

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY
FOOD SCIENCES

4

ROČNÍK 13
PRAHA 1995
ISSN 0862-8653

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY
FOOD SCIENCES

*An international journal published by the
Czech Academy of Agricultural Sciences
and with the promotion of the Ministry
of Agriculture of The Czech Republic*

Abstracts from the journal is comprised in Agrindex of FAO (AGRIS database), Food Science and Technology Abstracts, Dairy Science Abstracts, Chemical Abstracts, WLAS, TOXILINE PLUS and Czech Agricultural Bibliography.

Editorial board - Redakční rada

Head of the Editorial Board – Předseda

ing. Zeno Šimůnek, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

ing. Miloslav Adam, CSc., ing. Luisa Benešová, ing. Jan Drbohav, CSc.,
prof. ing. Dušan Čurda, CSc., prof. ing. Jiří Daviděk, DrSc., ing. Jiřina Houšová, CSc.,
prof. ing. Ivo Ingr, DrSc., ing. Milan Kováč, CSc., prof. ing. Jan Pokorný, DrSc.,
prof. ing. Alexander Prlbela, DrSc., prof. ing. Mojmír Rychtera, CSc.,
ing. Olga Štiková, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc.

Editor-in-chief – Vedoucí redaktorka

RNDr. Marcela Braunová

Aim and scope: The journal publishes original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing knowledge in the given field. Published papers are in Czech, Slovak or English.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address.
Subscription price for 1995 is 210 Kc, 48 USD (Europe) and 56 USD (overseas)

Periodicity: The journal is published six time a year.

Contact address: Slezská 7, 120 56 Prague 2, Czech Republic,
tel. 02/251 098; fax 02/257 090

TIME-INTENSITY BITTERNESS EVALUATION OF BITTER LIQUEURS

Jan POKORNÝ, Lenka KALINOVÁ, Jan VELÍŠEK

*Institute of Chemical Technology – Department of Food Chemistry and Analysis,
Prague, Czech Republic*

Abstract: The bitterness of a sandalwood-based bitter liqueur was rated by a time-intensity sensory procedure with use of unstructured graphical scales. The bitterness was rated after ingestion, at the swallowing, and then every 10 seconds for 2 min. Three methods of the data evaluation were compared: (1) averaging the results, (2) multiple regression using an expression of six terms, and (3) the principle components analysis, which explained the variance in more satisfactory degree than the other methods. Three principal components could explain 96 % of total variance.

bitterness; time-intensity evaluation; principal components analysis; bitter liqueur; sandalwood

The sensory evaluation of bitter substances is particularly difficult as the bitterness develops only slowly to its maximum after 10–60 s, slowly fading again afterwards. Therefore, it is a dynamic (time-dependent) phenomenon. If the bitterness is evaluated with use of a scalar method (not respecting time), the variability in reaching the maximum among judges may increase the error of sensory assessment. Therefore, the time-intensity sensory evaluation was proposed (Lewis et al., 1980), and the results were compared with the traditional scaling. The new procedure was found more reproducible. The computerized procedure was reported as equivalent to the traditional scaling in collecting the data (Guinard et al., 1985). Both the bitterness and the astringency developed similarly in the evaluation of white wine containing four different phenolic substances (Robichaud, Noble, 1990). Results obtained with use of a category ordinal scale for the time-intensity evaluation of bitter liqueurs were substantially equivalent to those obtained with use of an unstructured graphical scale (Pilková, Pokorný, 1992).

The averaging of time-intensity curves is rather difficult. Several approaches have been used for the analysis of time-intensity curves. The most common approach is the averaging method with simply averaging the data over all assessors and replications. Another approach is the regression method, which substitutes the experimental data by a suitable mathematical function (Liu, Mac Fic, 1990; Overbosch, 1986). The principal components analysis (PCA) was found a useful approach for the evaluation of time-intensity studies, better than the ordinary averaging (Lundahl, 1992). The data extracted from each curve were analyzed by PCA which gave substantially more information than the category scaling. Time-intensity responses obtained in time-intensity evaluations of beer bitterness were decomposed into three principal components curves which could be used not only for estimating the variability of beer samples, but for the variability of judges as well (Buren, 1992). Because of the high variability in the input data, the averaging was not confirmed as the optimum approach for the evaluation of time-intensity curves (Dijksterhuis, 1993), who found the PCA preferable, especially the non-centered PCA as recently published (Dijksterhuis et al., 1994). The centered PCA gives the tightest clustering of principal curves so that differences between assessors may become less evident.

Most time-intensity studies were performed for the assessment of beer bitterness. We have tried the application for the assessment of cordials, where the bitterness is combined with various other flavour notes. We have chosen a cordial based on sandalwood extract as it is both bitter and astringent. Sandalwood is widely used as food ingredient, mainly as a natural colorant, for instance, for various meat products (Arneth, Martin, 1987), candy (Marcus, 1992) or brandy (Venkataramu et al., 1983), where its specific odour may contribute to the acceptability (Naipawer, 1986). The astringent taste prevails in sandalwood extracts, due to the presence of various polyphenolic substances, but the bitter flavour is pronounced as well.

MATERIALS AND METHODS

The sample contained 30.6 vol. % ethanol, 7 mass % sucrose, and distilled water. Extracts were prepared in the following way: A suspension of 10 g ingredient in 80 ml of 50 vol. % ethanol was left standing for 6 days with

occasional shaking, the clear solution was decanted and filtered. The following volumes of extracts were added to 1 litre: 50 ml of sandalwood (*Santalum rubrum* L.), 10 ml of vanilla, 10 ml of cinnamon, and 10 ml of lavender. The mixture was then left for several months maturing at room temperature. The concentration was adjusted in such a way that the recorded time courses of bitterness and astringency covered most of the rating scale (Fig. 1).

The sensory analysis was performed in a standard test room (ISO 8589) provided with six standard test booths. Samples of 20 ml cold sample (10 °C) were served in the standard way (ISO 6658) to a panel of 6 trained assessors (ISO 8586) at a session. The assessors passed a course of three months, had an additional 6-months experience, and were instructed in the time-intensity evaluation of beer bitterness in 6-8 sessions. They were familiar with the evaluation of bitter liqueurs as well. The assessors were instructed to ingest a 15 ml draught, to move it in their mouths for 5 s, to swallow slowly after 10 s in such a way as to cover the back of mouth cavity with the draught. They recorded the bitterness 5 s after the ingestion (while the draught was still moving in their mouths), while swallowing, and then every 10 s for 2 min. They used unstructured graphical scales 100 mm long (ISO 4121) for the evaluation of bitterness. The bitterness was expressed in p. c. of the scale.

Statistical techniques employed were simple descriptive statistics and PCA which were performed on an IBM PC compatible computer using software purchased from SPSS/PC+, V3.1 (SPSS GmbH, Munich, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

The time-intensity curve (the average curve of five responses by a single assessor) is shown in Fig. 1. The astringency faded much more quickly than the bitterness so that the percept of astringency is not likely to interfere with the bitterness rating.

The total of 24 time-intensity curves were collected from 11 assessors. The average curve, the regression curve and the individual responses are shown in Fig. 2. The mean values of bitterness intensity values were calculated as an arithmetic average over all assessors and replications. The multiple regression equation found to fit best the input data was the following expression:

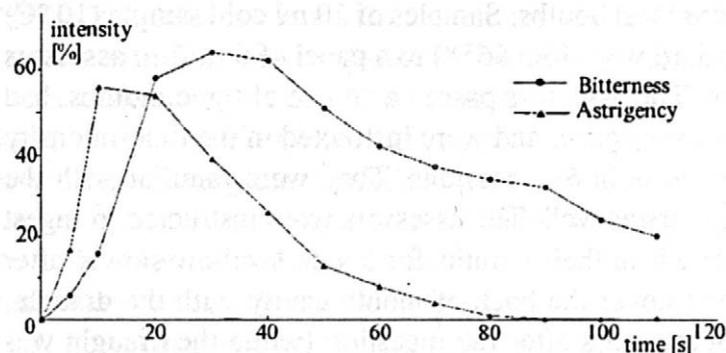
$$B = b_0 + b_1t + b_2t^2 + b_3t^3 + b_4t^4 + b_5t^5$$

where: B – intensity of bitterness (% of the scale)

t – time (s)

b_0 – constant

b_i – regression coefficients



1. Time-intensity curves of bitterness and astringency of the sandalwood liqueur

Both the average and the regression curves show the typical shapes of time-intensity curves such as reported in the literature (e.g. Buren, 1992, or Dijksterhuis et al., 1994). The curve obtained by averaging explained 49.70% of the total variation, and the multiple regression time-intensity curve explained 49.65% of the total variation in the data set.

