyrrol

– of een pyrroloplossing – aan de lucht, als gevolg van oxidatiereacties, verloopt niet zo snel dat hiermee de glycolaldehyde-glycinebruining kan worden verklaard. Wel is bekend dat β -hydroxypyrrolen buitengewoon reaktief zijn (BALTAZZI en KRIMEN, 1963), maar kennelijk worden deze hydroxyverbindingen niet snel aan de lucht gevormd. Als men bovendien nog bedenkt, dat ook onder stikstofatmosfeer een sterke bruining optreedt in een glycolaldehyde-glycine-mengsel, zie 5.3, zal het duidelijk zijn dat oxidatie van gevormd pyrrol nooit een verklaring kan vormen voor de hier waargenomen verschijnselen.

De reactie van pyrrol met glycolaldehyde tenslotte geeft een duidelijke kleurontwikkeling te zien, doch deze wijkt sterk af van de bruingele kleuren die we meestal waarnemen: de hier optredende kleur is paarsbruin.

De electronenspectra van beide gekleurde oplossingen werden met elkaar vergeleken. Deze oplossingen waren als volgt verkregen:

- A. 1 ml 2,0% pyrrol (vers gedestilleerd) in ethanol, 10 ml 0,2% glycolaldehyde in water en 1 ml water werden bij elkaar gevoegd en vervolgens gedurende een uur in een kokend waterbad verhit;
- B. 1 ml 2,25% glycine in water, 10 ml glycolaldehyde (0,2%) in water en 1 ml ethanol werden bij elkaar gevoegd en op dezelfde wijze verhit.

Van deze oplossingen werden electronenspectra opgenomen met behulp van een Beckman DBG-spectrograaf. De verkregen curven bleken zeer van elkaar te

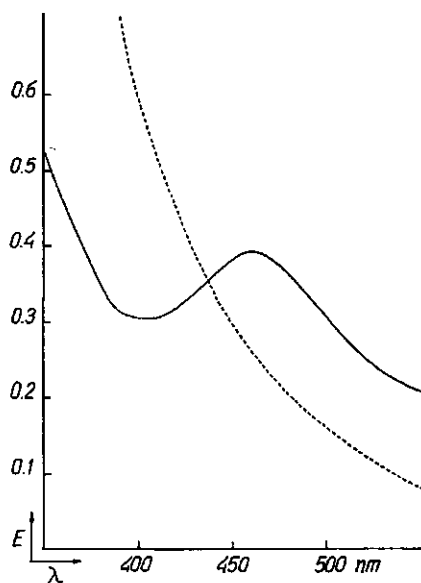


FIG. 17. Extinctiecurven van reaktiemengsels van glycolaldehyde en pyrrol (—) en van glycolaldehyde en glycine (- - -).

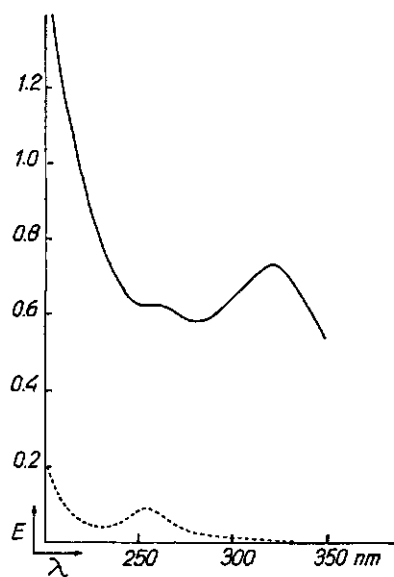


FIG. 18. Extinctiecurven van een mengsel van 2 mgmol glycolaldehyde, 1 mgmol glycine en 1 ml water (—) en van 2 mgmol glycolaldehyde en 1 ml water (- - -), na 18 uur bij kamertemperatuur. Beide oplossingen verdund tot 500 ml.

verschillen, zie figuur 17. – Zij nog vermeld dat verwarmen van een pyrrolooplossing met glycine niet tot kleurontwikkeling leidde.

2. Reaktiemengsels van glycolaldehyde en glycine zijn, in verschillende stadia, aan IR- en NMR-spectrografie onderworpen. (De IR-spectrogrammen werden verkregen met een Perkin-Elmer infraroodspectrograaf, type 237, en de NMR-spectrogrammen met een Jeol JNM C-60 spectrograaf voor kernmagnetische resonantie). Nimmer werd een aanwijzing verkregen voor de aanwezigheid van pyrrolkernen in deze mengsels. Met het zeer gevoelige reagens van Ehrlich (p-dimethylaminobenzaldehyde in zoutzure ethanol) kon nooit een positieve reactie op pyrrol worden verkregen, ook niet indien we van een grote overmaat glycine uitgingen. Wel bleek, na een zinkstofdestillatie van een dergelijk mengsel, Ehrlich-positief materiaal in het destillaat aanwezig, zie 5.4.1.3. Alles wijst er echter op, dat het hier om een zijreactie gaat.

In dit verband interesseert het ons ook, waarom glycolaldehyde zeer snel verbruist met glycine, acetol in veel mindere mate en acetoïne in het geheel niet, althans niet onder de door ons gebezigde reactiecondities. De mogelijkheid bestaat dat in al deze drie gevallen een tussenproduct optreedt, waarvan de reactiviteit afneemt in de reeks glycolaldehyde-acetol-acetoïne; de andere mogelijkheid is dat de primaire reactie in deze volgorde steeds moeilijker verloopt. We hebben dit nagegaan door geconcentreerde mengsels van de betreffende verbin-

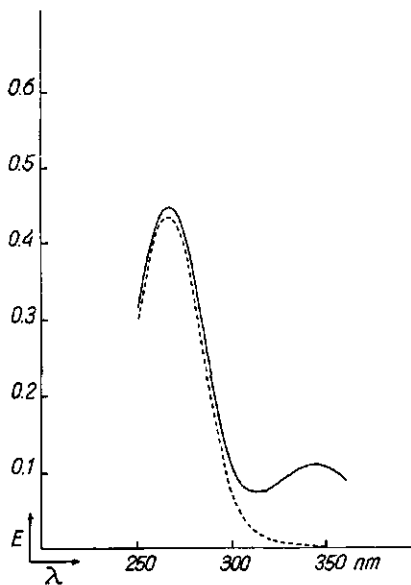


FIG. 19. Extinctiecurven van een mengsel van 2 mgmol acetol, 1 mgmol glycine en 1 ml water (—) en van 2 mgmol acetol en 1 ml water (- - -), na 24 uur bij kamertemperatuur. Beide oplossingen verdund tot 100 ml.

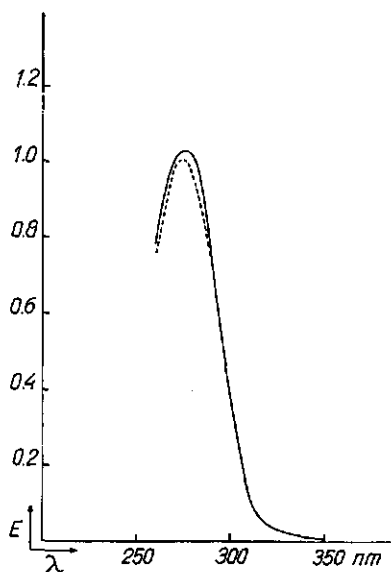


FIG. 20. Extinctiecurven van een mengsel van 2 mgmol acetoïne, 1 mgmol glycine en 1 ml water (—) en van 2 mgmol acetoïne en 1 ml water (- - -), na 64 uur bij kamertemperatuur. Beide oplossingen verdund tot 100 ml.

dingen met glycine te bereiden, deze enige tijd bij kamertemperatuur te laten staan en daarna de UV-spectra te vergelijken met die van oplossingen zonder glycine. We voerden dit experiment uit bij kamertemperatuur, omdat we verwachtten dat thermolabele stoffen zouden ontstaan.

De volgende mengsels werden bereid:

- A. 2 mgmol glycolaldehyde, 1 mgmol glycine, 1 ml water;
- B. 2 mgmol acetol, 1 mgmol glycine, 1 ml water;
- C. 2 mgmol acetoïne, 1 mgmol glycine, 1 ml water.

Deze mengsels werden resp. 18, 24 en 64 uur bij $24 \pm 1^\circ$ weggezet. De UV-spectra zijn weergegeven in de figuren 18, 19 en 20. Duidelijk blijkt dat in mengsel C geen en in mengsel B weinig reactie optreedt. Het niet verbruiken van mengsel C berust op het niet verlopen van een primaire reactie, en niet op het ontstaan van een naar verhouding weinig actief tussenproduct.

In mengsel A blijkt een verbinding te zijn ontstaan met een maximum in de absorptiecurve bij ongeveer 320 nm. Een dergelijke verbinding treedt, zij het in veel mindere mate, ook op in mengsel B; de top ligt daar echter bij ongeveer 345 nm.

Uit het feit dat in mengsel C geen reactie plaatsvindt, volgt nog dat het ontstaan van pyrrolderivaten, zoals dat door Hurd en Buess wordt beschreven, slechts onder meer rigoureuze condities, zoals een hogere temperatuur, mogelijk zal zijn. Vermoedelijk is deze vorming van pyrrolderivaten alleen mogelijk indien de reaktiepartners nog niet hebben geparticipeerd in gemakkelijker verlopende reacties, zoals dat met name tussen glycolaldehyde en glycine het geval is.

5.4.1.2. Verder onderzoek naar het verloop van de glycolaldehyde-glycinereactie

Door MORRIS en FORDHAM (1962) is een aantal jaren geleden een onderzoek naar de bruiningsreactie tussen dihydroxyaceton en arginine verricht. Daarbij kwam vast te staan, dat deze kleurontwikkeling maximaal was bij de molaire verhouding dihydroxyaceton:arginine = 2:1. Genoemde auteurs maakten o.a. gebruik van de door JOB (1928) uitgewerkte methode der continue variaties; n mol van de ene component wordt voorzien van $n(1-x)$ mol van de andere component, waarbij men x , in een reeks proeven, laat variëren tussen 0 en 1. Uiteraard worden de volumina van alle oplossingen gelijkgehouden.

Wij herhaalden dit experiment voor het glycolaldehyde-glycinesysteem. Aan 10x ml 0,1 M glycine werd 10(1-x) ml 0,1 M glycolaldehyde toegevoegd. De oplossingen werden op een stoombad drooggedampt en vervolgens weer van 10 ml water voorzien. Dit werd nog tweemaal herhaald; de totale tijd op het waterbad bedroeg ongeveer een uur. De oplossingen werden vervolgens aangevuld tot 500 ml en gemeten bij 400 en 500 nm. Evenals in de experimenten van Morris en Fordham waren de uitgangsoptlossingen voorzien van 0,1 M fosfaatbuffer en op pH = 6,3 gebracht.

De gemeten extinctiewaarden zijn vermeld in tabel XVI en uitgezet in figuur 21. We vonden ongeveer dezelfde 2:1-verhouding als Morris en Fordham in hun dihydroxyaceton-argininesysteem. Hoewel het voor de hand ligt, aan te nemen

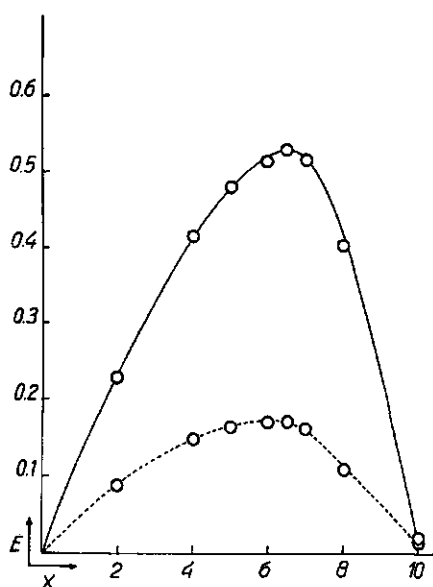
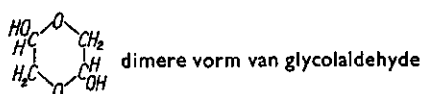


FIG. 21. Verloop van de extinctie bij 400 (—) en 500 (- - -) nm in reaktiemengsels van x ml 0,1 M glycolaldehyde en (10-x) ml 0,1 M glycine.

dat een reactieproduct, opgebouwd uit twee moleculen van de hydroxycarbonylverbinding en één aminozuurmolecuul, kennelijk een belangrijke rol speelt bij de kleurvorming, moet bij deze konklusie toch enige voorzichtigheid worden betracht. Zowel NMR- als IR-spectra van glycolaldehyde wijzen er namelijk op dat deze stof, ook in oplossing, voor het overgrote deel als dimeer aanwezig is, en wel in de vorm van een cyclohalfacetaal:



Een 2:1-reaktieverhouding kan dan evengoed betekenen dat één aminozuurmolecuul reageert met één dimeermolecuul, waarbij een 1:1-adduct of -conden-

TABEL XVI. Verband tussen de bruining van glycolaldehyde-glycinemengsels en een wisselende verhouding van beide componenten.

x ml 0,1 M glycolaldehyde; 10 - x ml 0,1 M glycine; pH = 6,3. Behandeld zoals in de tekst beschreven; verdund naar 500 ml en gemeten bij 400 en 500 nm.

x	E ₄₀₀	E ₅₀₀
2	0,231	0,089
4	0,413	0,148
5	0,481	0,166
6	0,514	0,170
6,5	0,529	0,173
7	0,516	0,163
8	0,402	0,108
10	0,015	0,009

saat ontstaat en een monomeermolecuul overblijft. Dit monomeermolecuul zal dan wel zeer snel met een ander aminozuurmolecuul reageren, doch dit verandert het beeld niet: de snelheid van de eerste reactie bepaalt de optimale molaire verhouding.

Een minder dubbelzinnige informatie verkrijgen we door aan gelijke hoeveelheden aminozuur steeds grotere hoeveelheden glycolaldehyde toe te voegen en na te gaan welk effect dit heeft op de kleurvorming. Omgekeerd kan ook aan gelijkblijvende hoeveelheden glycolaldehyde steeds meer glycine worden toegevoegd.

We voerden deze experimenten uit met de reeds genoemde 0,1 M oplossingen van glycolaldehyde en van glycine (met een pH van 6,3). Aan 1 ml glycineoplossing werd resp. 1, 2, 3, 4, 5 en 10 ml glycolaldehydeoplossing toegevoegd. De eerste vijf oplossingen werden aangevuld tot 10 ml. Alle oplossingen werden daarna drooggedampt en vervolgens weer behandeld als boven beschreven. De oplossingen werden tot 150 ml aangevuld en gemeten bij 400 en 500 nm. Ook deze procedure werd uitgevoerd naar analogie van een door Morris en Fordham beschreven experiment.

Het experiment werd nog tweemaal herhaald. Tabel XVII geeft een overzicht van de gevonden extinctiewaarden. Hieruit blijkt, dat de reproduceerbaarheid slechter wordt naarmate de overmaat glycolaldehyde groter is. Ook blijkt het verloop van de E_{500} bij toenemende overmaat glycolaldehyde geheel anders dan het verloop van de E_{400} . – De derde reeks waarnemingen is grafisch uitgezet in figuur 22.

Daarna werd aan zesmaal 2 ml glycolaldehyde 1, 2, 4, 6, 10 en 20 ml glycineoplossing toegevoegd en dezelfde werkwijze toegepast. Dit experiment werd twee maal uitgevoerd. De reproduceerbaarheid bleek hier beter, zie tabel XVIII. Het gemiddelde van de gevonden waarden is uitgezet in figuur 23. In tegenstelling tot de situatie bij een grote overmaat glycolaldehyde blijkt het effect van een grote overmaat glycine op de kleurvorming nihil. Er kunnen dus kennelijk grote moleculen ontstaan met naar verhouding zeer veel glycolaldehyderesten, terwijl anderzijds het aantal glycineresten in de macromoleculen aan zekere grenzen is

TABEL XVII. Verband tussen de bruining van glycolaldehyde-glycinemengsels en een toenemende overmaat glycolaldehyde.

1 ml 0,1 M glycine; x ml 0,1 M glycolaldehyde; pH = 6,3. Behandeld zoals in de tekst beschreven; verdund naar 150 ml en gemeten bij 400 en 500 nm. Uitgevoerd in triplo.

x	E_{400}			E_{500}		
1	0,263	0,255	0,268	0,090	0,084	0,091
2	0,469	0,440	0,458	0,154	0,139	0,146
3	0,621	0,555	0,590	0,193	0,166	0,181
4	0,680	0,593	0,645	0,194	0,160	0,181
5	0,710	0,588	0,660	0,180	0,142	0,160
10	0,759	0,602	0,681	0,156	0,126	0,139

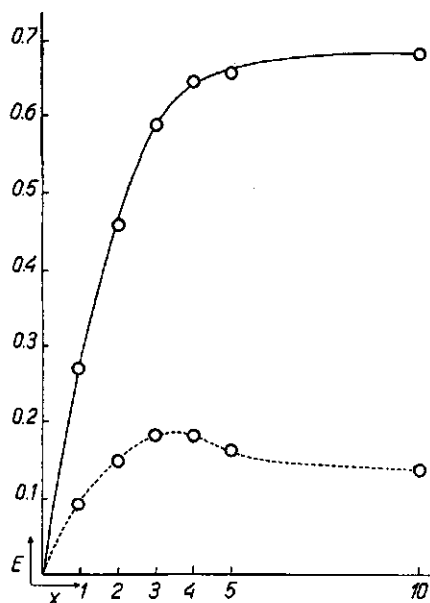


FIG. 22. Verloop van de extinctie bij 400 (—) en 500 (---) nm in reaktiemengsels van 1 ml 0,1 M glycine en x ml 0,1 M glycolaldehyde.

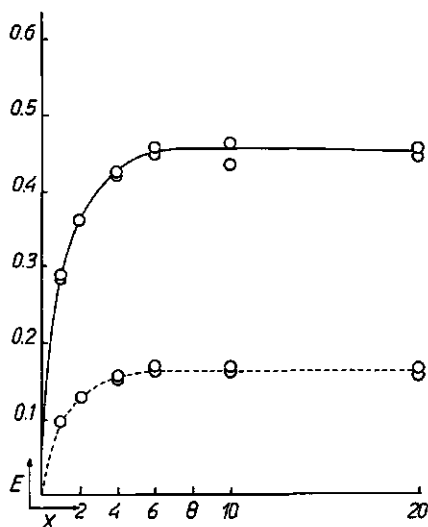


FIG. 23. Verloop van de extinctie bij 400 (—) en 500 (---) nm in reaktiemengsels van 2 ml 0,1 M glycolaldehyde en x ml 0,1 M glycine.

gebonden. Daar echter blijkt, dat ook een steeds grotere overmaat glycolaldehyde steeds minder invloed op de kleurvorming heeft, zou men zich kunnen voorstellen dat bij deze reactie optredende tussenprodukten eerder tot polymerisatie neigen dan tot reacties met een van de uitgangsstoffen. De volgende stap in ons onderzoek is een poging, iets over deze tussenprodukten te weten te komen.