Their maxima lay at the same point, i.e. about 20 to 30 s after swallowing the draught. Similar values were found when the bitterness of beer was tested by the same method (Strejček et al., 1992; Čepička et al., 1992).

The responses collected as above were then subjected to the PCA to reduce their complexity and to condense the information found in the input data set in a meaningful way. The PCA showed that only one principal component (PC) was needed to describe well the correlation structure. The first PC accounted for 85.4% of the total variance, the second PC explained 6.9%, and the third PC explained 3.7% of the total variance in the input data set. The communalities of the variables (assessors and replications) in this three-PCs solution ranged from 0.87 to 0.99 (Table I).

The component scores for the 12 time intervals seen as objects were plotted on the first two PCs axes, which together accounted for 92.3% of the data set variance (Fig. 3). It can be clearly seen that whilst the objects "20s" to

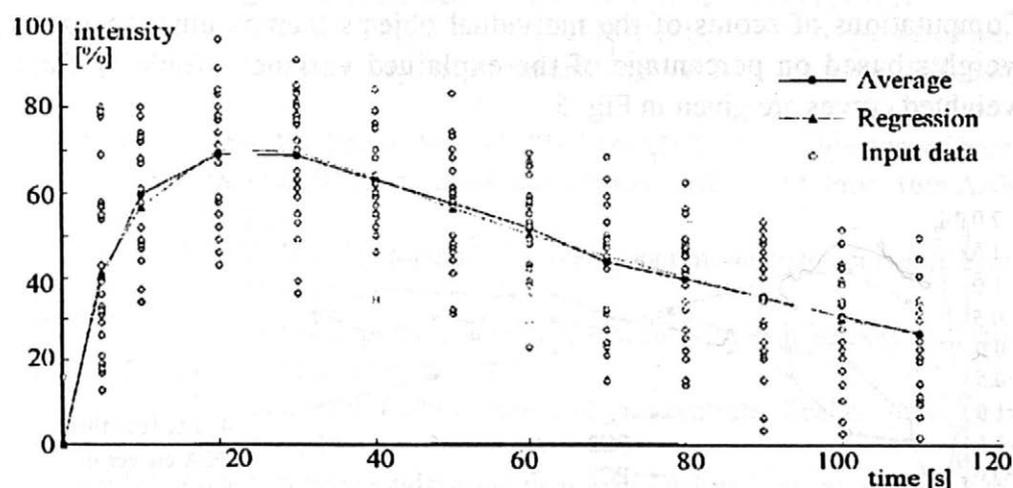
I. PCA analysis of the data set

Principal component	Eigenvalue	P.c. of variance	Cummulative p. c.
1	20.48556	85.4	85.4
2	1.66007	6.9	92.3
3	0.89284	3.7	96.0

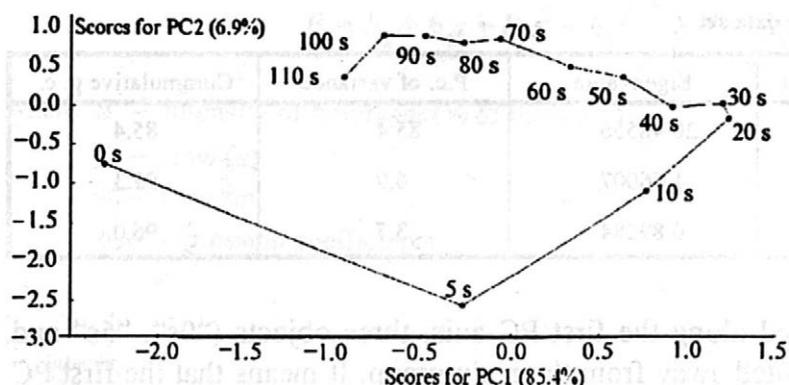
"110s" are situated along the first PC axis, three objects ("0s", "5s" and "10s") are distributed away from the main group. It means that the first PC describes well all results except the results obtained 5 s and 10 s after the ingestion of the sample, respectively. These two objects are the only ones, explained substantially by the second PC. It also means that the use of the first PC alone results in insufficient description of the data recorded 5 s and 10 s after the ingestion, respectively.

The above deviations are due to outliers among the group of assessors. It would not be correct, however, to eliminate their results, as they reflect the behaviour of a part of consumers, whose perception pattern deviates from that of the majority. The application of PCA for the classification of tasters will be discussed in another paper.

The first PC scores plotted against time (Fig. 4) resemble both the average and the multiple regression curves (Fig. 2). The first PC curve may thus be used as an alternative to either the average or the regression curves. The ad-



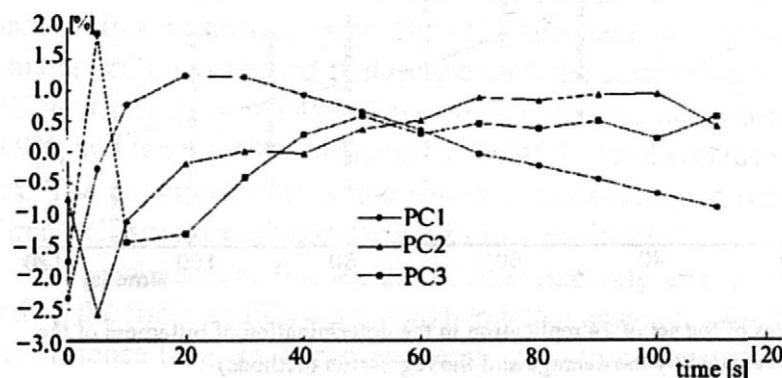
2. Time-intensity curves of the set of 24 replication in the determination of bitterness of the sandalwood liqueur (evaluated by the average and the regression methods)



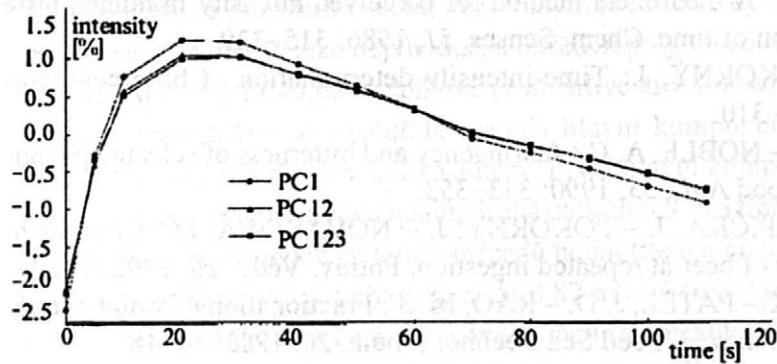
3. Scatter plot of samples scores on the first two principal components

vantage of the PCA approach is that the first PC curve accounts for more variance in the data set than the two former curves (in our case, it explains 85.4% of total variance). If the shape of the curve is more interesting than the absolute value, the first PC scores are a good alternative to the original data.

The curve corresponding to the plotting of the second component has a lower slope in the beginning, a flat maximum after 70–100 s, and the curve does not return to the zero value. In agreement with Buren (1992), it may be attributed to the deviating behaviour of some assessors. If the assessors designated as outliers should not be eliminated from the data set, it is necessary (particularly, in case of small differences between samples) to construct a curve not solely from the first PC, but from the first two or even three PCs. Computations of scores of the individual objects then assume the use of weights based on percentage of the explained variance (Table I). Such weighted curves are given in Fig. 5.