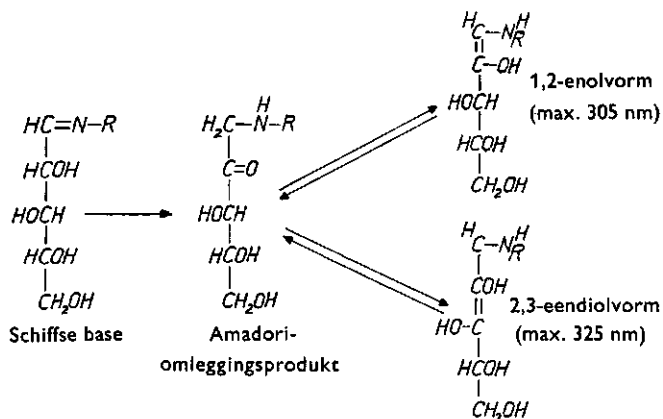
TABEL XVIII. Verband tussen de bruining van glycolaldehyde-glycinemengsels en een toenemende overmaat glycine.

2 ml 0,1 M glycolaldehyde; x ml 0,1 M glycine; pH = 6,3. Behandeld zoals in de tekst beschreven; verdund naar 250 ml en gemeten bij 400 en 500 ml. Uitgevoerd in duplo.

x	E ₄₀₀		E ₅₀₀	
1	0,283	0,287	0,094	0,095
2	0,361	0,361	0,127	0,127
4	0,417	0,421	0,150	0,155
6	0,456	0,446	0,167	0,161
10	0,431	0,458	0,157	0,165
20	0,441	0,455	0,155	0,164

5.4.1.3. Isolatie en identifikatie van een tussenprodukt uit de bruiningsreactie van glycolaldehyde met glycine c.q. andere aminoverbindingen

Uit figuur 18 blijkt dat het reaktiemengsel van glycolaldehyde en glycine een duidelijk maximum in zijn UV-spectrum bezit, en wel bij omstreeks 320 nm. Ook Morris en Fordham vonden in hun dihydroxyaceton-argininemengsels een topje bij 325 nm. BERRENS en BLEUMINK (1966) namen waar dat UV-spectra van reaktiemengsels van eenvoudige suikers en aminen alle een maximum bij 305 nm te zien geven. BLEUMINK postuleert in zijn proefschrift (1967) een reactieschema van de eerste stadia van de bruiningsreactie tussen xylose en de vrije aminogroepen van eiwit, waarbij hij het maximum bij 305 nm toekent aan een 1,2-enol-struktuur. Ook kan een 2,3-eëndiolstruktuur optreden met een absorptie-maximum bij 325 nm:



Een 2,3-eëndiolvorm zou echter, indien glycolaldehyde de reaktiepartner is, slechts kunnen optreden na koppeling met een tweede molecuul glycolaldehyde, via een aldolisiatiereactie.

Het maximum bij ongeveer 320 nm, dat in het glycolaldehyde-glycinemengsel wordt gevonden, is vrijwel niet meer terug te vinden indien we de reactie bij hogere temperatuur laten verlopen; kennelijk is de stof nogal thermolabiel. Wel vinden we soms een vage 'bult' in de extinctiecurve bij 290 à 295 nm.

Door elutie van het reaktiemengsel over Sephadex G 10 of G 25, met water als eluens, bleek het mogelijk, dit tussenprodukt te scheiden van de uitgangsstoffen. De procedure was hierbij als volgt:

75 mg glycine (Brocades; 1 mgmol) en 128 mg glycolaldehyde (Fluka, 93,5%; 2 mgmol) werden opgelost in 1 ml water, waarna dit mengsel 18 uur bij $24^\circ \pm 1^\circ$ werd weggezet. Vervolgens werd de – inmiddels zeer donkerbruin geworden – oplossing tot 5 ml aangevuld, waarna $\frac{1}{2}$ ml op een Sephadex G 10-kolom (lengte 44 cm, inwendige diameter 1,44 cm) werd gebracht. De elutiesnelheid bedroeg ongeveer 0,3 ml/minuut; de fraktiegrootte was 1,2 ml. – Bij dit experiment (en ook bij de volgende) werd gebruik gemaakt van een 'RadiRac' fraktiecollector

van LKB, terwijl het eluens werd toegevoegd via een peristaltische pomp (eveneens van LKB).

De frakties werden geteld vanaf het eerste zichtbaar gekleurde eluaat. De frakties 3 t.e.m. 6 vertoonden een spectrum met een duidelijk maximum, dat iets beneden 320 nm blijkt te liggen. De andere frakties bezaten weinig uitgesproken UV-spectra. Door een gedeelte der fraktie te onderzoeken met resp. ninhydrine-reagens en een DNPH-oplossing in zwavelzuur, kon worden vastgesteld dat beide stoffen vanaf fraktie 15 duidelijk in het eluaat aantoonbaar waren.

Het experiment werd nog eens uitgevoerd; nu echter werd geëluëerd over een G25-kolom. Het doel hiervan was, na te gaan of een betere scheiding tussen de bruine verbindingen en de verbindingen met een absorptiemaximum bij ca 320 nm kon worden verkregen. De fraktiegrootte was nu 1,33 ml en de elutiesnelheid 0,27 ml/minuut.

De frakties 1 t.e.m. 5 bevatten bruine reactieproducten. In de frakties 9 t.e.m. 13 werd, na tienvoudige verdunning, een duidelijk maximum gevonden dat varieerde van 319 nm (fraktie 9) tot 323 nm (fraktie 13). Vanaf fraktie 17 werden glycolaldehyde en glycine in het eluaat gevonden.

De frakties 9 t.e.m. 13 werden vervolgens bij elkaar gevoegd en gevriesdroogd. (Het hierbij gebruikte vriesdroogapparaat was een in het Instituut voor Visserij-producten gebouwd toestel, waarin de lage temperatuur werd verkregen met droogijs en alcohol en waarop een vacuumpomp was aangesloten die een vacuüm van 2×10^{-4} Torr kon bereiken). Het was onze bedoeling, van het gevriesdroogde materiaal een infraroodspectrum op te nemen. Daar de geïsoleerde hoeveelheid echter onhandelbaar klein bleek, werd zij opnieuw opgelost in enkele ml water, waarna 100 mg KBr werd toegevoegd en het mengsel opnieuw werd gevriesdroogd.

Na tabletteren van de gevriesdroogde massa werd een infraroodspectrum opgenomen. Bij het tabletteren waren evenwel reacties opgetreden, getuige de bruine kleur van het verkregen tablet. Er werd dan ook een onduidelijk spectrum verkregen, waaruit niet veel viel af te leiden.

Inmiddels was ons echter gebleken, dat bij de reactie van glycolaldehyde met ethanolamine niet alleen een veel sterkere bruining, maar ook een iets stabielere tussenproduct optrad. In reaktiemengsels van ethanolamine en glycolaldehyde kon steeds een zeer duidelijk maximum bij 305 nm worden waargenomen, ook in mengsels die op 50° of zelfs op 100° waren verhit. We besloten, voorlopig met aminoethanol in plaats van met glycine verder te werken. Ons plan was hierbij, een grote hoeveelheid reaktiemengsel ruwweg te scheiden op een grote G10-kolom, om daarna enkele frakties te vriesdrogen en vervolgens een fijnere scheiding op een G25-kolom toe te passen.

Daartoe werd een aminoethanoloplossing bereid (6,1 % w/v in water; pH met ijsazijn op 5,0 ingesteld), die dus per ml 1 mgeq bevatte. Aan 2 ml van deze oplossing werd 4 mgmol (256 mg 93,5%) glycolaldehyde toegevoegd, waarna dit mengsel een etmaal bij $24 \pm 1^\circ$ werd geplaatst. Daarna werd 0,1 ml naar 150 ml verdund en van deze verdunning een UV-absorptiespectrum opgenomen, zie figuur 24. De rest van het mengsel werd nu op een Sephadex G10-kolom ge-

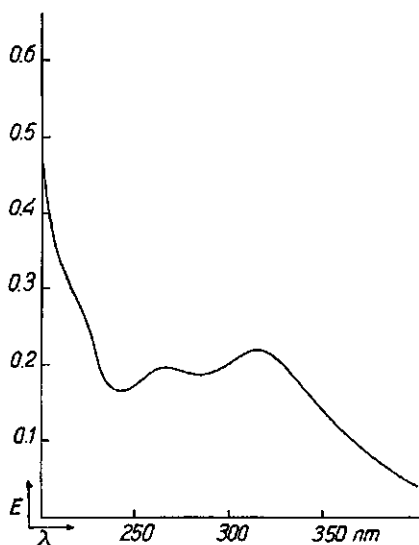


FIG. 24. Extinctiecurve van een reaktiemengsel van 2 mgmol aminoethanol en 4 mgmol glycolaldehyde in 2 ml water, na 24 uur bij $24^{\circ} \pm 1^{\circ}$. Reactie uitgevoerd bij pH = 5,0. Verdunningsfactor = 1500.

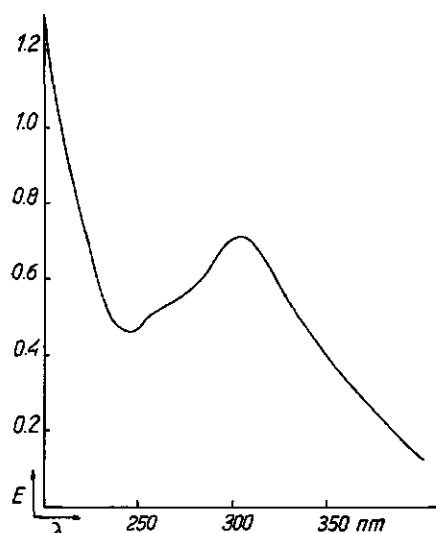


FIG. 25. Scheiding van een reaktiemengsel van glycolaldehyde en aminoethanol op Sephadex G-10: Extinctiecurve van fraktie 10. Verdunningsfactor = 100.

bracht (lengte 67 cm; inwendige diameter 3,2 cm). De fraktiegrootte was 8,14 ml, de elutiesnelheid 0,41 ml/minuut.

De eerste zichtbaar gekleurde fraktie kwam na ruim 6 uur van de kolom. Tot en met fraktie 30 was het eluaat in meerdere of mindere mate gekleurd, met een maximum bij fraktie 12, die zeer donkerbruin was.

Bij UV-metingen in de frakties 6 t.e.m. 20, of in verdunningen daarvan, bleek steeds een duidelijk maximum bij 315 nm op te treden, met daarnaast een minder geprononceerd maximum bij ongeveer 270 nm. Figuur 25 toont de curve van de honderdvoudige verdunning van fraktie 10, die als typische representant van deze frakties kan worden beschouwd.

De frakties 22 t.e.m. 27 bezaten een maximum bij ongeveer 295 nm en een 'schouder' bij ongeveer 260 nm. In de frakties 28 en 29 was echter een maximum bij 254 en een schouder bij 295 nm aanwezig. In figuur 26 is de curve van de tienvoudige verdunning van fraktie 26 afgebeeld.

De frakties 30 t.e.m. 33 gaven weinig UV-absorptie te zien. In de frakties 34 t.e.m. 45 bleek een stof aanwezig met een zeer scherp maximum bij 296 nm. Figuur 27 toont het spectrum van fraktie 40 (1 ml naar 10 ml verdund).

Tenslotte bleek in de frakties 48 t.e.m. 53 nog een stof aanwezig met een maximum bij 289 nm. De extinctie was echter in al deze frakties zeer laag.

De stof met $\lambda_{\max} = 305$ nm blijkt dus niet te bestaan. Het maximum wordt veroorzaakt door interferentie van curven met maxima die niet veel van 305 nm afwijken (296 nm; 315 nm).

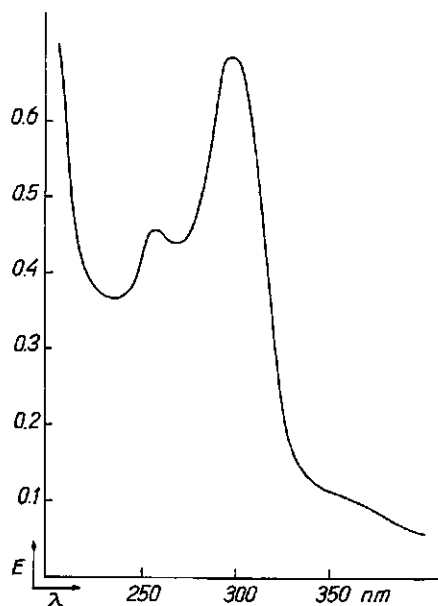


FIG. 26. Scheiding van een reaktiemengsel van glycolaldehyde en aminoethanol op Sephadex G-10; Extinctiecurve van fraktie 26. Verdunningsfaktor = 10.

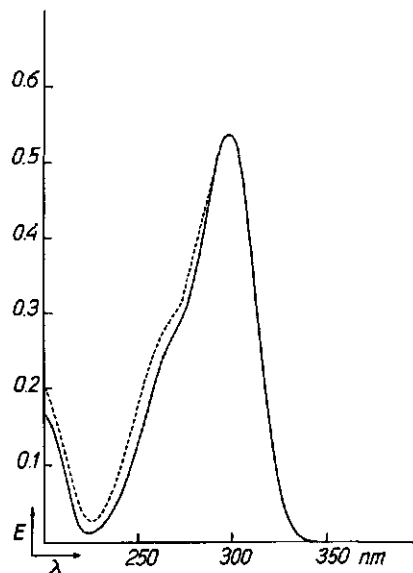


FIG. 27. Scheiding van een reaktiemengsel van glycolaldehyde en aminoethanol op Sephadex G-10; Extinctiecurve van fraktie 40 (—). Verdunningsfaktor = 10. De extinctiecurve van de door Petit beschreven verbinding '296' is eveneens opgenomen (- - -).

De frakties 6 t.e.m. 20 werden bijeengevoegd, gevriesdood en vervolgens opgelost in 4 ml water, waarna een tiende gedeelte van deze oplossing op een Sephadex G 25-kolom werd gebracht (inwendige diameter 0,9 cm; lengte 28 cm). De elutie vond weer plaats met water; elutiesnelheid 0,11 ml/minuut, fraktiegrootte 1,1 ml. Het bleek op deze wijze niet mogelijk, frakties te verkrijgen waarin de pieken bij 270 en 315 nm afzonderlijk voorkwamen. De frakties waarvan het spectrum deze pieken vertoonden, hadden alle een bruine kleur.

Met de 1 → 10-verdunning van de (oorspronkelijke) fraktie 10 werden nog enkele reacties uitgevoerd. Zesmaal 1 ml werden resp. voorzien van 1 ml water, 1 ml 0,2 N HCl, 1 ml 0,2 N NaOH, 1 ml 0,5% aminoethanol (met een pH van 5,0), 1 ml 0,5% glycolaldehyde en 1 ml 0,5% formaldehyde. Deze mengsels werden gedurende 3 uur op 50° verwarmd en daarna verdund naar 10 ml, waarna van de zes oplossingen UV-spectra werden opgenomen. Het blijkt dat de piek bij 270 nm, onder invloed van deze behandelingen, niet verandert; de piek bij 315 nm blijkt evenwel enigszins instabiel ten opzichte van zuur en meer nog ten opzichte van loog; ook de behandeling met glycolaldehyde doet deze piek iets lager worden.

Vervolgens werden de frakties 22 t.e.m. 29 bij elkaar gevoegd en gevries-

droogd, vervolgens opgelost in 3 ml water, waarna 0,3 ml op de G25-kolom werd gebracht. De elutie verliep op dezelfde manier als boven beschreven; ook de frakties werden op dezelfde wijze verzameld.

Ook hier bleken de stoffen met maxima bij 255 en 295 nm niet van elkaar te scheiden. De piek bij 295 nm was echter in de eerste frakties het hoogst; wellicht heeft deze verbinding een wat lager molecuulgewicht dan de verbinding met $\lambda_{\max} = 255$ nm.

Op de 1 $\rightarrow$ 10-verdunning van fraktie 26 werden de zes reeds genoemde reacties uitgevoerd. De oplossingen werden niet verder uitverdund, doch rechtstreeks gemeten. Beide frakties bleken gevoelig voor loog, misschien ook voor glycolaldehyde, doch niet voor de andere reagentia.

Deze zes reacties werden tenslotte nog verricht op fraktie 40. Hier bleek een grote gevoeligheid voor zuur aanwezig; de UV-absorptie verdween bijna geheel, terwijl een roserode verkleuring ontstond. Ten opzichte van glycolaldehyde, formaldehyde, aminoethanol en loog werd geen reactie gekonstateerd.

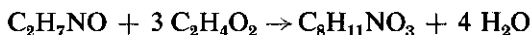
De frakties 48 t.e.m. 53 zijn niet verder onderzocht.

De component met $\lambda_{\max} = 296$ nm had onze bijzondere aandacht, omdat een dergelijke verbinding reeds eerder is beschreven (PETIT, 1957, 1959; naar dit onderzoek wordt verwezen in het overzichtsartikel van REYNOLDS (1963)). Petit isoleerde deze verbinding uit een reaktiemengsel van glucose en glycine, na elutie over een kationenwisselaar. Het electronenspectrum is bijna gelijk aan het door ons gevonden spectrum, zie figuur 27. De stof is oplosbaar in ether, waarbij het maximum verschuift naar 289 nm. Dit was bij onze verbinding eveneens het geval. De rode verkleuring met zuur werd ook door Petit waargenomen. Dit alles deed bij ons de gedachte postvatten dat beide verbindingen zo niet identiek, dan toch in elk geval zeer nauw verwant aan elkaar moeten zijn. Deze overeenkomst is des te interessanter, omdat Petit van andere verbindingen uitging.

Een punt van verschil is de stabiliteit. Na vriesdrogen van de verenigde frakties 39 en 41 t.e.m. 44 trad in het in de kolf achtergebleven materiaal geen verbruining op; Petit vermeldt echter dat de stof, volgens hem een tweebasisch zuur, als zodanig snel verkleurt, doch wel een stabiel calciumzout bezit. Voor de brutoformule van dit calciumzout wordt $C_{11}H_{13}O_8NCa$ (gebaseerd op een elementairanalyse) opgegeven. Petit was niet in staat, de structuur van deze verbinding op te helderen, doch geeft nog als verdere kenmerken: neerslag met DNPH, dus carbonylverbinding (overigens ontleedt de verbinding gedurende deze behandeling); per molecuul 1 OH-groep aanwezig; geen afbraak met HJO_4 , dus carbonylgroep en hydroxylgroep niet naast elkaar. De stof is, volgens Petit, waarschijnlijk dezelfde als een in 1952 door CHICHESTER c.s. geïsoleerde verbinding, uit een dergelijk reaktiemengsel.

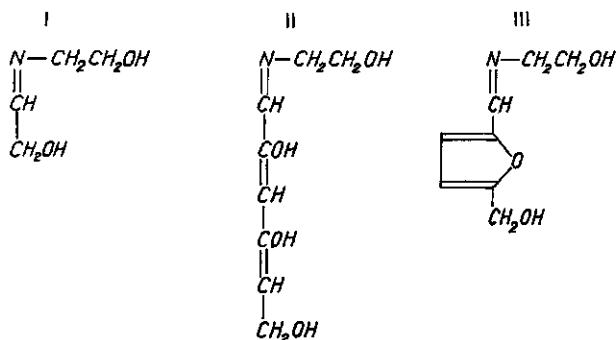
Van het door ons geïsoleerde materiaal werd een massaspectrum opgenomen, waarbij een molecuulgewicht van 169 werd gevonden. De bruto formule blijkt $C_8H_{11}NO_3$ te zijn (berekend 169,07388; gevonden 169,07365). *Dit houdt in dat 1 molecuul aminoethanol heeft gereageerd met 3 moleculen glycolaldehyde, en dat*

daarbij 4 moleculen water zijn afgesplitst:



Hiervan uitgaande, komen we tot het volgende reactiemechanisme:

1 molecuul aminoethanol reageert in eerste instantie met 1 molecuul glycolaldehyde tot de Schiffse base (I). Via twee aldolcondensaties wordt achtereenvolgens een tweede en een derde molecuul glycolaldehyde opgenomen, waarbij een drievoudig onverzadigde verbinding ontstaat (II). Vermoedelijk is deze verbinding, zoals alle Schiffse basen met geconjugeerde dubbele bindingen in de aldehyderest, uitermate reaktief; zij zal dus gemakkelijk polymeriseren. Er bestaat echter ook een mogelijkheid tot afsplitsing van een molecuul water, waarbij een wat meer stabiele verbinding ontstaat, hoogstwaarschijnlijk een furaan-derivaat (III).

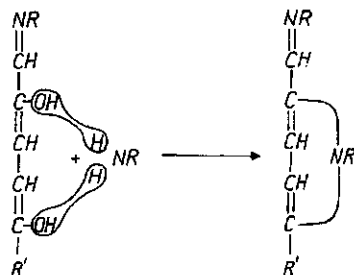


Deze verbinding is echter niets anders dan de Schiffse base van aminoethanol en hydroxymethylfurfural (HMF). De kleurreactie met zuur zal daarom wel op een soortgelijk mechanisme berusten als de Stenhouse-reactie op furfural (AESCHLIMANN c.s., 1958).

Ook de door ons geïsoleerde verbinding gaf een neerslag met DNPH. Het is onjuist, te beweren dat daarmee een carbonylgroep is aangetoond; ook Schiffse basen kunnen een neerslag met DNPH geven, identiek aan dat van de overeenkomstige carbonylverbinding. Dit is evenwel hier niet het geval. Het op de zink-carbonaatkolom onderzochte neerslag bevatte hoogstens een spoor HMF-hydrazon; het grootste gedeelte bestond uit twee derivaten die als vaalblauwe banden op de kolom te zien waren. Hoogstwaarschijnlijk waren dit osazonen. – Het gedrag van de door ons geïsoleerde verbinding tegenover het DNPH-reagens is niet verwonderlijk indien we bedenken dat deze stof in zuur milieu ontleedt.

De verbinding, die door Petit is geïsoleerd, moet de Schiffse base van glycine en HMF zijn. Hierdoor zijn haar zure eigenschappen (en daarmee haar instabiliteit) verklaard. De konstatering, dat het hier om een tweebasisch zuur gaat, moet op een misverstand berusten. Ook de opgegeven bruto formule kan niet juist zijn.

De bruiningsreactie tussen aminogroepen en glycolaldehyde is hiermee in grote lijnen begrijpelijk geworden. In tegenstelling tot glycolaldehyde zelf, aldoliseren de Schiffse basen van deze stof zeer gemakkelijk met andere moleculen glycolaldehyde, waarbij uiterst reactieve moleculen zullen ontstaan. Bij polymerisatie van deze moleculen spelen de OH-groepen misschien ook een rol. In elk geval geven deze OH-groepen een mogelijkheid tot condensatie met nieuwe aminogroepen. Het is zelfs goed denkbaar dat een aminogroep condenseert met twee OH-groepen uit hetzelfde molecuul, en dat pyrrolkernen ontstaan:



Deze pyrrolkernen hebben we inderdaad kunnen aantonen, en wel als volgt:

1 ml 6,1 % w/v ethanolamine (pH = 5,0) werd voorzien van 2 mgmol glycolaldehyde, waarna het mengsel 48 uur bij $50^\circ \pm 1^\circ$ werd weggezet. Daarna werd 500 mg zinkstof toegevoegd en het geheel in een puntkolfje voorzichtig drooggedampt. Vervolgens werd het kolfje in een zandbad op 250° verhit, terwijl stikstof werd doorgeleid. De dampen werden opgevangen in een mengsel van ethanol en water (1:1), dat werd gekoeld in een bad met ijswater.

Aan 5 ml van deze vloeistof werd, na beëindiging der destillatie, 0,25 ml van een 1 %-ige oplossing van p-dimethylaminobenzaldehyde in ethanol toegevoegd en vervolgens nog 3 ml 25 % zoutzuur. Er trad direkt een zeer duidelijke karmijnrode verkleuring op, die karakteristiek is voor pyrrol (en enkele pyrrolderivaten).

Blijkens het in 5.4.1.1 beschreven onderzoek kan deze vorming van pyrrolkernen echter geen kwantitatief belangrijke reactie zijn: dan had de aanwezigheid van pyrrolkernen zich in de IR- en NMR-spectra gemanifesteerd.

Wel is het duidelijk dat verbindingen, die uit glycolaldehyde en een amine ontstaan, zich op allerlei manieren met elkaar en met de oorspronkelijke reactiepartners kunnen verbinden, waarbij een chaotisch mengsel van verwante doch niettemin ongelijke macromoleculen zal ontstaan. De pieken die we in het UV-spectrum waarnemen zijn vermoedelijk afkomstig van vrij goed definieerbare verbindingen (zoals het door ons geïsoleerde furaanderivaat), die door een soort 'stopreactie' van verdere deelname aan de (co)polymerisatie zijn uitgesloten.

Het is de vraag of identificatie van de andere door ons waargenomen pieken veel nieuwe gezichtspunten met zich zal meebrengen. Over de rol van bijvoorbeeld de vele OH-groepen kan men wellicht snellere informatie verkrijgen door verbruinende systemen te bestuderen, waarin glycolaldehyde is vervangen door acetaldehyde of crotonaldehyde. Dit onderzoek voert echter buiten het kader van deze studie.

Tot besluit moet er nog op worden gewezen, dat de bruining van glycolaldehyde met aminoverbindingen zeer verwant blijkt te zijn aan de reactie van glucose met deze verbindingen. De wijze waarop SONG en CHICHESTER (1966) de bruiningsreactie tussen glucose en glycine trachten te verklaren, nl. door soortgelijke moleculen als hier beschreven als tussenstadia aan te nemen, kunnen we dan ook onderschrijven. Bij de verdere bestudering van de Maillardreactie zou glycolaldehyde een belangrijke hulpstof kunnen zijn.

5.4.2. *Onderzoek naar de reacties tussen aminogroepen en methylglyoxaal*

De bruiningsreactie tussen methylglyoxaal en glycine is reeds door ENDERS (1943) uitvoerig bestudeerd. Deze onderzoeker, die van mening was dat methylglyoxaal bij de vorming van humuszuren een belangrijke rol speelt, liet methylglyoxaal en glycine in verschillende verhoudingen met elkaar reageren en onderzocht daarna de elementaire samenstelling der gevormde melanoidinen. Het bleek dat deze samenstelling sterk van genoemde verhouding afhing, zoals uit de volgende cijfers blijkt:

percentage methylglyoxaal in de oplossing	percentage glycine in de oplossing	samenstelling melanoidinen		
		%C	%H	%N
3	30	50,04	6,30	11,39
16,5	16,5	60,25	5,0	6,30
30	3	62,49	4,79	1,78

ENDERS en SIGURDSSON (1943) namen aan, dat aldolcondensaties een grote rol spelen bij deze bruiningsreacties. De bruining kan huns inziens niet worden verklaard door aan te nemen dat er pyrrolkernen ontstaan.

Illustratief was een herhaling van de experimenten, die onder 5.4.1.2 voor glycolaldehyde-glycinemengsels zijn beschreven, doch nu met methylglyoxaal-glycinemengsels zijn uitgevoerd. De resultaten van deze experimenten zijn samengevat in de tabellen XIX t.e.m. XXI en grafisch uitgezet in de figuren 28 t.e.m. 30.

TABEL XIX. Verband tussen de bruining van methylglyoxaal-glycinemengsels en een wisselende verhouding van beide componenten.

x ml 0,1 M methylglyoxaal; 10 - x ml 0,1 M glycine; pH = 6,3. Behandeld zoals in de tekst beschreven; verdund naar 500 ml en gemeten bij 400 en 500 nm.

x	E ₄₀₀	E ₅₀₀
2	0,210	0,070
4	0,440	0,145
5	0,539	0,175
6	0,635	0,210
6,5	0,627	0,200
7	0,619	0,194
8	0,590	0,174
10	0,112	0,028

TABEL XX. Verband tussen de bruining van methylglyoxaal-glycinemengsels en een toenevende overmaat methylglyoxaal.

1 ml 0,1 M glycine; x ml 0,1 M methylglyoxaal; pH = 6,3. Behandeld zoals in de tekst beschreven; verdund naar 500 ml en gemeten bij 400 en 500 nm.

x	E ₄₀₀	E ₅₀₀
1	0,051	0,019
2	0,117	0,036
3	0,168	0,048
4	0,240	0,072
5	0,289	0,085
10	0,388	0,102

TABEL XXI. Verband tussen de bruining van methylglyoxaal-glycinemengsels en een overmaat glycine.

2 ml 0,1 M methylglyoxaal; x ml 0,1 M glycine; pH = 6,3. Behandeld zoals in de tekst beschreven; verdund naar 250 ml en gemeten bij 400 en 500 nm.

x	E ₄₀₀	E ₅₀₀
1	0,276	0,096
2	0,318	0,108
4	0,356	0,114
6	0,392	0,136
10	0,424	0,142
20	0,396	0,122

Een grote overmaat methylglyoxaal blijkt de kleur sterker te bevorderen dan een grote overmaat glycolaldehyde in het glycolaldehyde-glycinesysteem. Dit blijkt niet alleen uit figuur 29 maar ook zeer duidelijk uit figuur 28, waar de rechterzijden der curven een opvallend 'bol' verloop hebben. Het effect van een grote overmaat glycine is, evenals in het glycolaldehyde-glycinesysteem, nihil.

Figuur 28 vertoont de maximale extinctie niet bij een 2:1-verhouding der reaktiepartners, zoals in het vorige geval. (Methylglyoxaal is, in tegenstelling tot glycolaldehyde, in waterige oplossingen in hoofdzaak als monomeer aanwezig). Dat we geen 1:1-verhouding vinden zal wel hiermee samenhangen dat glycine zich uitermate gemakkelijk met meerdere moleculen methylglyoxaal verbindt. Op grond van het onderzoek van de reactie van glycolaldehyde met aminogroepen nemen we voorlopig – met Enders en Sigurdsson – aan dat dit wel via aldolcondensaties zal geschieden.

Een mengsel v. 1 mgmol methylglyoxaal, 1 mgmol glycine en 1 ml water, dat 18 uur bij $24^{\circ} \pm 1^{\circ}$ heeft gestaan, vertoonde, na verdunning tot 250 ml, twee duidelijke en ongeveer even hoge pieken in het ultraviolet, en wel bij 268 en 330 nm (figuur 31). Een mengsel van equimoleculaire hoeveelheden methylglyoxaal en aminoethanol vertoont bij pH = 5,0 een zeer sterke bruining; na 2500-voudige verdunning zijn weer twee pieken in het UV waar te nemen, nu echter bij 262 en 328 nm. Bovendien is de piek bij 328 nm hier duidelijk hoger. – Ook het UV-spectrum van dit mengsel is in figuur 31 opgenomen.

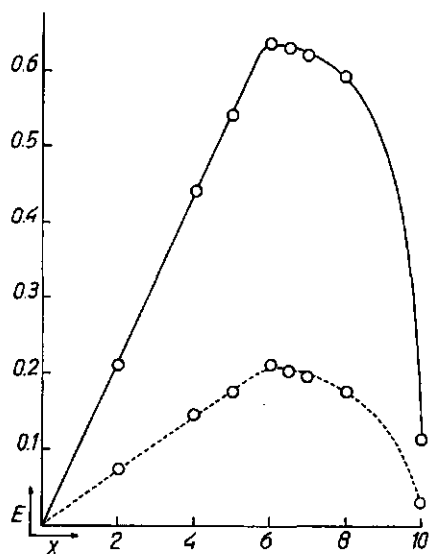


FIG. 28. Verloop van de extinctie bij 400 (—) en 500 (---) nm in reaktiemengsels van x ml 0,1 M methylglyoxaal en (10-x) ml 0,1 M glycine.

Ongetwijfeld zal, met behulp van gelfiltratie en massaspectrometrie, ook hier een en ander over het reactiemechanisme kunnen worden opgehelderd.

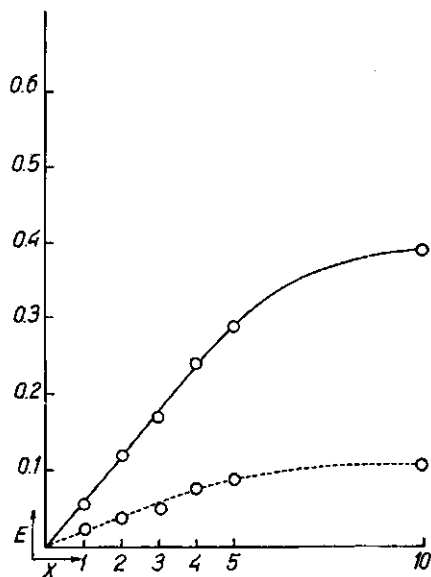


FIG. 29. Verloop van de extinctie bij 400 (—) en 500 (---) nm in reaktiemengsels van 1 ml 0,1 M glycine en x ml 0,1 M methylglyoxaal.

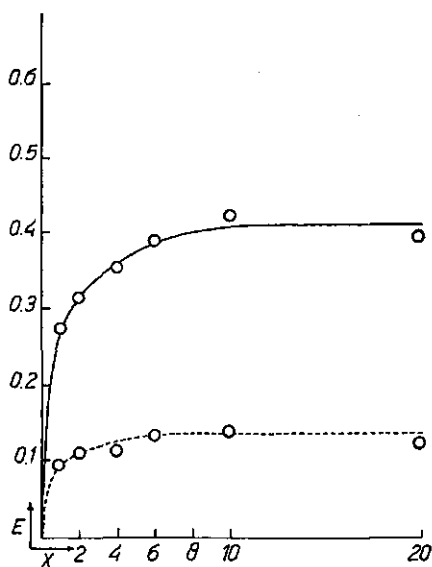


FIG. 30. Verloop van de extinctie bij 400 (—) en 500 (---) nm in reaktiemengsels van 2 ml 0,1 M methylglyoxaal en x ml 0,1 M glycine.

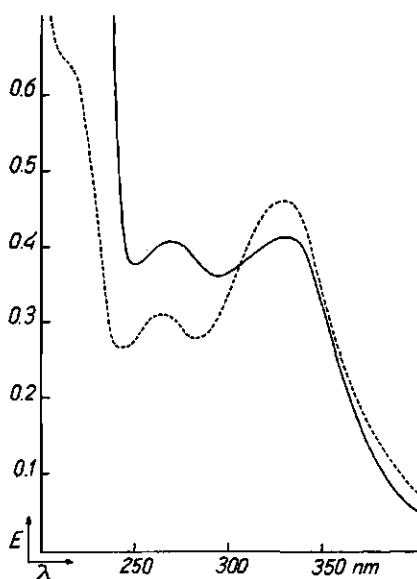
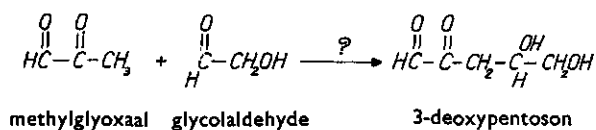


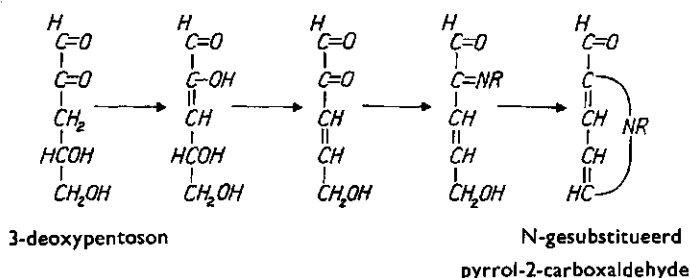
FIG. 31. Extinctiecurven van mengsels van 1 mgmol methylglyoxaal, 1 mgmol glycine (—) resp. aminoethanol (- - -) en 1 ml water, na 18 resp. 24 uur bij $24^{\circ} \pm 1^{\circ}$. Verdunningsfaktor: voor het mengsel met glycine 250; voor het mengsel met aminoethanol 2500.

5.4.3. Onderzoek naar de reactie tussen aminogroepen, methylglyoxaal en glycolaldehyde

Onder 5.1.4 is een experiment beschreven, waaruit blijkt dat een mengsel van glycolaldehyde en methylglyoxaal sterker bruint met glycine dan men, op grond van de bruiningen der afzonderlijke componenten, zou verwachten. We hebben getracht, dit verschijnsel te verklaren door aan te nemen, dat glycolaldehyde en methylglyoxaal samen reageren tot een verbinding die het vermogen tot bruining in sterkere mate bezit dan de afzonderlijke stoffen. Een voor de hand liggende mogelijkheid is het ontstaan van een 3-deoxyoson via een aldoliseringsreactie:



Dergelijke verbindingen zijn reeds door WOLFROM c.s. (1948) en later door ANET (1960, 1961, 1962) beschreven als tussenprodukten bij de vorming van furfural of hydroxymethylfurfural uit koolhydraten. KATO (1960, 1962, 1963) is van mening, dat de 3-deoxyosonen zelf belangrijke tussenverbindingen zijn bij de bruining van suikers met aminen. Dit zou geschieden via een ringsluiting, waarbij een N-gesubstitueerd pyrrolaldehyde ontstaat:



KATO beschrijft (1967) hoe N-methylpyrrolaldehyde kan worden geïsoleerd (als DNP-hydrazon) uit een mengsel van xylose en methylamine. Een geconcentreerde oplossing van equimoleculaire hoeveelheden van deze stoffen wordt gedurende 4 uur bij pH = 6,0 op 65° verwarmd, of gedurende 1 uur bij pH = 6,5 op 100°, waarna het reaktiemengsel wordt geëxtraheerd met petroleumether (kpt. 40°–60°). Het extract wordt onder verminderde druk geconcentreerd, verdund met ethanol en behandeld met zwavelzure DNPH, waarna het ontstane neerslag wordt omgekristalliseerd uit ethylacetaat. De verkregen zwarte naaldjes blijken te bestaan uit het hydrazon van N-methylpyrrol-2-carboxaldehyde.

We hebben deze procedure (1 uur op 100° bij pH = 6,5) herhaald met een mengsel van equimoleculaire hoeveelheden methylglyoxaal, glycolaldehyde en methylamine. Het uitschudden met petroleumether werd achterwege gelaten; in plaats daarvan werd direct zwavelzure DNPH bij het reaktiemengsel gevoegd, waarna de neergeslagen osazonen op de zinkcarbonaatkolom werden gescheiden. We vonden hier, behalve bruine produkten die bovenin de kolom geadsorbeerd bleven, slechts de osazonen van glycolaldehyde en methylglyoxaal, en twee vage banden van onbekende hydrazonen. De UV-spectra van deze hydrazonen weken echter zeer sterk af van het door Kato gepubliceerde UV-spectrum van het derivaat van N-methylpyrrol-2-carboxaldehyde. De gepostuleerde theorie blijkt dus onwaarschijnlijk.