4. The first three PCA curves of bitterness-time relationships of the sandalwood liqueur



5. The PCA curves of time-intensity evaluation of bitterness of the sandalwood liqueur, using the first, the first and second, and the first, second and third PCs, respectively

References

- ARNETH, W. – MARTIN, G.: Über die Extraktion von Farbstoffen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen. Mitt. Bundesanst. Fleischforsch., Kulmbach, 98, 1987: 7728–7729.
- BUUREN, S., van: Analyzing time-intensity responses in sensory evaluation. Food Technol., 46, 1992: 101–104.
- ČEPIČKA, J. – STREJČEK, F. – POKORNÝ, J.: Development of the sensory bitterness during the tasting of beer. Monatschr. Brauwissen., 45, 1992: 329–331.
- DIJKSTERHUIS, G. B.: Principal component analysis of time-intensity bitterness curves. J. Sensory Stud., 8, 1993: 317–328.
- DIJKSTERHUIS, G. – FLIPSEN, M. – PUNTER, P.: Principal component analysis of TI-curves: three methods compared. Food Qual. Pref., 5, 1994: 121–127.
- GUINARD, J. X. – PANGBORN, R. M. – SHOEMAKER, C. F.: Computerized procedure for time-intensity sensory measurement. J. Food Sci., 50, 1985: 543–544, 546.
- LEWIS, M. J. – PANGBORN, R. M. – FUJII-YAMASHITA, J.: Bitterness of beer: a comparison of traditional scaling and time-intensity methods. In: Proc. 16th AAB Conf., 1980: 165–171.
- LIU, Y. H. – MacFIE, H. J. H.: Methods for averaging time-intensity curves. Chem. Senses, 15, 1990: 471–484.
- LUNDAHL, D. S.: Comparing time-intensity to category scales in sensory evaluation. Food Technol., 46, 1992(11): 98–103.
- MARCUS, F. K.: Natürliche Farbextrakte und -konzentrate. Zucker-Süßwaren-wirtschaft., 45, 1992: 313–317.
- NAIPAWER, R. E.: Synthetic sandalwood chemistry – a decade in review. In: LAWRENCE, B. M. (Ed.): Flavors and Fragrances: a World Perspective. London, Elsevier 1986: 805–813.

OVERBOSCH, P. A.: A theoretical method for perceived intensity in human taste and smell as a function of time. *Chem. Senses*, 11, 1986: 315–329.

PILKOVÁ, L. – POKORNÝ, J.: Time-intensity determination of bitterness. *Nahrung*, 36, 1992: 309–310.

ROBICHAUD, J. L. – NOBLE, A. C.: Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agr.*, 53, 1990: 343–353.

STREJČEK, F. – ČEPIČKA, J. – POKORNÝ, J. – NOVÁKOVÁ, M.: Changes in the sensory bitterness of beer at repeated ingestion. *Potrav. Vědy*, 10, 1992: 1–10.

VENKATARAMU, K. – PATEL, J. D. – RAO, M. S.: Fractionation of wood phenolics and their use in brandy. *J. Food Sci. Technol., India*, 20, 1983: 16–18.

ISO 4121: Sensory analysis – Grading of food products using scale categories. International Standardization Organization, Geneva 1978.

ISO 6658: Sensory analysis – Methodology – General guidance. International Standardization Organization, Geneva 1985.

ISO 8589: Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms. International Standardization Organization, Geneva 1988.

ISO 8586 DIS: Sensory analysis – General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. International Standardization Organization, Geneva 1989.

Received February 24, 1995

Časová závislost při stanovení intenzity hořkosti hořkého likéru

Hořkost se vyvíjí pomalu a pomalu odeznívá, proto je velmi důležité při stanovení intenzity hořkosti definovat čas, ve kterém se (od ochutnání nebo od spolknutí) stanovuje. Přesnější je stanovení celé křivky vývoje hořkosti. Časovou závislost hořkosti jsme zkoumali u hořkého likéru (30,6 % alkoholu a 7 % cukru), kde jedinou hořkou složkou byl extrakt santalového dřeva. Ten je zároveň také intenzivně trpký, ale trpkost odezní velmi rychle (obr. 1), takže neruší při sledování dozrívání hořkosti.

Hořkost byla stanovována za podmínek stanovených mezinárodní normou ISO a její intenzita byla vyhodnocena s použitím nestrukturovaných grafických stupnic. Hodnocení dělali školené a zkušené osoby s určitou praxí pro vyhodnocování časových závislostí. Celkem bylo získáno 24 časových křivek od 11 různých hodnotitelů.

Ke statistickému zpracování byly použity všechny vzorky, včetně odlehlých. Ve shodě s očekáváním byl zjištěn značný rozptyl výsledků (obr. 2), což ovšem je při senzorickém stanovení hořkosti normální a vzhledem k velkému počtu opakování neovlivnilo významně průměrnou hodnotu. Výsledky byly zpracovány třemi metodami. První byla průměrová metoda, avšak tato závislost (obr. 2) vysvětlila jen

49,70 % celkové proměnlivosti údajů. Druhým přístupem bylo využití mnohonásobné regrese, přičemž se jako nejvhodnější osvědčil polynom 5. stupně (obr. 2), kterým se podařilo vysvětlit 49,65 % celkové proměnlivosti v souboru údajů.

Jako nejvhodnější se osvědčila metoda hlavní komponenty (PCA), která byla v poslední době navržena několika autory. První hlavní komponenta (PC) vysvětlila 85,4 % veškeré proměnlivosti údajů, druhá dalších 6,9 % a třetí dalších 3,7 % (tab. I). Komunality proměnných (v tomto případě hodnotitelé a opakování analýzy) se přitom při použití tří PC pohybovaly mezi 0,87 a 0,99 (tab. I). Jestliže byly hodnoty zaznamenané po určitém čase zpracovány jako samostatný vzorek a výsledky naneseny do závislosti prvních dvou PC (obr. 3), pozorovali jsme, že údaje zaznamenané po 20 až 120 s po ochutnání ležely podél první PC, kdežto hodnoty zjištěné při ochutnávání v ústech (5 s) a při polykání (10 s) se od ostatních značně odchylovaly. Druhá PC tedy vysvětluje především změny hořkosti na počátku ochutnávání, kdežto první PC hlavně změny po spolknutí. Pozorované odchylky jsou dány odlišným vnímáním některých hodnotitelů. Jejich způsobnost lze sledovat rovněž metodou PCA a bude jí věnována další práce.

Jestliže se hodnoty skóre příslušných hlavních komponent (PC) nanesou proti době od ochutnání (obr. 4), získají se podobné křivky jako na obr. 2, ale získaná závislost lépe vystihuje proměnlivost výsledků (při použití jediné PC se vystihne 85,4 % celkové proměnlivosti). Pokud nevynecháme odlišující se hodnotitele, pak je vhodnější užít časové závislosti zahrnující první dvě PC, nebo ještě lépe první tři PC. Taková křivka pak vystihuje 92,3 %, nebo dokonce 96,0 % veškeré proměnlivosti souboru (obr. 5).

hořkost; hodnocení časových závislostí; metoda hlavních komponent (PCA); hořký likér; santalové dřevo

Contact address:

Prof. ing. Jan P o k o r n ý, DrSc., Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika,
tel.: 02/2435 3264, fax: 02/311 99 90; e-mail: fpbt-office-@vscht.cz

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION
Slezská 7, 12056 Praha 2, Czech Republic

Fax: (0042 4) 257 090

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

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

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	118,-	123,-
Živočišná výroba (Animal Production)	12	118,-	123,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	118,-	123,-
Lesnictví – Forestry	12	118,-	123,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	92,-	96,-
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6	48,-	56,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	35,-	37,-
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4	35,-	37,-
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4	35,-	37,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	35,-	37,-