Overigens dient nog te worden vermeld dat het ons evenmin lukte, het pyrrol-derivaat als DNP-hydrazon te isoleren uit een reaktiemengsel van xylose en methylamine, noch door rechtstreekse precipitatie met DNPH, noch via de door Kato beschreven extractie met petroleumether. Wel werden in beide gevallen aanzienlijke hoeveelheden furfuralhydrazon verkregen. Deze verbinding werd in het reaktiemengsel van methylglyoxaal, glycolaldehyde en methylamine niet gevonden.

5.5. SLOTOPMERKING

Hoewel de belangrijke rol van glycolaldehyde en methylglyoxaal in de bruining van rookwater met aminoverbindingen wel is komen vast te staan, is toch ook gebleken dat niet de volledige bruining door de aanwezigheid van deze stoffen kan worden verklaard en ook andere stoffen, die op zichzelf wellicht

een lage bruiningspotentiaal ten opzichte van deze aminogroepen bezitten, hierbij een rol kunnen spelen. Voor formaldehyde is dat duidelijk aangetoond. Over de rol van min of meer complexe verbindingen, die reeds in de rook door condensatiereacties zijn ontstaan, tasten we nog in het duister. Deze verbindingen zullen zich in hoofdzaak in de disperse fase van rook bevinden. Het is daarom zinvol, deze studie te besluiten met een onderzoek naar de rol van de disperse fase bij de kleurvorming. Dit onderzoek komt in hoofdstuk 6 aan de orde.

6. MOGELIJKHEDEN VOOR DE BESTUDERING VAN DE ROL DER DISPERSE FASE BIJ DE KLEURVORMING

6.1. POGING TOT AFSCHEIDING VAN DE DISPERSE FASE UIT ROOK

De disperse fase van het rookaerosol bestaat uit zeer kleine deeltjes, waarvan de straal varieert van 0,05 tot 8 μ (WOSKRESIENSKIJ, 1958). Uiteraard bevat hout-rook ook wel grotere (stof- en roet-) deeltjes, doch deze kunnen als verontreiniging worden beschouwd.

Volgens Woskresienskij zijn de disperse partikeltjes misschien opgebouwd uit een harde kern, die elektrisch geladen is door uit de atmosfeer geabsorbeerde ionen. Om deze kern bevindt zich een vloeistoffilm, die ook ionen kan bevatten. Indien deze deeltjes zich snel verplaatsen, wordt de vloeistoffilm vervormd en ontstaat een dipool.

FOSTER (1957, 1959b, c, 1960) heeft veel onderzoek verricht omtrent de grootte van de disperse deeltjes. Uitgaande van optische metingen kwam hij tot de konklusie dat de gemiddelde straal van de rookdeeltjes tussen 0,1 en 0,2 μ ligt. Er viel zelfs een exakte waarde van 0,148 μ te berekenen (1959b).

Nu is de praktische betekenis van zo'n exakt getal natuurlijk gering, ook al omdat de gemiddelde deeltjesgrootte van geval tot geval zal verschillen; bovendien blijkt de deeltjesgrootte toe te nemen bij veroudering van het rookaerosol. (Eenvoudige praktijkwaarnemingen leren reeds, dat dit aerosol niet zeer stabiel is en na enige tijd desintegreert). Niettemin is op deze wijze aangetoond dat we met een zeer fijn dispers aerosol te maken hebben.

Foster heeft ook nog de grootte van de deeltjes bepaald door ze in een elektrisch veld op te laden en vervolgens de wederzijdse afstotingskrachten te meten (1959c). Op deze wijze werden waarden voor de gemiddelde straal gevonden die ongeveer 70% lager waren dan de langs optische weg gevonden getallen. Hier van uitgaande kan worden berekend dat bijna 75% van het totale gewicht van de disperse fase zou worden gevormd door deeltjes met een straal, kleiner dan 0,05 μ (FOSTER, 1959).

Door verscheidene onderzoekers kon de disperse fase uit rook worden afgescheiden met behulp van een elektrostatisch filter (FOSTER en SIMPSON, 1961a, b; SIKORSKI, 1962a; PORTER, BRATZLER en PEARSON, 1965). Men kan zich afvragen, of op deze wijze in de rook niet veel meer veranderingen plaatsvinden dan alleen het verdwijnen van de disperse fase.

Reeds PETTET en LANE wijzen er op dat veranderingen in de gasfase, onder invloed van een elektrisch veld, niet onwaarschijnlijk zijn. Zij brengen hierbij in herinnering, dat elektrostatische methoden zijn toegepast om koolwaterstoffen tot polymerisatie te brengen. SIKORSKI (1962a) vond, dat een elektrisch veld inderdaad veranderingen in rook kan teweegbrengen. De aard van deze veranderingen was zeer merkwaardig: hij vond een duidelijke toename van het gehalte aan fenolen en carbonylverbindingen en een wat minder grote toename van het gehalte aan zuren. Porter c.s., die een wat minder sterk elektrisch veld aanlegden,

vonden dergelijke toenames niet; ook uit de experimenten van Foster en Simpson blijkt dit effect nergens.

Toch kan men zich blijven afvragen of het elektrostatisch verwijderen van de disperse fase een in alle opzichten betrouwbare techniek is voor het bestuderen van het aandeel van deze fase in de kleurvorming. Het heeft daarom zin, na te gaan of andere wijzen van afscheiding ook voor dit doel kunnen worden gebezigd.

Zulke andere afscheidingsmethoden zijn b.v. het leiden van rook door cyclonen of door teerfilters. In cyclonen worden echter alleen de allergrootste deeltjes weggevangen, terwijl gasfilters een ontoelaatbaar hoge druk in de rookleiding opbouwen. Aldus SIMPSON en FOSTER (1962), die beide wijzen van afscheiding dan ook onbruikbaar achten.

Dat cyclonen alleen de allergrootste deeltjes wegvangen lijkt intussen enigszins in strijd met de waarneming dat alle ventilatoren, die in rookinstallaties zijn ingebouwd, grote hoeveelheden teer uit de rook kunnen afscheiden. Het idee, de disperse fase uit rook te verwijderen door middel van een centrifugale kracht, liet ons daarom niet los en kreeg een nieuwe stimulans door de *cyclonet-tegel*, een stofafscheider die een aantal jaren geleden door het Bureau van Tongeren N.V. te Heemstede is ontwikkeld. Deze tegel is o.m. beschreven door JOCHEMS (1968). Uit zijn beschrijving citeren we: 'De stofafscheider bestaat in principe uit een groot aantal parallel geschakelde wervelkamers die uitgespaard zijn in een tegel, waardoor zij in een relatief klein volume ondergebracht zijn. (...) Met deze tegels kan een gaswasser worden opgebouwd. De te zuiveren gasen worden van boven door de tegels geleid, die eveneens van bovenaf besproeid worden. De gasen en de wasvloeistof (meestal water) passeren in gelijkstroom de wervelkamers, waarbij grote centrifugaalkrachten optreden. Hierdoor ontstaat aan de wand een vloeistoffilm waarin het uitgeslingerde stof terecht komt. Het gevangen stof verlaat de wervelkamer in de vloeistofdruppels. Door de ontwerpers wordt opgegeven dat in de wervelkamers een centrifugaalkracht van 15.000 tot 40.000 maal de zwaartekracht wordt toegepast.' – Ter vergelijking vermeldt de auteur, dat in een goede stofcycloon versnellingen van ongeveer 200 g worden bereikt.

Van deze cyclonettenplaat koesterden we de verwachting dat hij in staat zou zijn, ook kleinere deeltjes uit de disperse fase te verwijderen. De toepassing van een wasvloeistof is evenwel ongewenst, omdat dan ook rookcomponenten uit de gasfase zullen worden verwijderd. De noodzaak van een wasvloeistof is echter ook minder klemmend dan bij het verwijderen van stof, omdat de weggeslingerde deeltjes een kleverige laag langs de wanden van de cyclonetten tegel zullen vormen, waarin nieuwe deeltjes worden vastgehouden.

De door ons gebruikte cyclonettenplaat is weergegeven in figuur 32. De afmetingen van de tegel zijn $160 \times 170 \times 49$ mm. De inlaat van elke wervelkamer is 5×5 mm; de cyclonettediameter is 12 mm. De tegel is van keramisch materiaal vervaardigd.

Volgens Ir. H. van der Kolk van het Bureau van Tongeren voldoet de tegel aan hoge eisen, indien hierover een drukverschil van 325 mm waterkolom wordt

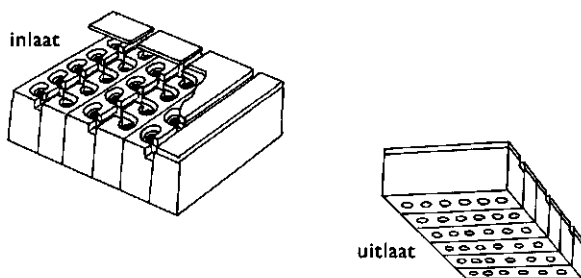


FIG. 32. Cyclonettentegel. Links bovenaanzicht, rechts onderaanzicht.

aangebracht. Men kan berekenen dat dan – bij een temperatuur van 20° – ruim 50 l lucht per seconde door de tegel stroomt. Bij hogere temperaturen is een iets lagere druk voldoende om dezelfde luchtsnelheid te bereiken; we besloten echter, voor alle proeven het drukverschil van 325 mm waterkolom aan te houden.

Voor het nemen van onze experimenten werd de installatie gebouwd, die schematisch in figuur 33 is weergegeven. De rook werd betrokken van de in 1.4.2.1 beschreven 'klassieke' rookontwikkelaar. Via een pijp met regelklep komt deze rook in een compartiment waar de cyclonettentegel in horizontale stand is opgesteld. Deze tegel kan op eenvoudige wijze uit de opstelling worden verwijderd en vervangen door een aluminium plaatje met hetzelfde oppervlak en dezelfde luchtweerstand. (Door enkele gaten in de plaat te boren, en deze gaten steeds iets te verwijden tot het drukverval over deze plaat gelijk was aan dat over de tegel, kon deze eigenschap worden verkregen).

De teer, die door de tegel is afgescheiden, wordt verzameld in een opvangvat. De rook komt, via een trechtervormige pijp, in een kleine ruimte (40 cm lang, 35 cm hoog en breed), waarin enige voorwerpen en eventueel ook enkele kleine vissen kunnen worden gerookt. Via een met een klep voorziene pijp wordt de rook door een hogedrukventilator (fabrikant: Aerotherm, Weesp; type HDN 1/5) weggezogen en vervolgens afgevoerd.

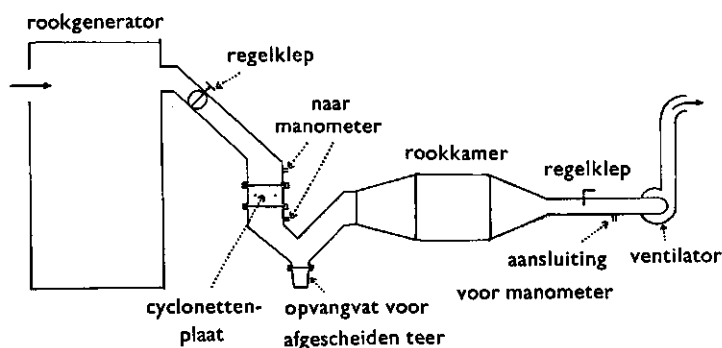


FIG. 33. Opstelling voor de bestudering van het effect van een cyclonettentegel op de fysische samenstelling van houtrook.

Reeds direkt bleek dat de cyclonettentegel wel veel teer kon afscheiden, doch bepaald niet alle zichtbare rook verwijderde. Nu werd dit ook nauwelijks verwacht, maar wel merkwaardig was, dat de ventilator eveneens een aanzienlijke hoeveelheid teer afscheidde. Ook in het gedeelte van de installatie tussen tegel en ventilator werd reeds na een uur roken een lichte teeraanslag waargenomen.

Juist van de zeer kleine deeltjes, die de tegel passeren, zou men echter verwachten dat zij in hoofdzaak aan Brownse bewegingen zijn onderworpen en weinig invloed ondervinden van een centrifugaalveld dat zwakker is dan dat in de cyclonetten, om van de zwaartekracht niet te spreken. In de korte tijd, die de rook nodig heeft om de afstand van de tegel naar de ventilator af te leggen, kan van veroudering van het aerosol natuurlijk ook nauwelijks sprake zijn.

Indien evenwel de disperse deeltjes door hun snelle beweging worden vervormd, zoals Woskresienski veronderstelde, bestaat de mogelijkheid dat de ontstane dipolen het coaguleren van de deeltjes tot grotere aggregaten in sterke mate zullen bevorderen. De grote deeltjes, ontstaan uit materiaal dat de tegel kon passeren, kunnen dan door de ventilator uit de rook worden geslingerd of neerslaan op de wanden van de installatie.

Voor verder onderzoek moest een maat worden gevonden, waarin het effect van de cyclonettentegel op de rook kon worden vastgelegd. Het bleek onmogelijk, zelfs maar een ruwe schatting te maken van de hoeveelheid disperse fase, die werd afgescheiden. Het afgescheiden materiaal bestond uit een taaie, donkere massa, die uiterst langzaam naar omlaag droop en pas na geruime tijd het opvangvat bereikte.

Beter voldeed een bepaling van het gewicht van de deeltjes die op een bepaald oppervlak in de rookkamer neersloegen. We gebruikten hiervoor weer het in 3.2 beschreven model, waarin nu een stuk aluminium folie werd geklemd. Op deze wijze wordt een oppervlak van 25 cm^2 aan de rook blootgesteld. De folie wordt voor en na het rookproces gewogen.

Met behulp van de beschreven installatie werd nu tweemaal een uur gerookt, waarbij ernaar werd gestreefd, de condities zoveel mogelijk gelijk te laten zijn. In het ene geval werd de cyclonettentegel in het rookkanaal geplaatst, in het andere geval de aluminium plaat. Na afloop bleek, dat bij de proef met de tegel $0,9 \text{ mg}$ materiaal op de folie was neergeslagen en bij de proef met de aluminium plaat $1,2 \text{ mg}$; een onbelangrijk verschil dus.

Voorts namen wij waar, dat ook door de aluminium plaat een hoeveelheid teer uit de rook werd verwijderd. Dit bracht ons er toe, een proef uit te voeren waarbij noch de cyclonettentegel, noch de aluminium plaat in het rookkanaal aanwezig was, maar waar het drukverval over de rookinstallatie werd ingesteld met behulp van de regelklep bij de ventilator. Bij deze proef werd slechts een half uur gerookt, teneinde een al te grote vervuiling van de ventilator te vermijden. De hoeveelheid neerslag op 25 cm^2 folie bedroeg nu $5,4 \text{ mg}$.

We konkluderen dat de aanwezigheid van een obstakel, loodrecht op de richting van de rook, meer teer doet verdwijnen dan de cyclonettenplaat als zodanig (afgezien van het feit dus, dat ook deze tegel een loodrecht op de rookrichting geplaatst obstakel is). Vermoedelijk zijn de teerdeeltjes zeer gevoelig voor

botsingen tegen obstakels. Het is trouwens bekend, dat in scherpe bochten van rookkanalen zeer gemakkelijk teerafzetting plaatsvindt. Naast hetgeen is gezegd over de vervorming van rookdeeltjes en het ontstaan van dipolen, moet dit effect worden genoemd als een plausibele verklaring voor de teeraanslag in de rookkamer en vooral in de ventilator.

Inmiddels is wel duidelijk, dat de cyclonettentegel ongeschikt is als hulpmiddel voor de bestudering van het effect der disperse fase van rook bij het roken van levensmiddelen. Slechts die afscheider is bruikbaar, die inderdaad alle deeltjes, tot de kleinste toe, verwijderd.

We kunnen ons echter moeilijk voorstellen dat een dergelijke afscheider voor de bestudering van een bestaand rookproces kan worden gebruikt zonder dat ingrijpende veranderingen optreden. (Hierbij moet ook worden gedacht aan fysische veranderingen, zoals een grotere rooksnelheid, waardoor de te roken produkten sneller zullen uitdrogen). Dit deed ons omzien naar een totaal andere methode voor het bestuderen van de rol der disperse fase bij de kleurvorming. Uitgangspunt hierbij was de gedachte dat niet in de rook zelf een scheiding moet worden doorgevoerd, maar dat de rook zodanig moet worden opgevangen dat het aandeel van beide fasen in de kleurvorming duidelijk wordt. Pogingen in deze richting worden hieronder besproken.

6.2. ANALYSE VAN NEERGESLAGEN ROOKDEELTJES. VERGELIJKING MET DE ANALYSE VAN DE TOTALE HOEVEELHEID OPGENOMEN ROOK

6.2.1. *Opvangen en analyseren van de disperse fase*

Van de hoeveelheid materiaal uit de disperse fase, die per oppervlakte-eenheid op een produkt wordt neergeslagen, kan een indruk worden verkregen door het reeds genoemde model met folie in de rookinstallatie te plaatsen.

Vers neergeslagen disperse deeltjes blijken zeer goed oplosbaar in methanol of ethanol. In een dergelijke oplossing zouden de hydroxy- en dicarbonylverbindingen, die ons met name interesseren, op de reeds beschreven wijze (neerslaan met DNPH, gevolgd door chromatografie van het neerslag op een zink-carbonaatkolom) kunnen worden bepaald.

Dit is als volgt onderzocht: 25 cm² aluminium folie werd gedurende een uur aan een heetrookproces in de hang blootgesteld, waarna het neerslag op de folie werd opgelost in 10 ml ethanol. Geen van de vier bekende hydroxy- en dicarbonylverbindingen konden worden gevonden: de karakteristieke blauwe banden werden niet gezien op de kolom. Wel waren een groot aantal vaalblauwe tot paarsbruine bandjes aanwezig, die zich zeer langzaam verplaatsten en waarschijnlijk aan derivaten van meer ingewikkelde moleculen moeten worden toegeschreven, zie 5.1.4.

De disperse deeltjes bevatten dus geen aantoonbare hoeveelheden glyoxaal, methylglyoxaal, glycolaldehyde of acetol op het moment dat zij in ethanol worden opgelost. Deze stoffen zullen wel aanwezig zijn geweest, maar of door reacties of door verdamping – waarschijnlijk door beide – zijn verdwenen. Daarbij moet in het midden worden gelaten of, en in hoeverre, deze processen

voor dan wel na het neerslaan op de aluminium folie hebben plaatsgevonden. Informatie hieromtrent is natuurlijk nuttig voor het verkrijgen van enig inzicht in de rol van deze deeltjes bij het totstandkomen van de kleur.

Daarom is nagegaan of deze informatie kon worden verkregen door de deeltjes te laten neerslaan op een Petrischaal, die met een laagje natriummetabisulfiet ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) was bedekt.

Dit laagje werd als volgt aangebracht: Een oplossing van 500 mg natriummetabisulfiet in enkele ml water werd in een Petrischaal gebracht en voorzichtig drooggedampt op een stoombad. De schaal werd nog een kwartier tot een half uur in een droogstoof bij 105° geplaatst, teneinde sporen water te verwijderen. Indien wordt gewerkt met ontvette schalen is het mogelijk, een zeer gelijkmatige sulfietlaag aan te brengen.