α -GLUCOSIDASES FROM MICROBIAL SOURCES

Kateřina BÍLKOVÁ, Blanka KRÁLOVÁ

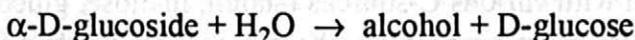
*Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology,
Prague, Czech Republic*

Abstract: *Aspergillus niger* and *Schizosaccharomyces pombe* were cultivated on media with different C-sources. *A. niger* produced only extracellular α -glucosidases for which maltose was the best inducer. Two different enzymes with tested activity were present in the medium – maltase and glucoamylase. No one of these enzymes showed activity with heteroglycosides. The highest α -glucosidase activity in the case of *Schizosaccharomyces pombe* was produced when cultivated on short dextrans or maltose. Both extracellular and intracellular activity was found, but intracellular activity was in later phases of cultivation strongly decreased. Only one protein with desired activity was present with specificity towards sucrose, maltose and synthetic heteroglycosides, but without activity with polysaccharides.

glucosidase; *Aspergillus niger*; *Schizosaccharomyces pombe*; media with different C-sources; hydrolyse of heteroglycosidic bonds

Glycosidases are enzymes broadly distributed in nature, as they are essential for normal growth and metabolism of all organisms. They usually take part in important processes of polysaccharides and glycoconjugates, both catabolic and anabolic.

Glucosidases are part of the glycosidase group, catalyzing the hydrolysis of glucosidic bonds, i.e. bonds in which glucose participate. In systematic enzyme classification, six enzymes are quoted as those catalyzing the hydrolysis of α -glucosidic bonds (Barman, 1969): α -amylase, β -amylase, glucoamylase, isoamylase, α -glucosidase and pullulanase. From above listed enzymes we were interested in α -glucosidase, the enzyme that hydrolytically releases α -D-glucose from non-reducing end of oligosaccharides or heteroglycosides by splitting α -D-1,4 or α -D-1,6 glucosidic bonds.



Substrate specificity of glucosidases varies according to the origin of the enzyme (Kelly, Fogarty, 1983). α -glucosidase hydrolyzes synthetic

heteroglycosides (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside or methyl- α -D-glucopyranoside), short oligosaccharides (maltose, nigerose) and in some special cases also glucans (starch, glycogen). Majority of α -glucosidases, however, catalyzes only the hydrolysis of very short oligo- or heteroglycosidic chains.

α -glucosidases are nowadays subject of a great attention because of their perspective application in science and practice. Next to applications in industry, their importance in medicine and clinical biochemistry, as well as in general analytical chemistry, is increasing (Fleet, Karpas, 1988; Satomura, 1988, Batchelor et al., 1988; Yoshikumi, 1991). They are used as a specific reagent for α -amylase determination (Rausher et al., 1985) in medicine, food science and food industry.

Though α -glucosidases are produced by plant (Chin, Weston, 1974; Donaldson, Joergensen, 1988; Chapleo, Hall, 1989; Storr, Hall, 1992) as well as by animal cells (Nakasone et al., 1991; Hettkamp et al., 1984) for practical applications microbial enzymes are preferred (Břízová et al., 1992; Kelly, Fogarty, 1983). Several microorganisms produce α -glucosidases as an intracellular or extracellular enzyme.

Our paper deals with comparing α -glucosidases from two significant microbial sources: from *Aspergillus niger* and *Schizosaccharomyces pombe*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and their Cultivation

Microorganisms

Aspergillus niger and *Schizosaccharomyces pombe* were from the collection of the Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague.

Cultivation of microorganisms

A. niger was cultivated on a rotary shaker at 28 °C. A 150-ml aliquot of Czapek-Dox medium with various C-sources (starch, maltose, glucose) was inoculated with 7 ml of spore suspension (the spores were washed from the agar plate with sterile distilled water, and the suspension was filtered and used for medium inoculation).

S. pombe was cultivated on complete medium with different C-sources (dextrines, starch, amylose, amylopectine, glycogen, sucrose, maltose, glucose) on a rotary shaker at 28 °C.

After cultivation the cells were separated by centrifugation at 1 500 g for 20 min at 4 °C.

Cultivation media

- a) Complete medium contained 5 g of yeast autolysate, 3 g of peptone, 3 g of casein hydrolysate, 10g of C-source and water to 1 000 ml.
- b) Czapek-Dox medium contained 2 g of NaNO₃, 0.5 g of KH₂PO₄, 0.5 g of K₂HPO₄, 0.5 g of MgSO₄·7H₂O, 0.01 g of FeSO₄·7H₂O, 10 g of glucose and distilled water to 1 000 ml.

Methods

Crude enzyme preparation

After cultivation biomass was separated by centrifugation, disintegrated after deep freezing using X-press, extracted to phosphate buffer pH 6.5 (*A. niger*) or to McIlvaine buffer pH 4.2 (*S. pombe*) and extract was used as an intracellular crude enzyme preparation. Dialysed and concentrated medium was used as an extracellular crude enzyme preparation.

Dialysis

Dialysis was performed against 0.01M phosphate buffer (pH 6.5) or McIlvaine buffer pH 4.2, respectively, at 4 °C for 16 h with several changes of buffer. The process was controlled by conductivity measurement.

Ultrafiltration

The medium after cultivation and dialysis was ultrafiltered at 4 °C through Pellicone membrane with an exclusion limit of 10⁴ at 0.5 MPa. After concentration to one-quarter of the original volume the ultrafiltrate was diluted twice and again concentrated to one-quarter of the volume.

Anion-exchange chromatography on HEMA-Bio-DEAE cart

A 5-ml aliquot of dialysed medium was applied to an equilibrated cartridge (5 ml of distilled water and 5 ml of 0.01M phosphate buffer pH 6.5) from a hypodermic syringe and eluted with 3-ml portions of increasing sodium chloride concentration in phosphate buffer.

Activity measurement

Enzyme activity was measured with different substrates.

- a) Activity with oligosaccharides or polysaccharides as substrates was measured by determination of glucose released from substrate. A 1-ml aliquot of 2% substrate in 0.1 M phosphate buffer pH 5.8 was incubated with 1 ml of sample for 30 min at 40 °C. The reaction was terminated with 0.5 ml of the deproteinization reagent Urasol. After 10 min, the precipitate was separated by centrifugation and the glucose in the supernatant was determined. Two blank controls containing no maltose and no enzyme were measured for p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside and soluble starch using the same procedure.
- b) Activity with heteroglucoside p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside was measured in the mixture containing 0.025 ml of 10% substrate, 0.6 ml of buffer pH 4.2 and 0.125 ml of sample. After 30 min. 0.25 ml of sodium carbonate was added to stop the reaction and absorbance at 405 nm was measured against blank (buffer instead of sample).

Glucose determination

The oxygen-selective electrode was covered with a nylon mesh containing immobilized glucose oxidase and catalase (Vrbová, Marek, 1990). The determination was performed at 30 °C in a mixture of 1.4 ml of phosphate buffer and 0.1 ml of sample. Oxygen depletion was measured and evaluated from maxima height. The system was calibrated before each measurement with standard glucose solutions.

Protein determination

Proteins were determined by the Pierce Protein Plus Assay (Pierce Chemical Company, Illinois, USA.) according to the manufacturer's protocol. The method is a modification made to the standard assay developed by Bradford (1976).

RESULTS

Microbial Sources of α -glucosidase

Nine strains of microorganisms were tested on complete medium for α -glucosidase production: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* type Malaga, *S. cerevisiae* type Palestina, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger*,

Penicillium citrinum, *Penicillium brevicompactum*, *Hansenula anomala* and *Endomyces magnusii*.

With the exception of *Endomyces magnusii* all tested strains produced extracellular α -glucosidase activity, *A. niger* being one of the best producers, but only *Schizosaccharomyces pombe* also produced intracellular α -glucosidase activity.