De oppervlakte van de door ons gebruikte Petrischalen bedroeg ten naastebij $62,5 \text{ cm}^2$; het oppervlak was dus twee en een half maal zo groot als dat van de stukken aluminium folie, welke steeds aan de rook werden blootgesteld. Deze folie was uiteraard niet geschikt om er een sulfietlaagje op aan te brengen.

Op een aldus behandelde schaal konden, na een uur roken in de hang tot een temperatuur van 80° , de volgende hoeveelheden hydroxy- en dicarbonylverbindingen worden gevonden:

Methylglyoxaal:	0,21 mg ($0,003 \text{ mg/cm}^2$);
Acetol:	1,48 mg ($0,024 \text{ mg/cm}^2$);
Glycolaldehyde:	5,65 mg ($0,090 \text{ mg/cm}^2$);
Glyoxaal:	niet gevonden

De onderlinge verhouding van de drie eerstgenoemde stoffen blijkt nu geheel anders te zijn dan in rookwater. Glycolaldehyde, de minst vluchtige van de drie, blijkt sterk te zijn vertegenwoordigd; van het tamelijk vluchtige methylglyoxaal is slechts een spoor aanwezig.

De mogelijkheid, dat de bisulfietlaag componenten uit de gasfase heeft geadsorbeerd, mag niet a priori worden uitgesloten, zie 6.4.

6.2.2. *Opvangen van rook met behulp van een vochtig eiwitoppervlak*

Voor het opvangen van de 'totale' rook ligt het voor de hand, de met water gevulde Petrischaal weer te gebruiken. Op deze wijze wordt echter, zoals in 4.1 is uiteengezet, meer van de disperse fase opgevangen dan bij het roken van vis of een ander levensmiddel het geval zou zijn.

Een beter beeld kan worden verkregen met een opvangmedium waarin de diffusiemogelijkheden beperkt zijn en waarin ook uitdrogingsverschijnselen optreden. Anderzijds moet het optreden van reacties natuurlijk worden voorkomen. Om aan deze – in wezen tegenstrijdige – eisen zoveel mogelijk tegemoet te komen, hebben we gebruik gemaakt van de in hoofdstuk 3 beschreven eiwitpasta's, waarbij nu 5% natriummetabisulfiet in de waterfase werd opgelost. Ook deze methode is evenwel niet geheel vrij van bedenkingen, omdat de kans bestaat dat door de aanwezigheid van sulfiet meer carbonylverbindingen zullen worden vastgehouden dan zonder sulfiet het geval zou zijn. Teneinde hierover enige infor-

matie te verkrijgen, hebben wij een Petrischaal met 20 ml water en een Petrischaal met 20 ml 5%-ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -oplossing aan hetzelfde rookproces blootgesteld (1 uur tot 80° in de hang), waarna in beide schalen het gehalte aan enkele hydroxy- en dicarbonylverbindingen werd bepaald. De volgende hoeveelheden werden gevonden (uitgedrukt in mg per 20 ml):

	zonder $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	met $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
Methylglyoxaal	11,4	13,2
Glyoxaal	1,1	0,6
Acetol	16,8	28,4
Glycolaldehyde	25,4	33,8
Formaldehyde (met chromotroopzuur)	7,2	23,8

Slechts het gehalte aan formaldehyde blijkt op spektakulaire wijze te zijn toenomen; bij de hydroxy- en dicarbonylverbindingen is de toename weliswaar duidelijk, maar worden toch geen getallen gevonden die in een geheel andere orde van grootte liggen. Bovengenoemde methode lijkt dus wel bruikbaar voor het verkrijgen van een indruk van de hoeveelheid osazonvormende hydroxy- en dicarbonylverbindingen, die tijdens het roken op een vochtig oppervlak terecht komen. Wel is het de vraag of het hier zin heeft om deze verbindingen afzonderlijk te bepalen. Voorlopig lijkt het voldoende, het totale gehalte aan deze verbindingen vast te leggen door precipitatie met DNPH bij 100° , het verkregen neerslag op te lossen in pyridine, de extinctie – na verdunning – bij 450 nm te meten en het resultaat als glycolaldehyde te berekenen.

Een formaldehydebepaling met chromotroopzuur lijkt niet zo veel zin te hebben.

6.2.3. *Vergelijking tussen ,droog' en ,nat' opgevangen rook*

Bij het onderzoek naar de rol van de disperse fase bij de kleurvorming zullen we slechts één analyse uitvoeren, en wel die van de totale hoeveelheid hydroxy- en dicarbonylverbindingen, uitgedrukt als glycolaldehyde. Eventuele monocarbonylhydrazonen zullen bij deze bepaling nauwelijks storen, omdat hun absorptie bij 450 nm gering is.

De uitvoering van deze bepaling is als volgt:

In eiwitpasta's: Het in figuur 13 afgebeelde model, zonder deksel, wordt gevuld met een pasta van 1 deel viseiwitconcentraat op 4 delen 5%-ige metabisulfietoplossing (eventueel kan van een andere verhouding worden uitgegaan), waarna het oppervlak met een plat voorwerp wordt gladgestreken. De laagdikte werd, na enige oriënterende experimenten, teruggebracht van 1,0 op 0,4 cm, door een perspex schijfje van 0,6 cm dik en met een diameter van 5,6 cm in de holte aan te brengen.

Hierna wordt de pasta aan de inwerking van rook blootgesteld, en vervolgens overgebracht in een maatkolf van 100 ml. Na aanvullen tot 100 ml en schudden wordt een gedeelte van de suspensie gefiltreerd over een blauwbandfilter. 1 ml van het filtraat wordt voorzien van 9 ml water en 10 ml DNPH-reagens, 20 minuten in een kokend waterbad geplaatst en daarna een half uur gekoeld in ijs-

water. Het ontstane neerslag wordt afgefiltreerd, gedroogd en opgelost in pyridine. Een gedeelte van deze oplossing wordt uitverdund tot een concentratie waarbij de E_{450} kan worden gemeten.

Op droge schalen met $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$: De inhoud van de onder 6.2.1 beschreven Petrischalen wordt na het rookproces opgelost in water en aangevuld tot 100 ml. 1 ml van de door filtratie van vuil en roetdeeltjes bevrijde oplossing wordt verder behandeld als boven beschreven.

De op deze wijze verzamelde gegevens dienen om een indruk te verkrijgen van het aandeel van de disperse fase in de totale hoeveelheid osazonvormende hydroxy- en dicarbonylverbindingen die worden opgenomen, doch het is allerm minst zeker of de bijdrage van de disperse fase tot de kleurvorming ook door deze verbindingen wordt veroorzaakt. Teneinde hierover enig inzicht te verkrijgen dient een test te worden ontworpen waarin het vermogen tot bruining van de neerslagen deeltjes duidelijk wordt.

6.3. ONDERZOEK NAAR DE BRUINING VAN DE DISPERSE FASE VAN ROOK

Indien geen absorptie uit de gasfase plaatsvindt, geeft de Petrischaal met bisulfiet in principe het zuiverste beeld van de samenstelling van de disperse fase op het moment dat de deeltjes het produkt bereiken. Door de aanwezigheid van de grote overmaat sulfiet, die niet langs simpele weg kan worden verwijderd, wordt echter elke bruiningstest onmogelijk.

Ook van een bruiningstest met bijvoorbeeld een alcoholische oplossing van de neergeslagen deeltjes mag niet worden verwacht dat hierdoor een zuiver beeld van de werkelijke bijdrage aan de bruining wordt gegeven: de samenstelling van de disperse fase verandert immers nog tijdens het rookproces.

Een andere mogelijkheid is het laten neerslaan van de disperse deeltjes op een Petrischaal waarin – op dezelfde wijze als voor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ beschreven – een laagje glycine is aangebracht. De actieve verbindingen zullen nu wel eerder met aminogroepen reageren dan met elkaar en ook minder neigen tot vervluchtiging. De werkelijkheid wordt op deze wijze beter benaderd.

De moeilijkheid bij deze handelwijze is evenwel, dat de reacties plaatsvinden bij zeer hoge concentraties van de reaktiepartners – een omstandigheid die de bruining sterk bevordert en bovendien zeer moeilijk reproduceerbaar is. Het ontbreekt ons ook aan een goede referentie.

Uiteindelijk kozen we toch voor een bruiningstest met een alcoholische oplossing van de neergeslagen deeltjes. Hierbij lieten we ons leiden door de gedachte dat het nu niet in de eerste plaats de bekende hydroxy- en dicarbonylverbindingen zijn die onze interesse moeten hebben – we beschikken immers al over een informatie hieromtrent – maar juist de meer ingewikkelde moleculen, die zich in de disperse fase ophopen.

Bij het bestuderen van deze alcoholische oplossingen interesseert ons niet alleen de bruining met aminogroepen, maar ook de kleur van de oplossing zelf en de verdieping van deze kleur indien de oplossing wordt verwarmd; er is namelijk dikwijls beweerd dat de kleur op gerookte produkten het rechtstreekse ge-

volg is van de eigen kleur der neergeslagen teerdeeltjes.

Voor het onderzoek naar de bruining met aminogroepen kan glycine niet worden gebruikt vanwege de slechte oplosbaarheid van deze stof in methanol of ethanol. Daarom werkten we met een oplossing van aminoethanol, die met azijnzuur was geneutraliseerd. De sterkte van deze oplossing bedroeg 1 M. De bruiningstest werd uitgevoerd, door aan 1 ml van de oplossing der neergeslagen deeltjes 1 ml aminoethanoloplossing toe te voegen en het mengsel vervolgens gedurende een bepaalde tijd aan de terugvloeiakoeler te koken. Na uitverdunnen met ethanol konden de extincties bij 400 en 500 nm worden gemeten.

Het volgende experiment geeft een indruk van de snelheid, waarmee de bruine kleur zich ontwikkelt:

Een stuk aluminium folie met een oppervlakte van ongeveer 250 cm² werd gedurende 1 uur gerookt in de hang (temperatuur oplopend tot 80°). Op 25 cm² van deze folie bleek 20,6 mg materiaal te zijn neergeslagen. Het neerslag op 250 cm² folie werd opgelost in 100 ml ethanol, waarna de oplossing werd gefiltreerd.

Op het filtraat werd de beschreven bruiningstest een aantal malen uitgevoerd, waarbij we de kooktijd varieerden. Daarnaast werd een serie experimenten verricht waarin de aminoethanoloplossing was vervangen door ethanol. De verkregen waarden zijn samengevat in tabel XXII. Duidelijk blijkt, dat ook hier de aanwezigheid van aminogroepen van belang is voor de kleurvorming. De eigen kleur van de teeroplossing vormt echter een belangrijke bijdrage.

Vervolgens werd een 0,1 %-ige oplossing van glycolaldehyde in ethanol op dezelfde wijze onderzocht, zie tabel XXIII. Het verloop van de bruining met de tijd is hier enigszins anders. Merkwaardig is de tendens tot afname, die vooral bij de E₄₀₀-waarden optreedt indien langdurig wordt gekookt. Voor dit verschijnsel, dat we niet eerder waarnamen, ontbreekt nog een verklaring.

Dat de bruining met de disperse fase anders verloopt dan met glycolaldehyde blijkt ook uit een proefje, waarin we een hoeveelheid van de alcoholische oplossing van neergeslagen disperse deeltjes (reeds enige malen als 'teeroplossing' aangeduid en verder ook zo te omschrijven) kookten met wat aminoethylcellulose.

TABEL XXII. Verband tussen de bruining van een oplossing van de disperse fase van rook -met en zonder aminogroepen- en de reaktietijd.
Reaktiemengsels verdund tot 10 ml; in deze oplossingen gemeten.

Reaktietijd	Aminogroepen aanwezig		Aminogroepen afwezig	
	E ₄₀₀	E ₅₀₀	E ₄₀₀	E ₅₀₀
Direkt na menging	0,259	0,085	0,202	0,054
1/4 uur	0,448	0,121	0,240	0,074
1/2 uur	0,498	0,123	0,225	0,064
1 uur	0,523	0,121	0,219	0,062
2 uur	0,538	0,131	0,238	0,066
3 uur	0,541	0,136	0,225	0,064

TABEL XXIII. Verband tussen de bruining van een oplossing van 0,1 % glycolaldehyde in ethanol met aminoethanol en de reaktietijd.
Reaktiemengsels verdund tot 10 ml en in deze oplossingen gemeten. Experiment twee maal uitgevoerd.

Reaktietijd	E ₄₀₀		E ₅₀₀	
1/4 uur	0,885		0,201	
1/2 uur	0,875	0,905	0,220	0,203
1 uur	0,783	0,865	0,221	0,200
2 uur	0,825	0,678	0,268	0,202
3 uur	0,721	0,685	0,212	0,195

Het AEC verkreeg hierbij een okergele kleur (Reinhold 3B6); indien AEC wordt gekookt met oplossingen van glycolaldehyde of methylglyoxaal ontstaat een bruine kleur (met rookwater bijvoorbeeld 6E8).

De kleur van de teeroplossing zelf verandert vrij weinig tijdens het koken met AEC. Dit suggereert, dat het niet de gekleurde verbindingen zijn die met aminogroepen reageren. Duidelijker nog blijkt dit uit een experiment met tweemaal vier stukjes worstdarm (Naturin, Cutisin, papiervezeldarm en cellofaandarm; zie 3.3). Deze stukjes darm, elk 25 cm² groot, werden gedurende een uur in de hang gerookt. Daarna werd één stukje van elke darmsoort gedurende een aantal uren in 25 ml ethanol gelegd. De ethanol werd vervolgens gefiltreerd en de extinctie bij 400 en 500 nm gemeten. De andere vier stukjes werden een etmaal bij kamertemperatuur bewaard en daarna aan dezelfde behandeling onderworpen.

Tabel XXIV geeft een overzicht van de gevonden waarden. Er blijken geen duidelijke verschillen op te treden.

Ondanks de verschillen in bruining tussen een teeroplossing en een glycolaldehydeoplossing willen we de bruining met glycolaldehyde toch als vergelijking gebruiken. Daarom is nog nagegaan hoe de bruining met glycolaldehyde in deze test afhangt van de concentratie van deze verbinding. Op grond van de in het vorige experiment opgedane ervaring werd de kooktijd op $\frac{1}{2}$ uur gesteld; de gevonden waarden zijn vermeld in tabel XXV.

TABEL XXIV. 'Wassen' van gerookte worstdarmen met ethanol

	Direkt met ethanol behandeld		Na een etmaal met ethanol behandeld	
	E ₄₀₀	E ₅₀₀	E ₄₀₀	E ₅₀₀
Naturin	0,224	0,060	0,184	0,039
Cutisin	0,244	0,044	0,259	0,048
Papiervezeldarm	0,281	0,071	0,252	0,052
Cellofaandarm	0,269	0,065	0,234	0,047

TABEL XXV. Verband tussen de bruining van alcoholische oplossingen van glycolaldehyde met ethanolamine en de concentratie aan glycolaldehyde.
Reaktietijd 1/2 uur; gevonden waarden omgerekend naar een volume van 10 ml.

Concentratie	E ₄₀₀	E ₅₀₀
0,05 %	0,441	0,105
0,1 %	0,875	0,220
0,2 %	1,35	0,348
0,5 %	3,00	0,890

6.4. ONDERZOEK NAAR DE ROL VAN DE DISPERSE FASE BIJ HET ROKEN IN VERSCHILLENDE ROOKINSTALLATIES

6.4.1. *Heet roken in de hang*

Bij het roken in een hang, de klassieke wijze van roken dus, komt de vis in aanraking met 'verse', d.w.z. zojuist ontwikkelde rook. Deze rook zal rijker zijn aan disperse deeltjes dan rook, die via een aanvoerleiding en een ventilator naar een rooktunnel of -kast wordt geleid, en onderweg een gedeelte van de disperse deeltjes verliest. Indien deze deeltjes bijdragen tot de kleurvorming, moet hun bijdrage in de traditionele hang het duidelijkst waarneembaar zijn. Vandaar dat het heet roken in de hang in de eerste plaats onze aandacht heeft.

Er werd nu tweemaal een uur gerookt in de hang; gedurende de tweede proef werd stoom in de kast geleid met behulp van de bij de installatie behorende stoomgenerator.

De volgende modellen werden aan de rook blootgesteld:

- drie perspex blokken zonder deksel, gevuld met eiwitpasta's die resp. 20, 25 en 30% eiwit bevatten.
 - twee perspex blokken met deksel, waartussen een stuk aluminium folie is geklemd;
 - een Petrischaal met op de bodem een laagje $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.
- Daarna werd bepaald:
- het gewichtsverlies van de eiwitpasta's gedurende het roken;
 - de hoeveelheid osazonvormende hydroxy- en dicarbonylverbindingen in de eiwitpasta's en op de Petrischaal;
 - de hoeveelheid neerslag op de stukjes aluminium folie;
 - de bruining van een oplossing van dit neerslag. Uitgevoerd zoals onder 6.3 beschreven (kooktijd 2 uur); reaktiemengsels alle verdund tot 10 ml.

De resultaten zijn beschreven in tabel XXVI. Deze geven het volgende beeld te zien:

Tussen de hoeveelheden hydroxy- en dicarbonylverbindingen (glycolaldehyde) in de eiwitpasta's en het eiwitpercentage in deze pasta's bestaat geen rechtstreeks verband. Indien we de 20%-pasta vergelijken met een magere vis en de 30%-pasta met een matig voorgedroogde vis, komen we tot de konklusie dat dit voordrogen de opname van rookbestanddelen niet merkbaar zal beïnvloeden, althans niet wanneer er geen grote verschillen bestaan tussen het vochtgehalte

TABEL XXVI. Analyseresultaten van twee in de hang genomen rookproeven

	Zonder stoom	Met stoom
Gewichtsverlies in		
20%-pasta	36%	7%
25%-pasta	30%	2%
30%-pasta	25%	2%
„Glycolaldehyde“ in		
20%-pasta	52,4 mg	39,0 mg
25%-pasta	55,3 mg	36,3 mg
30%-pasta	46,6 mg	47,5 mg
op bisulfiet-schaal	2,15 mg	7,25 mg
Id. per cm ² oppervlak		
20%-pasta	2,10 mg	1,56 mg
25%-pasta	2,21 mg	1,45 mg
30%-pasta	1,86 mg	1,90 mg
bisulfiet-schaal	0,035 mg	0,116 mg
Gewicht neerslag op aluminiumfolie	12,5 mg	9,7 mg
Id. per cm ² oppervlak	0,50 mg	0,39 mg
Bruining met aminoethanol		
E ₄₀₀	0,360	0,281
E ₅₀₀	0,095	0,069
Bruining zonder aminoethanol		
E ₄₀₀	0,195	0,125
E ₅₀₀	0,068	0,046
Eigen kleur teeroplossing (1→10 verdund)		
E ₄₀₀	0,156	0,073
E ₅₀₀	0,044	0,020

aan het visoppervlak en het vochtgehalte binnenin. De mate, waarin vocht naar de oppervlakte kan diffunderen, zal hierbij een belangrijke rol spelen.

Deze konklusie slaat niet op huidoppervlakken. De huid immers bestaat uit andere eiwitten (collagenen), die sneller uitdrogen en bij dezelfde relatieve vochtigheid een lager vochtgehalte bezitten dan spiereiwitten. COOPER en NOEL (1966) geven hierover uitvoerige informatie, waarin bovendien nog het zoutgehalte van de vis wordt betrokken.