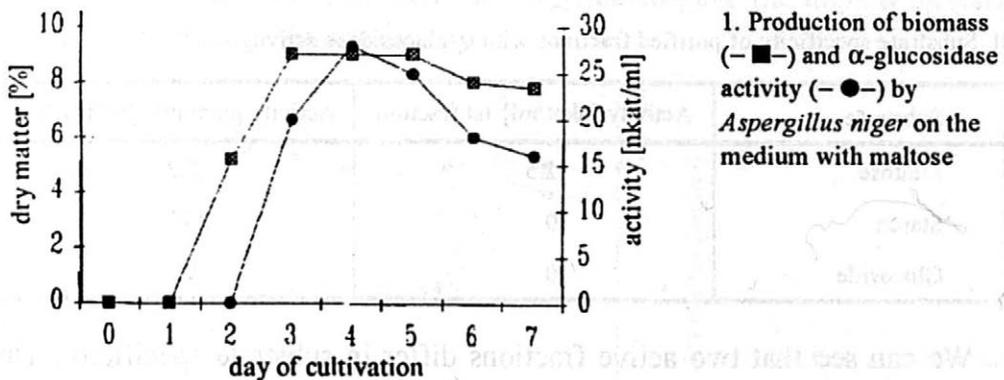
In further studies, α -glucosidases from *Aspergillus niger* and *Schizosaccharomyces pombe* were compared.

α -glucosidase from *Aspergillus niger*

Production of α -glucosidase activity

Microorganism *A. niger* was cultivated for 4 days in Czapek-Dox medium alternatively with glucose, starch and maltose as C-sources. In medium with starch and maltose, 1% of glucose was added as a growth starter. The highest extracellular α -glucosidase activity (with maltose as a substrate) was found in medium with maltose. Activity in medium with starch was only 40 % and in medium with glucose 25 % of that on maltose.

Fig.1 shows the growth curve of *A. niger* on Czapek-Dox medium with 1% of glucose and 9% of maltose, together with produced α -glucosidase activity. We can see that the production of α -glucosidase activity practically followed the growth of biomass with about 24 hours shift, and reached its maximum shortly (24 hours) after the exponential phase of growth was accomplished. After further 24 hours α -glucosidase activity started to decrease.



1. Production of biomass (—■—) and α -glucosidase activity (—●—) by *Aspergillus niger* on the medium with maltose

Purified enzyme preparations

Crude enzyme preparation, obtained by 16 hours dialysis against 0.01M phosphate buffer pH 6.5 of medium after 4 days cultivation under optimum

conditions, was purified using ion exchange chromatography on the column HEMA-Bio-DEAE-cart. After elution with increasing ionic strength of NaCl, two active fractions were obtained, the first being eluted with about 0.05M solution of NaCl, the second with 0.3M solution. Table I shows the results of this purification step.

I. Purification of α -glucosidase by anion exchange chromatography on the column HEMA-Bio-DEAE-cart

Preparation	Total activity [nkat]	Total proteins [mg]	Specific activity [nkat/mg]	Purification	Yield of activity [%]
Crude	71.65	1.25	57.32	–	100
1. active fraction	42.0	0.07	600.0	10.5	58.6
2. active fraction	24.0	0.41	58.54	1.02	33.5

Total recovery of activity in both active fractions was 92.1%.

Very similar results were obtained when ion exchange chromatography was carried out on the column MONO Q HR 5/5 using medium pressure (FPLC) and linear gradient of increasing ionic strength (NaCl).

Specificity of purified protein fractions with α -glucosidase activity

In both active fractions α -glucosidase activity was measured with maltose, starch (Zulkowski) and p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Table II).

II. Substrate specificity of purified fractions with α -glucosidase activity

Substrate	Activity [nkat/ml] 1st fraction	Activity [nkat/ml] 2nd fraction
Maltose	12.5	7.3
Starch	0	25.0
Glucoside	0	0

We can see that two active fractions differ in substrate specificity. The first fraction cleaved only α -glucosidic bond of maltose and thus can be regarded as maltase. The second fraction released glucose from maltose and starch and can be regarded as glucoamylase. No one of active fractions showed the activity with p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe***Production of α -glucosidase activity**

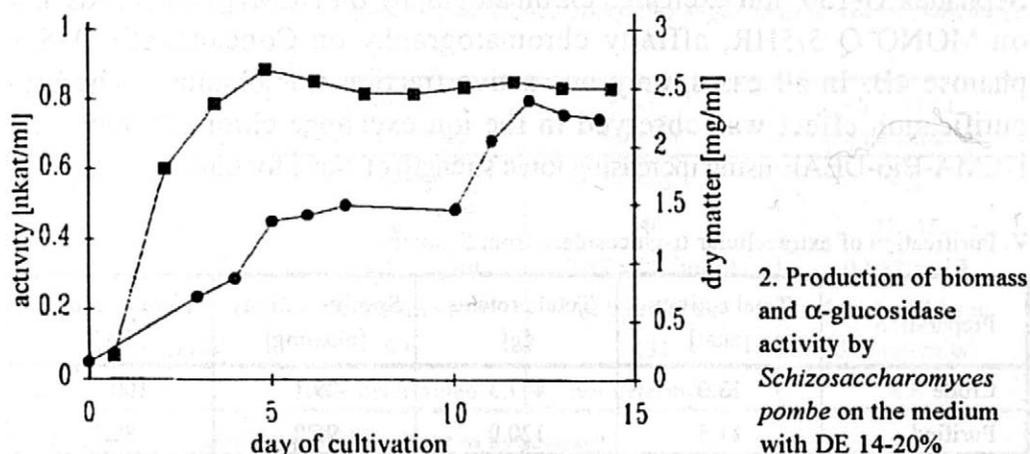
Growth of microorganisms and production of α -glucosidase activity was investigated in dependence on time and composition of culture medium. Various C-sources were tested with complete culture medium: starch, amylopectine, amylose, glycogen, maltose, sucrose, glucose and three types of dextrans – DE 5–8%, DE 10–14%, DE 14–20%. Dextrans differed according to the degree of hydrolysis. The numbers meant the amount (in per cent) of hydrolysed dextrin. The higher the number, the deeper the hydrolysis of dextrans, i.e. shorter sugar chains are present in the mixture.

III. Extracellular α -glucosidase activity produced by *Schizosaccharomyces pombe* in complete medium with different C-sources after 5 days of cultivation

C-source	Activity [nkat/ml]
Dextrin DE 14–20%	0.5
Dextrin DE 10–14%	0.25
Maltose	0.3
Glucose	0.18
Sucrose	0.18

The results have shown that long chain sugars – starch, amylopectine, amylose, glycogen and also dextrin DE 5–8% – had no positive effect on the production of extracellular α -glucosidase. Results of α -glucosidase activity in medium with oligosaccharides as C-sources (measured with p-nitrophenyl- α -D-glucoside as a substrate) are given in Table III.

Fig. 2 presents the growth of biomass and extracellular enzyme activity on complete medium with dextrans DE 14-20% that gave the highest enzyme activity in previous experiment.



An interesting feature of presented results with dextrans DE 14–20% as a C-source in medium is the increase of activity after 10 days of cultivation, which was repeatedly obtained and was not caused by contamination of the medium. It could be seen in other tested oligosaccharides, too, but usually in lower degree. It was not regarded with *A. niger* as an enzyme producer. As we found before, *S. pombe* has also produced intracellular α -glucosidase activity. We suspected that an increase of extracellular activity in late phases of cultivation could be caused by autolysis of cells and thus transition of intracellular activity into medium. As we can see in Fig. 3 this may be the cause, though the increase of extracellular activity is higher than the loss of intracellular activity (Table IV).

IV. Intracellular and extracellular α -glucosidase activity during cultivation

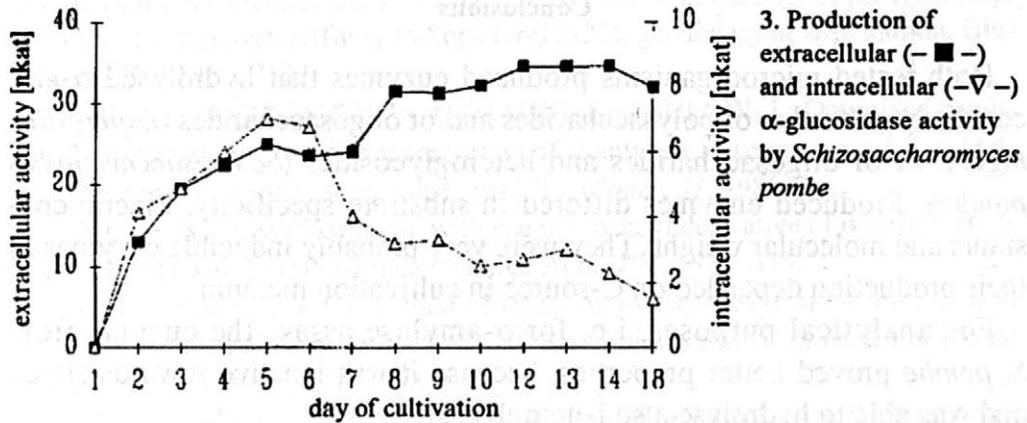
Day of cultivation	Activity [nkat]		
	extracellular	intracellular	total
4.	22	6	28
5.	25	7.5	32.5
9.	31	3.5	34.5
10.	33	2.5	35.5

Purification of crude enzyme preparation of extracellular α -glucosidase

For purification of extracellular crude enzyme preparation (after 16 hours dialysis against 0.01M McIlvain buffer pH 4.2 and ultrafiltration) various chromatographic techniques were tested: gel permeation chromatography on Sephadex G-150, ion exchange chromatography on HEMA-Bio-DEAE and on MONO Q 5/5HR, affinity chromatography on Concanavalin A-Sepharose 4B. In all cases, only one active fraction was obtained. The best purification effect was observed in the ion exchange chromatography on HEMA-Bio-DEAE using increasing ionic strength of NaCl for elution (Table V).

V. Purification of extracellular α -glucosidase from *S. pombe*

Preparation	Total activity [nkat]	Total proteins [g]	Specific activity [nkat/mg]	Yield of activity [%]
Crude	13.0	447.3	29.1	100
Purified	11.5	120.0	95.8	88.5



Substrate specificity of α -glucosidase

Purified α -glucosidase showed the highest activity with sucrose and maltose as substrates, lower activity with DE 14–20% and with p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside. It was inactive with starch.

Comparison of Michaelis constants for maltose ($K_m = 0.052$ mol/l) and for p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ($K_m = 0.180$ mol/l) confirmed that maltose is a better substrate for purified enzyme than heteroglycoside (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside).

Comparison of Purified Enzyme Preparations from *A. niger* and *S. pombe*

Comparison of main characteristics

Two purified active fractions from *A. niger* and the only active fraction from *S. pombe* were characterized. The results are summarized in Table VI.

VI. Main characteristics of α -glucosidases from *Aspergillus niger* and *Schizosaccharomyces pombe*

	<i>A. niger</i> glucoamylase ^x	<i>A. niger</i> maltase [*]	<i>S. pombe</i> α -glucosidase [*]
Optimum pH	4.4–6.3	4.4–6.3	4.2
Optimum T [°C]	60	40	37–45
K_m	3.13×10^{-2} g/ml	7.87×10^{-3} mol/l	0.052 mol/l
V_{lim}	82.7 g/ml.sec	12.93 mol/l.sec	0.104 mol/l.sec
Mol. weight [kDa]	89	131	30 (subunits)
IP	not determined	not determined	6.8

^xwith starch as a substrate; ^{*}with maltose as a substrate

Conclusions

Both tested microorganisms produced enzymes that hydrolysed α -glucosidic bonds either of polysaccharides and/or oligosaccharides (*Aspergillus niger*), or of oligosaccharides and heteroglycosides (*Schizosaccharomyces pombe*). Produced enzymes differed in substrate specificity, kinetic constants and molecular weight. They were very probably inducible enzymes as their production depended on C-source in cultivation medium.

For analytical purposes, i.e. for α -amylase assay, the enzyme from *S. pombe* proved better properties, because it was inactive towards starch and was able to hydrolyse also heteroglycoside.

References

- BARMAN T. E.: Enzyme Handbook. Vol II. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag 1969.
- BATCHELOR, M. J. – WILLIAMS, S. C. – GREEN, M. J.: Amperometric determination of total amylase. J. Electroanal. Chem., 246, 1988: 507.
- BRADFORD, M: A rapid and sensitive method for the quantitation of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 1976: 248.
- BŘÍZOVÁ, K. – KRÁLOVÁ, B. – DEMNEROVÁ, K. – VINŠ, I.: Isolation and characterization of alpha-glucosidase from *Aspergillus niger*. J. Chromat., 593, 1992: 125.
- CHAPLEO, S. – HALL, J. L.: Sugar unloading in roots of *Ricinus communis* L. III. The extravascular pathway of sugar transport. New Phytol., 111, 1989: 391.
- CHIN, C. K. – WESTON, G. D.: α -glucosidase activity of excised roots of *Lycopersicon esculentum*. Plant Cell Physiol., 15, 1974: 1994.
- DONALDSON, I. A. – JOERGENSEN, J. H.: Barley powdery mildew invertase is an alpha-glucosidase. Carlsberg. Res. Commun., 53, 1988: 421.
- FLEET, G. W. J. – KARPAS, A.: Inhibition of HIV replication by amino-sugar derivatives. FEBS Letters, 237, 1988: 128.
- HETTKAMP, H. – LEGLER, G. – BAUSE, E.: Purification by affinity chromatography of glucosidase I, an enoplasmic reticulum hydrolase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharide. Europ. J. Biochem., 192, 1984: 85.
- KELLY, C. T. – FOGARTY, W. M.: Microbial α -glucosidases. Process Biochem., 18, 1983: 6.

- NAKASONE, S. – OHSHITA, T. – IWAMASA, T.: Heterogeneity of pig lysosomal acid alpha-glucosidase. Affinity to Sephacryl S-200 gel and tissue distribution. *Biochem. J.*, 279, 1991: 719.
- RAUSHER, E. – NEUMANN, U. – SCHAICK, E. – BULOW, J.: Optimized conditions for determining activity concentration of α -amylase in serum, with 1,4- α -D-4-nitrophenylmaltoheptaoside as substrate. *Clin. Chem.*, 31, 1985: 14.
- SATOMURA, S.: α -amylase assay with use of a benzyl derivative of p-nitrophenyl- α -maltopentaosid, BG5P. *Clinica Chimica Acta*, 174, 1988: 315.
- STORR, T. – HALL, J. L.: The effect of infection by *Erysiphe pisi* DC on acid and alkaline invertase activities and aspects of starch biochemistry in leaves of *Pisum sativum* L. *New Phytol.*, 121, 1992: 535.
- VRBOVÁ, E. – MAREK, M.: Application of the Ugi reaction for the preparation of enzyme electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 239, 1990: 263.
- YOSHIKUMI, Y.: α -glucosidase inhibitor, 1-deoxynojirimycin and its N-substituted derivatives as anti-diabetic agents or anti-human immunodeficiency virus agents. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 3, 1991: 184.

Received March 6, 1995

α -glukosidasa z mikrobiálních zdrojů

Glukosidasy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu vazeb, na nichž se podílí glukosa. Vzhledem k tomu, že hrají významnou roli v buněčném metabolismu, jsou v přírodě velice rozšířené. Uplatňují se zejména v závěrečných fázích hydrolýzy poly- a oligosacharidů. Produkce α -glukosidasy byla prokázána u řady mikroorganismů. V předložené práci byla pozornost věnována α -glukosidase z *Aspergillus niger* a *Schizosaccharomyces pombe*.

Mikrobiální buňky byly kultivovány na médiích s různými zdroji uhlíku. Jako nejvhodnější induktory α -glukosidasy se ukázaly maltosa v případě *Aspergillus niger* a krátké dextriny u *Schizosaccharomyces pombe*.