Verder blijkt dat de hoeveelheid carbonylverbindingen, die op de schaal met bisulfiet wordt gevonden, slechts een fraktie bedraagt van de gemiddelde hoeveelheden in de eiwitpasta's (2 resp. 7%).

De bruiningen van de beide teeroplossingen komen ruwweg overeen met glycolaldehydeoplossingen van 0,04 resp. 0,03 %, hetgeen kan worden omgerekend op een neerslag van 0,16 resp. 0,12 mg glycolaldehyde per cm². Bij de proef met „natte“ rook komt dit overeen met de hoeveelheid die we op de bisulfiet-schaal vonden; bij de proef met „droge“ rook is het werkelijke gehalte aan glycolaldehyde veel lager.

In de kleurvorming door de disperse fase van de „droge“ rook is het aandeel van de ons bekende verbindingen dus zeer bescheiden.

Op grond van de gevonden waarden moet het onwaarschijnlijk worden geacht, dat de schalen met bisulfiet carbonylverbindingen uit de gasfase hebben geadsorbeerd.

Uitgaande van de hoeveelheden bruinend materiaal in de deeltjesfase, die we hebben omgerekend op glycolaldehyde, zou het aandeel van de disperse fase in de potentiële kleurvorming bij beide experimenten op ongeveer 8% kunnen worden geschat. Hierbij moet evenwel worden bedacht dat, door de toevoeging van $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ aan de eiwitpasta's, hierin te hoge waarden worden gevonden en dat het aandeel van de disperse fase in werkelijkheid wat groter zal zijn. Bij de kleuring van huideiwitten is dit aandeel zeker nog groter.

Verder kan worden gekonstateerd dat de bijdrage van de eigen kleur der disperse deeltjes ook hier niet moet worden verwaarloosd.

Merkwaardig is tenslotte nog, dat de verhouding tussen de hoeveelheden neergeslagen materiaal en de bruining van dit materiaal in beide gevallen vrijwel dezelfde is. Het effect van het inleiden van stoom is trouwens toch veel minder groot dan we hadden verwacht.

6.4.2. Koud roken in de tunnel

Een koudrookproces in de tunnel ($2\frac{1}{2}$ uur roken, waarbij de temperatuur tot 28° opliep) werd op dezelfde wijze bestudeerd als onder 6.4.1 beschreven, met dien verstande dat alleen een 25%-ige eiwitpasta is onderzocht. De resultaten van dit experiment zijn samengevat in tabel XXVII.

Bij deze resultaten valt allereerst op, dat de bisulfiet-schaal hier wel een aanzienlijke hoeveelheid materiaal uit de gasfase moet hebben geadsorbeerd: de gevonden hoeveelheid 'glycolaldehyde' per cm^2 schaaloppervlak is enkele malen groter dan het gewicht van het neergeslagen materiaal per cm^2 . Dit analyse-materiaal is dus niet bruikbaar.

De door de eiwitpasta opgenomen hoeveelheid hydroxy- en dicarbonylverbin-

TABEL XXVII. Analyseresultaten van een in de tunnel genomen rookproef

Gewichtsverlies in eiwitpasta	19%
'Glycolaldehyde' in pasta	48,1 mg
id. per cm^2 opp.	1,90 mg
'Glycolaldehyde' op bisulfiet-schaal	26,1 mg
id. per cm^2 opp.	0,42 mg
Gewicht neerslag op aluminium folie	3,2 mg
id. per cm^2 opp.	0,12 mg
Bruining met aminoethanol	
E_{400}	0,107
E_{500}	0,028
Bruining zonder aminoethanol	
E_{400}	0,033
E_{500}	0,017
Eigen kleur teeroplossing (1→10 verdund)	
E_{400}	0,018
E_{500}	0,005

dingen is vergelijkbaar met die uit de vorige experimenten; op de aluminium folie is echter veel minder neergeslagen (zoals trouwens ook werd verwacht). De door de disperse fase veroorzaakte bruining is eveneens veel geringer. Op grond van onze informatie kan echter nog niet worden gezegd dat deze bijdrage in de praktijk geen rol speelt.

De specifieke bruining van de disperse fase is iets hoger dan in de beide vorige proeven.

6.4.3. Koud roken in een geconditioneerde rookkast

De Atmos-rookkast van het C.I.V.O. – reeds in 4.3.2 ter sprake gekomen – verschaft ons de mogelijkheid, de invloed van een hoog vochtgehalte nauwkeuriger te bestuderen dan in de hang mogelijk is. We hebben twee proeven uitgevoerd (temperatuur 27°; rooktijd 2 uur), waarbij de relatieve vochtigheid in de eerste proef 50% en in de tweede proef 85% bedroeg.

Tabel XXVIII geeft een overzicht van de resultaten. Het algemene beeld wijkt niet veel af van de resultaten, die uit de proef met onze tunnel werden verkregen. Een verhoging van de relatieve vochtigheid leidt niet tot een duidelijke verandering in de rookopname door de eiwitpasta. Het gewichtsverschil op de aluminium folie is, gezien de kleine hoeveelheid, nauwelijks significant. Tussen de resultaten van de bruiningstest is dan ook weinig verschil te zien.

De schaal met bisulfiet gaat bij een hoge relatieve vochtigheid aanzienlijk meer materiaal uit de gasfase adsorberen.

TABEL XXVIII. Analyseresultaten van twee rookproeven in de geconditioneerde rookkast van het C.I.V.O.

	I	II
Relatieve vochtigheid	50%	85%
Gewichtsverlies in eiwitpasta	21%	8%
„Glycolaldehyde” in pasta	28,2 mg	25,8 mg
id. per cm ² opp.	1,13 mg	1,03 mg
„Glycolaldehyde” op bisulfiet-schaal	12,6 mg	32,5 mg
id. per cm ² opp.	0,20 mg	0,52 mg
Gewicht neerslag op aluminium folie	1,7 mg	1,1 mg
id. per cm ² opp.	0,07 mg	0,04 mg
Bruining met aminoethanol		
E ₄₀₀	0,071	0,072
E ₅₀₀	0,019	0,022
Bruining zonder aminoethanol		
E ₅₀₀	0,036	0,029
E ₄₀₀	0,018	0,017
Eigen kleur teeroplossing (onverdund)		
E ₄₀₀	0,128	0,112
E ₅₀₀	0,052	0,055

6.5. SLOTOPMERKINGEN

Aangezien blijkt dat de disperse fase in de hang merkbaar kan bijdragen tot de kleurvorming op gerookte produkten, moet worden gekonkludeerd dat de theorie van Foster en Simpson niet zonder meer op deze situatie mag worden toegepast. Dit is niet verwonderlijk als men bedenkt dat Foster en Simpson hun experimenten uitvoerden met een 'Torry-kiln', waarin de condities anders zijn dan in onze hang. Het is duidelijk, dat de vraag of de bewuste theorie geldig is voor de kleurvorming op gerookte produkten, niet zonder meer met ja of neen kan worden beantwoord, maar afhangt van de gebruikte rookinstallatie. Zo is ook te verklaren waarom Poolse onderzoekers wél een verschil vonden tussen de kleur van normaal gerookte en van in de gasfase gerookte vis.

De hier beschreven modellen lijken mogelijkheden te bezitten voor de bestudering van het aandeel van de disperse fase van rook bij de kleurvorming. Het onderzoek is niet verder gekomen dan een beginstadium en wil dan ook niets meer pretenderen dan het aanwijzen van enkele mogelijkheden voor een verdere bestudering van de rol der beide fasen van rook bij de totstandkoming van gerookte produkten.

Wat deze modellen betreft moet nog worden opgemerkt, dat de opvangmethode via eiwitpasta's enige verbetering behoeft: er moet worden gezocht naar andere stoffen die de reacties tussen opgenomen rookstoffen verhinderen zonder dat de opname toeneemt.

De waarde van de schaal met bisulfiet is beperkt door het risico van gasadsorptie. Daar evenwel blijkt, dat eenvoudige hydroxy- en dicarbonylverbindingen geen grote rol spelen bij de bruining, door de disperse fase veroorzaakt, is de vraag naar een dergelijke schaal wat minder urgent geworden.

Tenslotte zij nog opgemerkt dat, behalve chemisch onderzoek, ook een verdere benadering van de fysische zijde zeer gewenst is.

7. SAMENVATTING

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek behandelt de kleurvorming op eiwithoudende levensmiddelen, zoals vis, als gevolg van de inwerking van houtrook. Het sluit hiermee aan op het door Ziembra te Gdańsk gedane onderzoek, doch is wat meer toegespitst op de chemische aspecten van deze kleurvorming.

Hoofdstuk 1 geeft een globaal overzicht van de gebruikelijke wijzen van roken en van de pogingen, het rookproces efficiënter te laten verlopen. Gesteld wordt, dat modernisering van het rookproces een gewijzigd en daardoor wellicht minder acceptabel produkt tengevolge kan hebben. Het is daarom nodig, de achtergronden van het klassieke proces goed te kennen, zodat men weet welke eisen aan een rookinstallatie, met betrekking tot het produkt, moeten worden gesteld.

Hoofdstuk 2 behandelt het onderzoek dat men tot nu toe heeft verricht met de bedoeling, deze achtergronden te verduidelijken. Achtereenvolgens worden behandeld: onderzoek naar aroma en smaak van gerookte produkten, verhoging der houdbaarheid als gevolg van de microbicide eigenschappen van rook, vertraging van oxidatief vetbederf en de kleurvorming op gerookte produkten. Het blijkt, dat nog vele problemen niet zijn opgehelderd. In het bijzonder is dat het geval met het ontstaan van de typische „rook”kleur, reden waarom aan een onderzoek in deze richting prioriteit werd gegeven.

Het oriënterend onderzoek wordt in hoofdstuk 3 beschreven. Met behulp van een eenvoudig model kon de invloed van diffusie van rookbestanddelen in het produkt en de invloed van oppervlakteuitdroging op de kleurvorming worden aangetoond. In overeenstemming met de resultaten van Ziembra werd gevonden, dat eiwitten zeer belangrijk zijn bij de kleurvorming. De kleur blijkt tot stand te komen via de vrije aminogroepen der eiwitten. Guanidinogroepen spelen hierbij geen merkbare rol.

Het aandeel van de rook werd onderzocht door een aantal van water voorziene Petrischalen in de rookinstallatie te plaatsen en de inhoud na afloop van het rookproces te onderzoeken. In het aan de rook blootgestelde water bleken aanzienlijke hoeveelheden osazonvormende hydroxy- en dicarbonylverbindingen aanwezig. In een vergelijkend onderzoek kon worden vastgesteld dat een aantal van deze hydroxy- en dicarbonylverbindingen een zeer sterke neiging tot verbruining met aminogroepen bezit.

In hoofdstuk 4 is een kwantitatieve bepaling van deze hydroxy- en dicarbonylverbindingen uitgewerkt. Door gerookt water bij 0° met 2,4-dinitrofenylhydrazine te behandelen worden α -dicarbonylverbindingen, zoals glyoxaal en methylglyoxaal, kwantitatief neergeslagen. α -Hydroxycarbonylverbindingen blijven in oplossing, en kunnen, na verwijdering van het reeds gevormde neerslag, worden geprecipiteerd als hun osazonen, door de oplossing te verwarmen. Op deze wijze konden glycolaldehyde en glyoxaal, en ook acetol en methylglyoxaal, naast elkaar worden bepaald. De methode bleek evenwel niet geschikt voor een kwantitatieve bepaling van acetoïne en diacetyl naast elkaar.

In de gevormde neerslagen konden de afzonderlijke componenten van elkaar worden gescheiden door chromatografie over een zinkcarbonaatkolom met benzeen/pyridine/ethanol 5:5:2 als elutievloeistof, waarna spectrofotometrische bepaling volgde.

In hoofdstuk 4 wordt verder beschreven hoe het totale carbonylgehalte gravimetrisch met behulp van 2,4-dinitrofenylhydrazine werd bepaald. Door een gedeelte van dit neerslag aan een chromatografische scheiding te onderwerpen konden de dubbelzijdig gesubstitueerde α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen worden bepaald; het gevonden gehalte werd berekend als diacetyl.

Uitvoerig wordt stilgestaan bij de moeilijkheden, die bij de bepaling van formaldehyde werden ondervonden. Twee bruikbare bepalingen worden tenslotte beschreven: een chromatografische (na precipitatie met 2,4-dinitrofenylhydrazine) en een spectrofotometrische met chromotroopzuur.

Een bepaling van acetaldehyde in 'rookwater' met piperazine en natriumnitroprusside bleek onbruikbaar. Wel konden aceton en furfural langs eenvoudige weg worden bepaald (aceton via de kleurreactie met salicylaldehyde, furfural via de kleurreactie met anilineacetaat).

Aan de gebruikelijke bepalingen van fenolen in rookoplossingen en -condensaten werd een kritische bespreking gewijd. Gekozen werd voor de kleurreactie met 4-aminoantipyrine en kaliumferricyanide.

Teneinde een indruk te krijgen van het kwantitatieve aandeel van α -hydroxy- en α -dicarbonylverbindingen in de samenstelling van 'rookwater', werden alle genoemde bepalingen op een aantal rookwatermonsters uitgevoerd. Tevens werd de totale hoeveelheid zuur bepaald en een bruiningstest uitgevoerd.

De verbindingen glycolaldehyde, acetol en methylglyoxaal bleken steeds in aanzienlijke hoeveelheden aanwezig. Hun gehalte was vergelijkbaar met het gehalte aan formaldehyde of belangrijk hoger. De som van hun gehalten benaderde doorgaans de totale hoeveelheid titreerbaar zuur (berekend als azijnzuur).

Verdubbeling van de dikte van de waterlaag waarin de rook werd geabsorbeerd, gaf een lichte toename van de meeste rookcomponenten te zien. Deze toename was bij de fenolen wat groter dan bij de andere rookbestanddelen. Zeer sterk was de toename bij furfural.

De door ons verkregen rookoplossingen bleken bij kamertemperatuur redelijk stabiel. Slechts het gehalte aan methylglyoxaal verminderde duidelijk gedurende het bewaren.

Tot slot zijn de door ons gevonden waarden vergeleken met die van anderen. Door de zeer uiteenlopende omstandigheden waaronder door andere onderzoekers werd gewerkt, en die zowel het roken zelf als de opvang- en analysemethode betreffen, is deze vergelijking moeilijk.

In hoofdstuk 5 komt nader onderzoek naar de kleurvorming aan de orde. Van een aantal carbonylverbindingen en suikers werd bepaald in hoeverre zij de vrije aminogroepen van een eiwit irreversibel blokkeren, en in welke mate zij kleur ontwikkelen met glycine.

Glyoxaal, methylglyoxaal en glycolaldehyde blijken in beide opzichten opvallend reaktief. Ook formaldehyde bezit het vermogen om aminogroepen irre-

versibel te blokkeren in sterke mate, maar geeft op zich geen verkleuring met deze aminogroepen. Acetol en diacetyl blijken weinig reactief.

In 'rookwater' nemen de hoeveelheden methylglyoxaal en formaldehyde snel af na toevoeging van een aminoverbinding. In iets mindere mate is dit ook bij glycolaldehyde het geval. Het diacetylgehalte vertoont eveneens een sterke afname.

De bruining van een aantal monsters rookwater ten opzichte van glycine wordt vervolgens vergeleken met die van oplossingen, die dezelfde concentraties aan methylglyoxaal, glyoxaal, glycolaldehyde en formaldehyde bevatten. Deze oplossingen blijken steeds ongeveer 85 tot 90 procent van de met het overeenkomstige rookwater verkregen bruining te ontwikkelen. In een andere bruiningstest, waar de overmaat glycine veel kleiner was, waren de afwijkingen wat groter. Niettemin achten we de konklusie gerechtvaardigd, dat de aanwezigheid van bovengenoemde stoffen de bruiningsreactie van rook ten opzichte van aminogroepen inderdaad goeddeels verklaart.

Mengsels van deze stoffen blijken sterker te verbruinen dan oplossingen van de afzonderlijke componenten. De aanwezigheid van formaldehyde verdiept de bruining eveneens, ondanks het feit dat deze stof zelf geen verkleuring met aminogroepen te zien geeft.

Vele andere aminozuren en aminen vertonen de bruiningsreactie ook. De aanwezigheid van een NH_2 -groep behoeft evenwel niet altijd tot een duidelijke bruining te leiden.

Secundaire aminen, tertiaire aminen en amiden geven vrijwel geen of in het geheel geen bruiningsreactie met rookwater. Diaminoethaan daarentegen geeft een uitzonderlijk sterke reactie. Een tabel, waarin deze verbruiningen, bij een pH van 5,0, worden vergeleken met die van glycine, is in de beschouwing opgenomen.

Voorts is in dit hoofdstuk enige aandacht besteed aan de invloed van de luchtzuurstof op de kleurontwikkeling. Bij hydroxycarbonylverbindingen blijkt deze invloed enigermate te bestaan. Bij dicarbonylverbindingen is dit effect echter nauwelijks waarneembaar of zelfs negatief.

Als besluit van het onderzoek naar de achtergronden der kleurvorming werd gezocht naar reacties die aan de kleurvorming ten grondslag liggen. De mogelijkheid, dat pyrrolkernen hierbij een essentiële rol spelen – een vroeger door anderen geopperde veronderstelling – is uitvoerig onderzocht en tenslotte van de hand gewezen. Pyrrolkernen blijken echter wel aanwezig in de reactieprodukten.

Mengsels van glycolaldehyde en glycine geven een optimale kleurontwikkeling in de verhouding 2:1. Hieruit kan echter niet worden gekonkludeerd dat ook een 2:1-reactieprodukt ontstaat, daar deze optimale verhouding hoogstwaarschijnlijk wordt veroorzaakt door het feit dat glycolaldehyde in hoofdzaak als dimeer aanwezig is.

Glycolaldehyde en glycine kunnen in zeer wisselende verhoudingen met elkaar reageren, doch een grote overmaat van een der beide reactiepartners leidt niet meer tot verdere kleurverdieping.

Met behulp van gelfiltratie konden uit geconcentreerde oplossingen van gly-

colaldehyde en glycine of aminoethanol enkele reactieprodukten worden geïsoleerd. Een van deze reactieprodukten werd nader onderzocht en kon worden geïdentificeerd als de Schiffse base van hydroxymethylfurfural en aminoethanol. Dit doet vermoeden dat het bruiningsmechanisme berust op de vorming van een Schiffse base van glycolaldehyde met de betreffende aminoverbinding, waarna nieuwe moleculen glycolaldehyde via aldolcondensaties worden aangehecht. De zo ontstane verbindingen zullen zeer reactief zijn en snel tot onregelmatige macromoleculen polymeriseren of condenseren. Er kan evenwel ook een intramoleculaire condensatie plaatsvinden, waardoor bijvoorbeeld bovengenoemd furaanderivaat ontstaat. Daar deze verbinding redelijk stabiel is, moet hier van een 'stopreactie' worden gesproken.

Ook in mengsels van methylglyoxaal en aminoverbindingen kunnen, via UV-spectrografie, karakteristieke reactieprodukten worden aangetoond. Een overmaat van de carbonylverbinding leidt gemakkelijker tot kleurverdieping dan bij glycolaldehyde het geval was. Deze systemen werden niet nader onderzocht.

Verder zijn nog enkele experimenten beschreven met mengsels van glycolaldehyde, methylglyoxaal en een aminoverbinding.