Aspergillus niger produkoval pouze extracelulární α -glukosidasy. V médiu byly zjištěny dva odlišné enzymy s testovanou aktivitou, jeden se specifitou k maltose (maltasa) a druhý ke škrobu (glukoamylasa). Ani jeden z nich však nekatalyzoval štěpení heteroglykosidové vazby.

V případě kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* byla prokázána produkce jak intracelulární, tak i extracelulární α -glukosidasy. Aktivita intracelulární α -glukosidasy však v závěru stacionární fáze výrazně klesala. V médiu byla přítomna pouze jedna bílkovina s požadovanou aktivitou, která vykazovala schopnost štěpit kromě přiro-

zených sacharidů (maltosa, sacharosa) i syntetický heteroglykosid (PNPG). Polysacharidy tímto enzymem hydrolyzovány nebyly.

glukosidasy; *Aspergillus niger*, *Schizosaccharomyces pombe*; média s různými zdroji uhlíku; štěpení heteroglykosidové vazby

Contact address:

Ing. Kateřina Bílková, Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika,
tel.: 02/2435 3028, fax: 02/311 99 90; e-mail: fpbt-office@vscht.cz

**AGAR DIFFUSION ASSAY FOR NISIN QUANTIFICATION USING
Bacillus stearothermophilus AS AN INDICATOR ORGANISM***

Milada PLOČKOVÁ, Jana CHUMČHALOVÁ, Jitka HUSÁKOVÁ, Eva ŠVIRÁKOVÁ

*Institute of Chemical Technology – Department of Milk and Fat Technology,
Prague, Czech Republic*

Abstract: Nisin activity has been usually quantified by agar diffusion assay using various indicator microorganisms. In this work three sensitive strains, i.e. *Bacillus stearothermophilus* 796L, *Micrococcus luteus* 231 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* LTI30 were compared. *Bacillus stearothermophilus* inoculated on nutrient agar (pH 5.5 before sterilization), preincubated for 24 h at 3 °C was found the most suitable for nisin quantification. The diameter of zones of growth inhibition was linear to log concentration of nisin. The sensitivity and reproducibility of the diffusion assay was good, and the minimal detectable level (i.e. 0.1 IU/ml) qualifies the test for the detection of low nisin concentrations.

nisin; bacteriocine; agar diffusion assay; *Bacillus stearothermophilus*; *Micrococcus luteus*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*

During the past few years, there has been an increasing interest in “biological preservation” of fermented and non-fermented foods. Foods may be preserved either by the addition of starter cultures, that produce antimicrobial metabolites, or by the addition of their metabolites (Lucke, Earnshaw, 1991). These microbial metabolites may be used as natural alternatives or supplements to existing food preservatives. The most used preservatives of microbial origin are proteinaceous substances such as nisin, produced by strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and pediocin, produced by *Pediococcus acidilactici*.

Nisin similarly as other bacteriocins, reveals antimicrobial activity against a limited spectrum of microorganisms. It is bactericidal to the vegetative cells and out-growing spores of sensitive strains of Gram-positive bacteria, many of which are associated with the food spoilage and foodborne diseases (e.g. genera *Clostridium* and *Bacillus*). At present nisin addition is allowed

* This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic Grant No. 510/95/0990.

in 49 countries, including Czech Republic. Since the early days of its use as a preservative in processed cheese, numerous other applications have been realized (milk, flavoured milks, canned foods, alcoholic beverages) (Delves-Broughton, 1990).

On commercial scale nisin is used mostly as Nisaplin (Aplin and Barret, Ltd.). However strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* either traditionally used, or newly isolated or modified should be characterized by their nisin production and tested for its concentration in foods. For these reasons it is necessary to pay the attention to the improving of the assays for the determination of low concentrations of nisin.

The most common method for the determination of nisin is the diffusion assay using *L. lactis* subsp. *cremoris* (Mocquot, Lefebvre, 1956), *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus agalactiae* (Hirsch, 1950), *Micrococcus flavus* (Tramer, Fowler, 1964) or *Lactobacillus sake* (Rogers, Montville, 1991). For low diffusion rate of nisin through agar medium overnight refrigeration (Mocquot, Lefebvre, 1956), or addition of surfactants to the medium (Mocquot, Lefebvre, 1956; Tramer, Fowler, 1964) were used for improving of diffusion of nisin prior to the grow of the indicator strain.

In our work studying nisin quantification by agar diffusion assay three different indicator organisms previously tested for their sensitivity to nisin, i.e. *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

Bacillus stearothermophilus 796L was maintained on nutrient agar (Oxoid) at 3 °C and grown on nutrient agar for 24 h at 52 °C, *Micrococcus luteus* L231 was maintained on nutrient agar at 3 °C and grown on nutrient agar 24 h at 30 °C (both strains were obtained from the Collection of Milk Microorganisms of Milcom, Prague 6, CR). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* LTI30 (Institute of Chemical Technology, Prague 6, CR) was maintained at –25 °C in freeze-dried form and grown in MRS broth (Oxoid) for 16 h at 37 °C prior to use in the assay.

Nisin

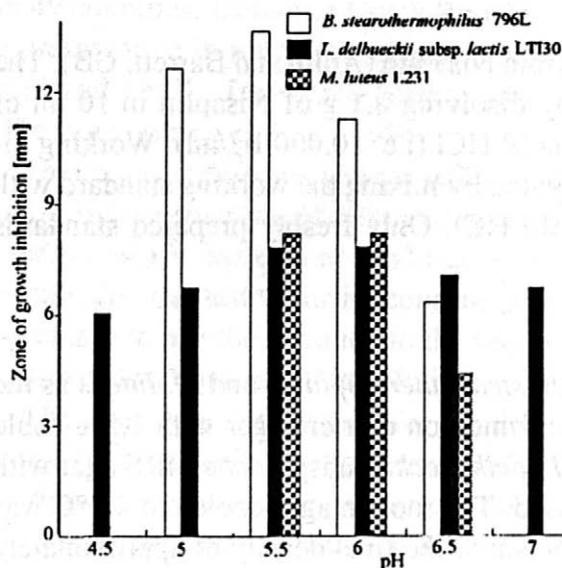
Nisin standards were prepared from Nisaplin (Aplin and Barrett, GB). The working standard was prepared by dissolving 0.1 g of Nisaplin in 10 ml of sterile solution of saline in 0.02 mol/l HCl (i.e. 10.000 IU/ml). Working dilutions used in the assay were prepared by mixing the working standard with sterile saline solution in 0.02 mol/l HCl. Only freshly prepared standards were used.

Assay Arrangement

The agar diffusion assay using *B. stearothermophilus* and *M. luteus* as the indicator microorganisms were performed on nutrient agar with 1.5% noble agar (Oxoid), for the assay using *L. delbrueckii* subsp. *lactis* MRS agar with 1.5% of agar No.1 (Oxoid) was used. The molten agar cooled to 45 °C was inoculated by indicator microorganism to the final density of approximately 10^5 to 10^6 cfu per ml as published previously (Rogers, Montville, 1991). To fix the size of the agar layer, 20 ml of molten agar per Petri dish (90 mm diameter) were used. The wells for the application of nisin standards were cut by means of a sterile cork borer (6.8 mm diameter) and 50 µl of nisin standard was pipetted into each well. The plates were incubated at optimal temperature for each indicator strain, both with and without preincubation at 3 °C for 24 h. Zones of the growth inhibition were measured after 16 h of incubation at optimal temperature for each indicator strain and their size diameter was expressed as the distance of the edge of the growth from the edge of the well. The result values were averages of five zones measured for each nisin concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