De rol van de disperse fase van rook bij de kleurvorming – een rol waarover de meningen uiteenlopen – komt in hoofdstuk 6 aan de orde. Het bleek niet mogelijk, althans niet onder normale omstandigheden, de disperse fase met behulp van een z.g. cyclonettentegel volledig uit de rook te verwijderen. Elektrostatische filtratie werd niet toegepast vanwege de mogelijkheid dat chemische veranderingen zullen optreden indien de rook een sterk elektrisch veld passeert. Getracht werd, het effect van de disperse fase te onderzoeken door een aantal modellen aan de inwerking van rook bloot te stellen, waarmee resp. de neerslag van rookdeeltjes op een droog oppervlak en de rookopname aan een enigszins vochtig eiwitoppervlak kon worden nagegaan. Reacties op het gerookte oppervlak, waarin rookbestanddelen zouden zijn betrokken, werden tegengegaan door toevoeging van natriummetabisulfit.

Dit gedeelte van het onderzoek is niet in een stadium gekomen dat duidelijke konklusies konden worden getrokken. Wel zijn enkele suggesties voor verder onderzoek genoemd.

8. SUMMARY

This thesis deals with the formation of colour of protein-containing foods, such as fish, as caused by the interaction with wood smoke, more particularly a closer examination of some chemical aspects of the formation of smoke colour. As such, it can be considered an extension of previous work done by Ziembra.

Chapter 1 gives a broad survey of the usual smoking procedures and of the attempts to control the process more efficiently. Starting from the assumption that modernization of the smoke process could result into a modified and therefore possibly less acceptable product, it is necessary to acquire a thorough understanding of the details of the classical process in order to apprehend the requirements necessary for a smoke installation.

Chapter 2 describes the investigations, carried out up till now, aimed at elucidating the underlying problems. The following topics are mentioned: flavour and taste of smoked foods, enhancement of keeping quality as a consequence of the microbiocide properties of smoke, retardation of oxidative deterioration of fat, and formation of colour in smoked foods. It appears that many problems are left unexplained, more specifically the formation of the typical smoke colour; for this reason the attention was focussed upon this aspect.

A preliminary investigation is described in Chapter 3. With the help of a simple model, the influence of the diffusion of smoke constituents into the product and the effect of surface desiccation upon the colour formation could be demonstrated. In agreement with the results of Ziembra it was found that proteins are very important in producing the brown colour, for which the free amino group of the proteins is essential. Guanidino groups do not play a noticeable role.

The contribution of the smoke was investigated as follows: Petri dishes containing water were placed in the smoke house or kiln. Inspection of the liquid after the process revealed the presence of a considerable amount of osazone-forming α -hydroxycarbonyl- and α -dicarbonyl compounds. Comparative experiments proved that several carbonyl compounds of this type show a strong tendency to display browning reactions with amino groups.

In Chapter 4 a quantitative analysis of these α -hydroxycarbonyl and α -dicarbonyl compounds is described. Upon addition of 2,4-dinitrophenyl hydrazine to smoke-treated water at 0°C., the α -dicarbonyls are precipitated quantitatively. α -Hydroxycarbonyl compounds remain in solution and can be precipitated in the form of their osazones, after removal of the first formed osazones, by heating the filtrate. In this way, glycolic aldehyde and glyoxal, and also acetol and methyl glyoxal, could be determined together. The method fails for quantitative determination of acetoin and diacetyl together. Separation of the osazones can be accomplished by chromatography on a zinc carbonate column with benzene/pyridine/ethanol 5:5:2 as an eluens, followed by spectrophotometric determination.

Chapter 4 describes further the total carbonyl assay by gravimetric analysis of

the precipitated 2,4-dinitrophenyl hydrazine derivatives. Chromatographic separation of an aliquot of this precipitate enables the determination of α -hydroxycarbonyl and α -dicarbonyl compounds substituted at both ends. The percentages found were calculated as diacetyl.

The difficulties experienced in the determination of formaldehyde are discussed in detail. Two methods were found feasible and are described: chromatographically, after precipitation of the 2,4-dinitrophenylhydrazones, and spectrophotometrically with chromotropic acid.

It turned out that determination of acetaldehyde in smoke-treated water with piperazine and sodium nitroprusside is impracticable. Acetone and furfural, however, could be determined by simple methods (acetone by colour reaction with salicylic aldehyde, furfural by colour reaction with aniline acetate).

A critical survey is given of the usual methods for determination of phenols in smoke-solutions and -condensates; for this purpose the colour reaction with 4-aminoantipyrine was selected.

In order to obtain quantitative data on the relative amounts of α -hydroxycarbonyl and α -dicarbonyl compounds in smoke-treated water, all the above-mentioned analytical methods were carried out with a number of samples, together with the determination of total acid. A browning test was carried out as well.

In all cases the presence of appreciable amounts of glycolic aldehyde, acetol and methyl glyoxal could be ascertained, in proportions comparable with formaldehyde or considerably higher. In the majority of cases the total concentration of these three components nearly equals the total amount of titratable acid (calculated as acetic acid).

Upon doubling the depth of the smoke-absorbing water layer in the Petri dishes, a slight increase of the amount of smoke constituents was observed, particularly of the phenols. Furfural shows a large increase.

The aqueous solutions of smoke constituents as obtained in this manner display a moderate stability at room temperature with the exception of methyl glyoxal, the content of which decreases markedly upon standing.

Finally a comparison was made between our data and those of others.

Due to widely differing conditions, both with respect to smoking technique and methods of interception and analysis, a comparison proved to be very difficult.

Chapter 5 describes the formation of colour in greater detail. The capacity of a number of carbonyl compounds and sugars to block the free amino groups of proteins irreversibly, or to develop a brown colour with glycine, was investigated. A marked activity in both respects was established for glyoxal, methyl glyoxal and glycolic aldehyde. Formaldehyde, although notably capable of blocking amino groups irreversibly, does not cause discolouration with these amino groups. Acetol and diacetyl were almost inactive in this respect.

The concentration of methyl glyoxal, formaldehyde and diacetyl in smoke-treated water decreases rapidly upon addition of an amino compound. Glycolic aldehyde shows the same phenomenon, but to a slightly lesser degree.

Next, the browning capacity of various samples of smoke-treated water towards glycine was compared with that of equally concentrated solutions containing methyl glyoxal, glyoxal, glycolic aldehyde and formaldehyde. In all cases the colour intensity produced by the latter was approximately 85 to 90% of the corresponding smoke solutions. In another browning test, with a much smaller excess of glycine, the differences were somewhat larger. In spite of this, the conclusion seems justified that the browning of smoke with amino derivatives can be explained satisfactorily by the presence of the above-mentioned carbonyl compounds in smoke.

It was observed that mixtures of these carbonyl compounds engender a stronger discolouration than the components alone. This is true also if formaldehyde is added, although formaldehyde by itself does not cause browning.

It was shown that many other amino acids and amines exhibit the browning reaction, although the presence of an NH_2 group does not automatically imply a distinct colouration.

Secondary amines, tertiary amines and amides give hardly any or no browning with smoke-treated water. Diaminoethane, on the other hand, shows an exceptionally strong discolouration. A table summarizes the results obtained with these compounds and glycine at a pH of 5.0.

This chapter describes furthermore some experiments on the influence of air-oxygen on the formation of colour. In the case of hydroxycarbonyl compounds a small effect was detectable, but in the case of dicarbonyl compounds the effect was either very small or non-existent.

The work was concluded with an investigation of the chemical principles, that govern the browning reaction. The allegedly essential role of pyrrole derivatives in the process was scrutinized and finally rejected.

Mixtures of glycolic aldehyde and glycine in the ratio 2:1 produce optimal browning. This does not, however, justify the conclusion that they participate in the reaction in the same proportion since it is highly probable that this optimal ratio is caused by the fact that glycolic aldehyde is present mainly as a dimer.

Glycolic aldehyde and glycine can react in varying proportions, but a large excess of either of them does not lead to further intensification of the colour.

Several reaction products could be isolated from a concentrated solution of glycolic aldehyde and glycine or ethanolamine by means of gel filtration. One of these reaction products, upon further examination, was identified as the Schiff base of hydroxymethyl furfural and ethanolamine. Presumably therefore the mechanism of the browning reaction should be explained as the formation of a Schiff base of glycolic aldehyde with the amino compound in question, followed by successive aldol condensations with further molecules of glycolic aldehyde. The resulting – and conceivably very reactive – condensation products could react further, either by polycondensation to macromolecules, or by cyclisation to the above-mentioned furan derivative. Since this compound is relatively stable it can be considered as a final product.

By UV-spectrophotometry, the presence of characteristic reaction products could be demonstrated in mixtures of methyl glyoxal and amino compounds as

well. In this case, an excess of the carbonyl compound causes a more pronounced deepening of the colour than in the case of glycolic aldehyde. These systems were not investigated in more detail.

Finally some experiments are described with mixtures of glycolic aldehyde, methyl glyoxal and an amino compound.

A diversity of opinions exists as to the role of the disperse phase of smoke in the formation of colour. This subject is broached in chapter 6. It was found impossible, at least under normal conditions, to remove the disperse phase completely from the smoke. Electrostatic filtration was not applied since passage through a strong electric field might induce chemical conversions. In an attempt to investigate the role of the disperse phase, several models were exposed to the action of smoke in such a way that the precipitation of smoke particles on a dry surface and the absorption on a moist protein surface could be traced. Reactions on the smoked surface, which could involve smoke constituents, were suppressed by the addition of sodium metabisulfite.

This part of the work has not reached the stage where pertinent conclusions can be drawn; however, several suggestions for further work are given.

9. LITERATUUR

- ADAM, M., *Fleischwirtsch.* **12** (1960) 80–84
- AESCHLIMANN, F., P. O. BETHGE en J. H. EGGERS, *Z. anal. Chem.* **161** (1958) 324–345
- AKAMATSU, S. en T. WATANABE, *J. Biochem. (Tokio)* **49** (1961) 566–569
- ANET, E. F. L. J., *Austral. J. Chem.* **13** (1960) 396–403
- ANET, E. F. L. J., *ibid.* **14** (1961) 295–301
- ANET, E. F. L. J., *Chem. & Ind.* **1962**, 262
- ANON., *Western Fisheries* **44** (1952) 26–27
- ANON., *Food Engineering* **28** (1956a) (6) 65, 151
- ANON., *The National Provisioner* **134** (1956b) (21) 8–9
- AWE, W., *Pharmazeutische Zentralhalle* **90** (1951) 73–80
- BAILEY, E. J. en N. DUNGAL, *Brit. J. Cancer* **12** (1958) 348–350
- BALTAZZI, E. en L. KRIMEN, *Chem. Revs* **63** (1963) 511–556
- BARNES, H. M. en C. W. KAUFMAN, *Ind. Eng. Chem.* **39** (1947) 1167–1170
- BARRENSCHEEN, H. K. en K. BRAUN, *Biochem. Z.* **233** (1931) 296–304
- BEACHAM, H. H. en M. F. DULL, *Food Research* **16** (1951) 439–445
- BELITZ, H. D. en J. SCHORMÜLLER, 'Handbuch der Lebensmittelchemie', Berlin-Heidelberg-New York 1965. Bd I, 272, 274.
- BEM, Z. Z., *Acta Veterinaria (Beograd)* **16** (1966) 137–153
- BERNIER, C. L. en W. L. EVANS, *J. Am. Chem. Soc.* **60** (1938) 1381–1384
- BERRENS, L. en E. BLEUMINK, *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **85** (1966) 59–69
- BEU, H., *Centralblatt für Bakt.- u. Parasitenkunde* **8** (1890) 513–520, 545–553
- BLAND, D. E. en A. F. LOGAN, *Biochem. J.* **95**, 515–520 (1965)
- BLEUMINK, E., 'Isolering en chemische karakterisering van de atopische allergenen uit enkele voedingsmiddelen', Diss. Utrecht 1967, p. 98, 104–105
- BORGSTROM, G., 'Fish as Food', New York/London 1965, vol. 3, 673
- BRAMSNAES, F., *Konserves* **9** (1951) 19–21
- BRATZLER, L. J. en R. G. HARPER, *Proc. 14th European meeting of Meat Research Workers, Brno 1968*, 630–633
- BRICKER, C. E. en W. A. VAIL, *Anal. Chem.* **22** (1950) 720–722
- BROEK, C. J. H. VAN DEN, 'Onderzoek naar de bactericide werking van het palingroken', Diss. Utrecht 1948
- BURGESS, C. H. O., C. L. CUTTING, J. A. LOVERN en J. J. WATERMAN, 'Fish Handling and Processing', Edinburgh 1965, 83, 88, 95, 97, 101 (a)
- BURGESS, C. H. O. c.s., *ibid.* 1965, 80 (b)
- BURTON, H. S., D. J. MCWEENY en D. O. BILTCLIFFE, *Nature* **196** (1962a) 40–41
- BURTON, H. S., D. J. MCWEENY, P. N. PANDHI en D. O. BILTCLIFFE, *ibid.* **196** (1962b) 948–950
- BURTON, H. S., D. J. MCWEENY en D. O. BILTCLIFFE, *J. Sci. Fd Agric.* **14** (1963) 911–920
- BURTON, H. S. en D. J. MCWEENY, *Chem. & Ind.* **1964**, 462–463
- CARPENTER, K. J., *Biochem. J.* **77** (1960) 604–610
- CARSON, J. F., *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 4300–4302, 4337–4338
- CARSON, J. F. en H. S. OLCOTT, *ibid.* **76** (1954) 2257–2258
- CHICHESTER, C. O., F. H. STADTMAN en G. MACKINNEY, *ibid.* **74** (1952) 3418–3420
- COOPER, D. L. en T. C. NOEL, *J. Fish. Res. Bd. Canada* **23** (1966) 775–778
- CUTTING, C. L., *Chem. & Ind.* **1945**, 66–69
- CUTTING, C. L., 'Saving of Fish', London 1955, 288
- CUTTING, C. L., in 'Fish as Food', New York/London 1965, Vol. 3, 93
- DAUN, H., persoonlijke mededeling (1966)
- DEFLOOR, K., *Conserva* **15** (1967) 323–326
- DHONT, J. H. en G. J. C. DIJKMAN, *Laboratoriumvoorschrift C.I.V.O.* (1965)
- DIEMAIR, W. en F. SCHAMS, *Z. anal. Chem.* **189** (1962) 149–160
- DOERR, R. C., A. E. WASSERMANN en W. FIDDLER, *J. Agr. Food Chem.* **14** (1966) 662–665

- DOLEŽAL, B., *Průmysl Potravin* **9** (1958) 609–611
- DRAUDT, H. N., *Food Technology* **17** (1963) 1557–1562
- DUIN, H. VAN, 'Bijdrage tot de vloeistof-vloeistof verdelingschromatografie der alifaten', Diss. Amsterdam 1961, 102–109
- DUNGAL, N., *J. Am. Med. Ass.* **178** (1961) 789–798
- DVOŘÁK, Z. en I. VOGNAROVÁ, *J. Sci. Food Agric.* **16** (1965a) 305–312
- DVOŘÁK, Z. en I. VOGNAROVÁ, *Průmysl Potravin* **16** (1965b) 172–176
- EEGRIWE, E., *Z. anal. Chem.* **110** (1937) 22–25
- ELLIS, G. P., *Adv. Carbohydr. Chem.* **14** (1959) 63–134
- ENDERS, C., *Kolloid-Z.* **85** (1938a) 74–87
- ENDERS, C. en K. THEIS, *Brennstoff-Chemie* **19** (1938b) 360–365, 402–407, 439–449
- ENDERS, C., *Biochem. Z.* **312** (1942) 339–353
- ENDERS, C., *Biochem. Z.* **313** (1943a) 352–371
- ENDERS, C. en S. SIGURDSSON, *Ber.* **76** (1943b) 560–563
- F.A.O. Yearbook of Fishery Statistics **17** (1963) c/18–21, 63–65; **19** (1964) c/18–21, 64–66; **23** (1966) c/20–23, 66–68
- FEIGL, F., 'Spot tests in organic analysis', 6th Ed., Amsterdam 1960, 352–353
- FESSMANN, W., Ned. octrooiaanvr. 6608821 (1966)
- FIDDLER, W., R. C. DOERR, A. E. WASSERMANN en J. M. SALAY, *J. Agr. Food Chem.* **14** (1966) 662–665
- FILIPIC, V. J., J. C. UNDERWOOD en C. O. WILLITS, *J. Food Sci.* **30** (1965) 1008–1015
- FISCHER, F. G. en A. MARSCHALL, *Ber.* **64** (1931) 2825–2827
- FOLIN, O. en V. CIOCALTEU, *J. Biol. Chem.* **73** (1927) 627–650
- FOSTER, W. W., Diss. Aberdeen 1957
- FOSTER, W. W., *Food Manufacture* **34** (1959a) 56–61
- FOSTER, W. W., *Brit. J. Appl. Phys.* **10** (1959b) 206–213
- FOSTER, W. W., *ibid.* **10** (1959c) 416–420
- FOSTER, W. W., 'Aerodynamic capture of particles', Oxford 1960, 89–95
- FOSTER, W. W. en T. H. SIMPSON, *J. Sci. Food Agric.* **12** (1961a) 363–374
- FOSTER, W. W., T. H. SIMPSON en D. CAMPBELL, *ibid.* **12** (1961b) 635–644
- FRAENKEL-CONRAT, H., M. COOPER en H. S. OLCOTT, *J. Am. Chem. Soc.* **67** (1945) 950–954
- FRANCIS, W. en R. V. WHEELER, *J. Chem. Soc.* **127** (1925) 2236–2245
- GADDIS, A. M., R. ELLIS en G. T. CURRIE, *J. Food Sci.* **29** (1964) 6–15
- GIBBONS, N. E., D. ROSE en J. W. HOPKINS, *Food Technology* **8** (1954) 155–157
- GOOS, A. W., 'Wood Chemistry', 2nd Ed., New York 1952. Vol. 2, 826–851
- GROENEN, P. J., CIVO-rapport R 1999 (1965)
- GROENEN, P. J., persoonlijke mededeling (1966)
- GUINOT, H., *Compt. Rend. Agric. Fr.* **29** (1943) 230; ref. C. A. **38** (1944) 5983^a
- GUINOT, H., *Ind. Agric. Alim.* **67** (1950) no. 3/4
- GUSS, C. O., 'Contributions of browning research to ratio item stability', Chicago 1952, 26–29
- GUSTAVSSON, K. H., *J. Int. Soc. Leather Trades' Chemists* **24** (1940) 377; ref. J. Am. Leather Chemists' Association **36** (1941) 302
- GUSTAVSSON, K. H., *Svensk Kem. Tidsskr.* **59** (1947) 159; ref. *Adv. Protein Chem.* **5** (1949) 405
- HAAS, V. A., E. R. STADTMAN, F. H. STADTMAN en G. MACKINNEY, *J. Am. Chem. Soc.* **70** (1948) 3576–3579
- HALL, J. A. en R. D. NEDVIK, ref. bij M. A. JOSLYN, *Ind. Eng. Chem.* **33** (1941) 308–314
- HAMID, H. A., Diss. Univ. of Georgia 1964; Diss. Abstr. **25** (1964) 3509
- HAMID, H. A. en R. L. SAFFLE, *J. Food Sci.* **30** (1965) 697–701
- HAMID, H. A. en R. L. SAFFLE, *Food Technology* **20** (1966) 224–225
- HAMM, W. S. en W. A. RUST, *Comm. Fish. Rev.* **9** (2) (1947) 1–4
- HANLEY, J. W. en H. N. DRAUDT, U.S.P. 2.844.478 (1958)
- HANNAN, R. S. en C. H. LEA, *Biochim. Biophys. Acta* **9** (1951) 293–305
- HESS, E., *J. Bact.* **15** (1928) 33–35
- HODGE, J. E., *J. Agr. Food Chem.* **1** (1953) 928–943

- HOFF, J. E. en A. J. KAPSALOPOULOU, J. Gaschrom. **2** (1964) 296–299
- HOLLENBECK, C. M. en L. J. MARINELLI, Proc. 15th research conf. of the Am. Meat Inst. Foundation, Chicago 1963, 67–76
- HOLLENBECK, C. M., Symposium on smoke and smoke flavoring. Red Arrow Products Comp., Milwaukee, Wisconsin 1964, paper no. 6
- HURD, C. D. en C. D. KELSO, J. Am. Chem. Soc. **70** (1948) 1484–1486
- HURD, C. D., 'Contributions of browning research to ratio item stability', Chicago 1952, 21–23
- HURD, C. D. en C. M. BUSS, J. Am. Chem. Soc. **78** (1956) 5667–5671
- HUSAINI, S. A. en G. E. COOPER, Food Technology **11** (1957) 499–502
- JAHNSEN, V. J., 'The chemical composition of hardwood smoke'. Diss. Purdue University 1961
- JOB, P., Ann. Chim. **10**(9) (1928) 113–203
- JOCHEMS, J., TNO-nieuws **23** (1968) 216–220
- JOHNSON, D. P., F. E. CRITCHFIELD en J. E. RUCH, Anal. Chem. **34** (1962) 1389–1391
- JUDIĆKAJA, A. I., Rybnoje Chozajstwo **35** (2) (1959) 65–69
- KAMEL, M. en R. WIZINGER, Helv. Chim. Acta **43** (1960) 594–600
- KATO, H., Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **24** (1960) 1–12
- KATO, H., ibid. **26** (1962) 187–192
- KATO, H., ibid. **27** (1963) 461–466
- KATO, H., Agr. Biol. Chem. (Japan) **31** (1967) 1086–1090
- KEENEY, D. G., S. PATTON en D. V. JOSEPHSON, J. Dairy Sci. **33** (1950) 526–530
- KEENEY, M., Anal. Chem. **29** (1957) 1489–1491
- KLINE, R. W. en G. F. STEWART, Ind. Eng. Chem. **40** (1948) 919–922
- KOCHANOWSKI, J., Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 29–33
- KOCHANOWSKI, J. en M. MACIEJOWSKA, Prace Morskiego Instytutu Rybackiego (Gdynia) **14**, B (1967) 169–182
- KOSSEL, A. en N. GAWRILOW, Z. physiol. Chem. **81** (1912) 274–279
- KRYŁOWA, N. N. c.s., 8th European Congress of Meat Research Workers, 1962; ref. D. J. TILGNER en Z. E. SIKORSKI, Przemysł Spożywczy **17** (1963) 657–666
- KUBOTA, T., J. Biochem. (Japan) **34** (1941) 119–141; ref. C. A. **45** (1951) 1177e
- KURKO, W. I., Mjasnaja Industrija SSSR **30** (1) (1959a) 17–18
- KURKO, W. I., ibid. **30** (3) (1959b) 19–21
- KURKO, W. I., Trudy V.N.I.I.M.P. **11** (1961) 106–118, 119–127
- KURKO, W. I., persoonlijke mededeling aan H. DAUN (1963a)
- KURKO, W. I., 'Chemiczne i fizykochemiczne podstawy procesu wędzenia', Warschau 1963b, 48–53
- LANGNER, H. J., Fleischwirtsch. **46** (1966) 961–965
- LAPŠIN, I., Rybnoje Chozajstwo **9** (1961) 57–61
- LAPŠIN, I., Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 57–59
- LEA, C. H., J. Soc. Chem. Ind. **52** (1933) 57–63 T
- LEA, C. H. en R. S. HANNAN, Biochim. Biophys. Acta **3** (1949) 313–325
- LEA, C. H., R. S. HANNAN en R. I. N. GREAVES, Biochem. J. **47** (1950) 626–629
- LEA, C. H., R. S. HANNAN en D. N. RHODES, Biochim. Biophys. Acta **7** (1951) 366–377
- LEA, C. H. en D. N. RHODES, ibid. **9** (1952) 56–59
- LEA, C. H., Proc. Symp. Fundamental aspects of the dehydration of foodstuffs, Aberdeen 1958, 178–196
- LENTO, H. G., J. C. UNDERWOOD en C. O. WILLITS, Food Research **23** (1958) 68–71
- LENTO, H. G., J. C. UNDERWOOD en C. O. WILLITS, ibid. **25** (1960a) 750–756
- LENTO, H. G., J. C. UNDERWOOD en C. O. WILLITS, ibid. **25** (1960b) 757–763
- LINTON, E. P. en H. V. FRENCH, J. Fish. Res. Bd Can. **6** (1945) 338–348
- LOVE, S. en L. J. BRATZLER, J. Food Sci. **31** (1966) 218–222
- LUDORFF, W., Allgem. Fischwirtschafts-Z. **10** (28/29) (1958) 16–18
- MAILLARD, L. C., Compt. rend. **154** (1912) 66–68
- MAILLARD, L. C., Ann. Chim. **9** (5) (1916) 258–317
- MAMEREN, J. VAN, Conserva **7** (1958) 55–62
- MAMEREN, J. VAN, persoonlijke mededeling (1966)

MARTIN, I., Chem. & Ind. **1958**, 1439
 MAŠKOVČEV, M. F., Biochimia (Moskou) **16** (1951) 615–620
 MAZJAKIN, W. en E. ROGAČEVSKAJA, Mjasnaja Industria SSSR **9** (11) (1938) 17
 MELLON, E. F., A. H. KORN en S. R. HOOVER, J. Am. Chem. Soc. **69** (1947) 827–831
 MELLON, E. F., A. H. KORN en S. R. HOOVER, *ibid.* **70** (1948) 3040–3044
 MEYBOOM, B. en J. VAN MAMEREN, Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 44–46
 MEYBOOM, B., Conserva **15** (1966) 7–8
 MILER, K., Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 73
 MILER, K., Pools patent no. 49216; Ned. octrooiaanvr. 6504450 d.d. 7 april 1965
 MILER, K., persoonlijke mededeling (1966)
 MILLER, G. L., Anal. Chem. **31** (1959) 964
 MITTELHÄUSER & WALTER GmbH, Ned. octrooiaanvr. 6513255 (1965)
 MOHAMMAD, A., H. S. OLCOTT en H. FRAENKEL-CONRAT, Arch. Biochem. **24** (1949) 270–280
 MORRIS, R. J. en P. A. FORDHAM, J. Food Sci. **27** (1962) 413–415
 MORSE, R. E. en D. B. PIVAN, Food Engineering **25** (9) (1953) 70–72
 NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION (Londen), Ned. octrooiaanvr. 200394 (1955)
 NICOL, D. L., Food Manufacture **35** (1960) 417–419
 NOMURA, D., Hakkō Kōgaku Zasshi **33** (1955) 212–216; ref. C. A. **50** (1956) 1230h
 Official methods of analysis of the A.O.A.C., 8th Ed., Washington 1955, 390–391
 OLCOTT, H. S. en H. J. DUTTON, Ind. Eng. Chem. **37** (1945) 1119–1121
 OLSEN, H., Ned. octrooiaanvr. 203120 (1955)
 O'NEILL, L. A., S. M. RYBICKA en T. ROBEY, Chem. & Ind. **1962**, 1796–1797
 PEARCE, J. A. en W. A. BRYCE, Food Technology **1** (1947) 310–320
 PEARL, I. A., Chem. & Eng. News **42** (27) (1964) 80–93
 PETIT, L., Compt. rend. **244** (1957) 2326–2329
 PETIT, L., Ann. Inst. nat. de la recherche agronomique, Série E, **8** (1959) 5–33
 PETTET, A. E. J. en F. G. LANE, J. Soc. Chem. Ind. **59** (1940) 114–119
 PHILPOT, J. ST. L. en P. A. SMALL, Biochem. J. **32** (1938) 542–551
 PIHA, P., M. KITUNEN, A. M. HOLMBERG en H. SUOMALAINEN, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **113** (1960) 134–143
 PORTER, R. W., L. J. BRATZLER en A. M. PEARSON, J. Food Sci. **30** (1965) 615–619
 RADTKE, R., W. MOHR en R. SPRINGER, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **129** (1966) 349–359
 REGIER, L. W. en A. TAPPEL, Food Research **21** (1956) 630–639
 REICH, H. en B. K. SAMUELS, J. Org. Chem. **21** (1956) 68–71
 Reports of the Food Investigation Board, D.S.I.R., Great Britain **1953**, 30
Ibid. **1954**, 42
Ibid. **1955**, 32
 REYNOLDS, T. M., Adv. Food Research **12** (1963) 1–52
 RICHARDS, E. L., Biochem. J. **64** (1956) 639–644
 RIDEAL, S., 'Disinfection and the preservation of food'. New York 1903, 410. Ref. bij L. B. JENSEN, Food Research **8** (1943) 377–387
 RIEDER, H. P., Clin. Chim. Acta **4** (1959) 733–740
 ROLFE, E. J., Proc. Symp. Fundamental aspects of the dehydration of foodstuffs, Aberdeen 1958, 211–224
 RÖMPF, H., Chemie-Lexikon, Stuttgart 1966. II, 2478; III, 4031
 RONKAINEN, P., D. KAEMPGEN en H. SUOMALAINEN, Z. anal. Chem. **201** (1964) 14–20
 ROUDIER, A., Bull. Assoc. Techn. de l'Industrie Papetière **17** (1963) 314–319
 RUCKDESCHEL, H., Diss. T. H. München 1914
 RUITER, A., Proc. Int. Symp. on the technology of fish utilisation. Husum 1964, 259–261
 RUSZ, J., Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 10–15
 SAWICKI, E., Proc. Int. Symp. on microchemical techniques. New York-London 1961, 59–106
 SATTLER, L. en F. W. ZERBAN, Ind. Eng. Chem. **41** (1949) 1401–1406
 SCHOONENS, J. G., De Visserijwereld **8** (1949) 1203–1205

- SCHORMÜLLER, J., E. GRAMPP en H. D. BELITZ, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **136** (1968) 271–278
- SCHRÖTER, E., D.P. 1.090.943 (1958)
- SCHUBERT, M. P., J. Biol. Chem. **111** (1935) 671–678
- SCHWARTZ, D. P., J. Chromatogr. **9** (1962) 187–194
- SCHWARTZ, D. P., M. KEENEY en O. W. PARKS, Microchem. J. **8** (1964) 176–179
- SCHWARTZ, H. M. en C. H. LEA, Biochem. J. **50** (1952) 713–716
- SCHWENKER, R. F. en E. PASCU, Chem. & Eng. Data Series **2** (1957) 83–87
- SERAFINI, A. en G. UNGARO, ref. Hyg. Rundschau **1** (1891) 267–268; *ibid.* **2** (1892) 1089–1090
- SHARP, J. G., J. Sci. Food Agric. **8** (1957) 14–20
- SHEWAN, J. M., Chem. & Ind. **1945**, 98–101
- SHEWAN, J. M., *ibid.* **1949**, 501–505
- SIDAWAY, E. P. Fish. Res. Board of Canada; Progr. Repts Pacific Coast St. **59** (1944) 13–14
- SIKORSKI, Z. E., Przemysł Spożywczy **10** (1956) 370–373
- SIKORSKI, Z. E., en N. BARYLKO-PIKIELNA, Deutsche Lebensm.-Rundschau **56** (1960) 65–69
- SIKORSKI, Z. E., Tehnologija Mesa **1962a**, sp. ed. 24–26
- SIKORSKI, Z. E., *ibid.* **1962b**, sp. ed. 64–65
- SIKORSKI, Z. E., ref. bij K. CORETTI, Fleischwirtsch. **14** (1962c) 216
- SIKORSKI, Z. E. en D. J. TILGNER, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **124** (1964) 274–283
- SIMON, S., A. A. RYPINSKI en F. W. TAUBER, Food Technology **20** (1966) 1494–1498
- SIMPSON, T. H. en D. CAMPBELL, Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 90–92
- SIMPSON, T. H., Symposium on smoke and smoke flavoring. Red Arrow Products Comp., Milwaukee, Wisconsin 1964, paper no. 2
- SINGER, A. J. en E. R. STERN, Anal. Chem. **23** (1951) 1511–1512
- SNELL, F. D. en C. T. SNELL, 'Colorimetric methods of analysis'. Princeton 1953; vol. 3, 117–119; vol. IIIa, 91
- SONG, P. S. en C. O. CHICHESTER, J. Food Sci. **31** (1966) 914–926
- SPANYÁR, P., E. KEVEI en M. KISZEL, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **112** (1960a) 353–364
- SPANYÁR, P., E. KEVEI en M. KISZEL, *ibid.* **112** (1960b) 471–480
- SPANYÁR, P. en E. KEVEI, *ibid.* **115** (1961) 1–9
- SPANYÁR, P. en I. SZEREDY, *ibid.* **118** (1962) 293–299
- SPANYÁR, P., E. KEVEI en M. BLAZOVICH, *ibid.* **129** (1966) 84–91
- SPANYÁR, P., E. KEVEI en M. BLAZOVICH, *ibid.* **133** (1966) 1–7
- SPECK, J. C., Anal. Chem. **20** (1948) 647–648
- STANLEY, T. W., E. SAWICKI, H. JOHNSON en J. D. PFAFF, Microchim. Acta **1965**, 48–59
- STRAIN, H. H., J. Am. Chem. Soc. **57** (1935) 758–761
- SZENT-GYÖRGYI, A., L. G. EGYÜD en J. A. McLAUGHLIN, Science **155** (1967) 539–541
- TAYLOR, F. E., U.S.P. 3.152.914 (1964)
- THOMBANSEN, C. en E. SCHRÖTER, D. P. 1.090.065 (1958)
- THOMSON, T., J. Soc. Chem. Ind. **65** (1946) 121–124
- TILGNER, D. J., Food Manufacture **32** (1957) 365–368
- TILGNER, D. J., Fleischwirtsch. **10** (1958) 751–758
- TILGNER, D. J., K. MILER, J. PROMIŃSKI en G. DARNOWSKA, Tehnologija Mesa **1962a**, sp. ed. 18–21
- TILGNER, D. J., Z. ZIEMBA en DJU-HAK-DJU, *ibid.* **1962b**, sp. ed. 21–23
- TILGNER, D. J., K. MILER, J. PROMIŃSKI en G. DARNOWSKA, *ibid.* **1962c**, sp. ed. 37–39
- TILGNER, D. J., Z. E. SIKORSKI, H. URBANOWICZ en Z. NOWAK, *ibid.* **1962d**, sp. ed. 62–64
- TILGNER, D. J. en Z. E. SIKORSKI, Przemysł Spożywczy **17** (1963) 85–90
- TILGNER, D. J., Fleischwirtsch. **46** (1966) 501–503
- TILGNER, D. J., *ibid.* **47** (1967a) 373–378
- TILGNER, D. J., H. DAUN en A. RUDNICKI, Roczn. Inst. Przemysłu Mięsnego **4** (1) (1967b) 15–24
- TILGNER, D. J., Food Manufacture **43** (6) (1968) 37–39, 42
- TIMMONS, C. J., J. Chem. Soc. **1957**, 2613–2623
- TORIYAMA, Y., S. NAGAO, T. TUTO en T. TAKAHASHI, Food Engineering **27** (4) (1955) 105

TORRY RESEARCH STATION, Ann. Report **1958**, 14–15
 TRAITTEUR, H., Brauwissenschaft **1951**, 153–158
 TUCKER, I. W., J. A.O.A.C. **25** (1942) 779–782
 UNDERWOOD, J. C., H. G. LENTO en C. O. WILLITS, Food Research **21** (1956) 589–597
 WATTS, B. M. en M. FAULKNER, Food Technology **8** (1954) 158–161
 WECHSEL, L. TE, persoonlijke mededeling (1966)
 WECHSEL, L. TE, CIVO-rapport R 2591 (1967) 20–36
 WECHSEL, L. TE, Vleesdistributie en Vlees technologie **3** (1968) 247–249, 292–293, 339–341
 WEIR, C. E., Am. Meat Inst. Foundation, Circular no. 35 (1967); ref. in Food Manufacture **32** (1957) 566
 WEIR, C. E., L. J. PIRCON, G. D. WILSON en D. M. DOTY, Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 57
 WEST, PH. P. en B. SEN, Z. anal. Chem. **153** (1956) 177–183
 WHITING, C. G. en R. A. COGGINS, Chem. & Ind. **1963**, 1925–1926
 WILLE, O., in 'Der Fisch': Band III, 'Handbuch für die Fischkonservierung', Lübeck 1949, 296
 WILSON, G. D., Am. Meat Inst. Foundation – Special Report **26** (1961) 5
 WINDEL, M., Das Gas- und Wasserfach **1932** (38) 17–20
 WISTREICH, H., The National Provisioner **157** (1967) (16) 12–13, 35–36
 WOLFROM, M. L., R. D. SCHUETZ en L. F. CAVALIERI, J. Am. Chem. Soc. **70** (1948) 514–517
 WOLFROM, M. L. en C. S. ROONEY, J. Am. Chem. Soc. **75** (1953) 5435–5436
 WOLFROM, M. L. en G. P. ARSENAULT, J. Org. Chem. **25** (1960) 205–208
 WOLGUNOV, G. P. en M. T. POCHNO, Biochimia (Moskou) **15** (1960) 67–74
 WOLKOVSKAJA, I. L. en I. I. LAPŠIN, Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 26–28
 WOSKRESENSKIJ, N. A., Lezing, gehouden op het 1e rookcongres te Gdańsk, 1958 (paper no. 18); ref. bij W. W. FOSTER, Food Manufacture **34** (1959) 59
 WOSKRESENSKIJ, N. A., Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 69–71
 WOSKRESENSKIJ, N. A., Nowye fiz. metody obrabotki piščewych produktov. Kiew, sb. 7–13; ref. C. A. **62** (1965) 9695a
 WIJN, J. F. DE, Voeding **27** (1966) 188–189
 ZERBAN, F. W. en L. SATTTLER, Int. Sugar J. **57** (1955) 71–77
 ZIEMBA, Z., Gospodarka Mięsna **8** (1956) (3) 7–12; ref. bij D. J. TILGNER, Food Manufacture **32** (1957) 365–368
 ZIEMBA, Z., Tehnologija Mesa **1962**, sp. ed. 50–51, 72–73
 ZIEMBA, Z., Diss. Gdańsk 1964
 ZIEMBA, Z., Przemysł Spożywczy **20** (1966a) 748–753
 ZIEMBA, Z., persoonlijke mededeling (1966b)
 ZIEMBA, Z., J. Nutr. & Dietet. **4** (1967a) 122–129
 ZIEMBA, Z., Przemysł Spożywczy **21** (1967b) (6) 24–25
 ZIEMBA, Z., ibid. **21** (1967c) (7) 25–26