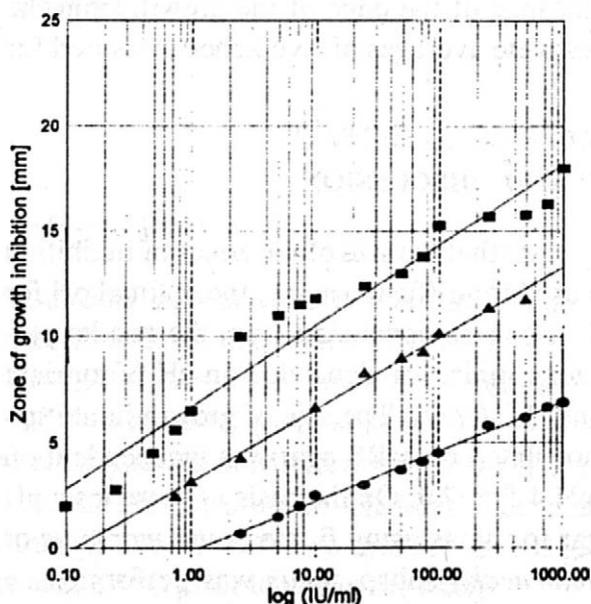
As we found in our preliminary tests that the size of the zones of inhibition depended on pH of agar medium used for diffusion assay, the optimal pH for each indicator strain was tested. It can be concluded from the results presented in Fig. 1 that the size of zone inhibition depended on pH of nutrient agar in *B. stearothermophilus* and *M. luteus*. The size of growth inhibition of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* inoculated on MRS agar was independent on pH of agar used in the range of pH 4.5 to 7.0. On the basis of these tests pH 5.5 was used for the nutrient agar for assays using *B. stearothermophilus* or *M. luteus*. The assay with *L. delbrueckii* subsp. *lactis* was performed on



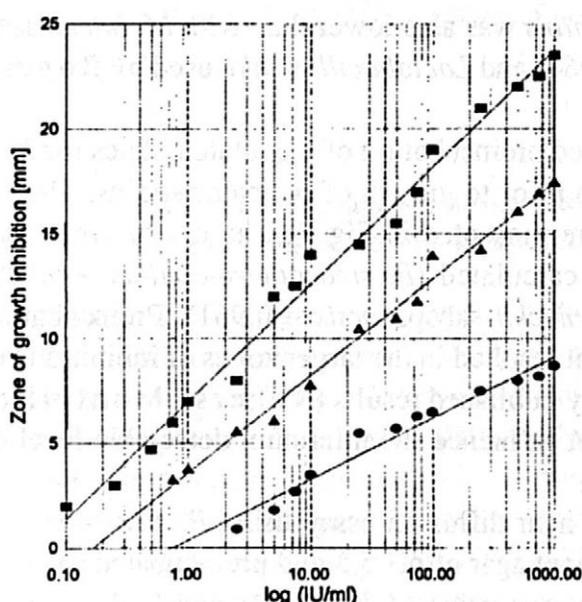
1. Effect of pH of agar medium on the diameter of zone of growth inhibition [mm] produced by nisin. Nisin concentration was 10 IU/ml and the growth of indicator strains was delayed by preincubation (24 h, 3 °C)

MRS agar of pH 6.5 as is used for testing the other antimicrobial substances (e.g. acidocin CH5) (Pločková, Chumchalová, 1995).

For each indicator strain the dependence of zone of growth inhibition on the nisin concentration was measured (Fig. 2). Similarly as in previously published works (Tramer, Fowler, 1964; Rogers, Montville, 1991) it was proved that the size of the inhibition zone was linear to the log



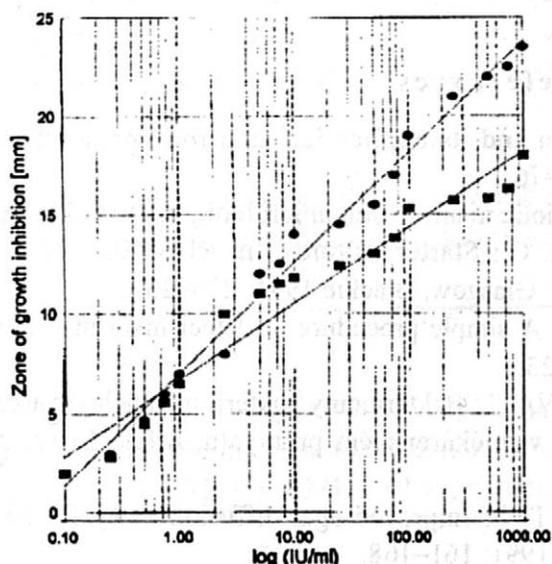
2. Zones of growth inhibition [mm] produced by various concentrations of nisin



3. Diameters of zones of growth inhibition [mm] produced by various concentrations of nisin.

of nisin concentration. The linear regression analysis was applied and R values for each indicator strain were for *B. stearothermophilus*, *M. luteus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 0.952, 0.993 and respectively 0.994.

B. stearothermophilus formed the largest zones of growth inhibition and also exhibited the highest sensitivity to low nisin concentrations (minimal detectable level was 0.1 IU/ml with *B. stearothermophilus*, 0.5 IU/ml with *M. luteus* and 1 IU/ml with *L. delbrueckii* subsp. *lactis*). The minimal detect-



4. Effect of preincubation on the diameter of zones [mm] of growth inhibition of *B. stearothermophilus*

able level of *B. stearothermophilus* was also lower than with *M. luteus* used by Tramer and Fowler (1964) and *Lactobacillus sake* used by Rogers and Montville (1991).

In further experiments we used preincubation of inoculated plates for 24 h at 3 °C to allow nisin diffusion prior to growth of indicator strains. The results for all indicator strains are presented in Fig. 3. The results were analysed as above and *R* values calculated (*B. stearothermophilus* – 0.989, *M. luteus* – 0.990 and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* – 0.961). Preincubation increased the nisin diffusion that resulted in the larger zones of inhibition but on the contrary to the previously published results (Rogers, Montville, 1991) the preincubation did not influence the minimum detectable level of any of three indicator strains.

It can be concluded that the agar diffusion assay using *B. stearothermophilus* 796L inoculated on nutrient agar of pH 5.5 and preincubated for 24 h at 3 °C was more sensitive than tests using *M. luteus* 231 and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LTI30. Preincubation increased the assay sensitivity by increasing the size of inhibition zones and minimized the variability between readings as published Rogers and Montville (1991). As the minimal detectable level was 0.1 IU/ml, the assay can be used for the detection of low concentrations of nisin in culture media and foods.

Acknowledgement

The authors thank Hana Ouředníčková and Eliška Olšanská for perfect technical assistance.

References

- DELVES-BROUGHTON, J.: Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.*, 43, 1990: 73–76.
- HIRSCH, A.: The assay of the antibiotic nisin. *J. Gen. microbiol.*, 4, 1950: 70–88.
- LUCKE, F. K. – EARNSHAW, R. G.: Starter cultures. In: RUSSELL, N. J. – GOULD, G. W.: *Food Preservatives*. Glasgow, Blackie 1991: 215–233.
- MOCQUOT, G. – LEFEBVRE, E.: A simple procedure to detect nisin in cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, 19, 1956: 322–323.
- PLOCKOVÁ, M. – CHUMCHALOVÁ, J.: Bakteriociny bakterií mléčného kvašení, perspektivní antimikrobiální látky v mlékárenském průmyslu. *Mlék. Listy*, 27, 1995: 31.
- ROGERS, A. H. – MONTVILLE, T. J.: Improved agar diffusion assay for nisin quantification. *Food Biotechnol.*, 5, 1991: 161–168.

TRAMER, J. – FOWLER, G. G.: Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Fd. Agric.*, 15, 1964: 522–528.

Received Mai 3, 1995

Kvantitativní stanovení nisinu agarovou difuzní metodou za použití indikátorového kmene *Bacillus stearothermophilus*

Při stanovení nisinu agarovou difuzní metodou byly testovány tři indikátorové kmeny – *Bacillus stearothermophilus*, *M. luteus* a *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

Nisin připravený ve formě naředěných roztoků o vytipovaných koncentracích ze standardu Nisaplinu (Aplin a Barrett, GB) v 0,02 mol/l HCl obsahující 0,75 % NaCl byl aplikován do otvůrků vytvořených korkovrtem do agaru. Pro kultivaci *B. stearothermophilus* 796L a *M. luteus* 231 byl použit živný agar o optimální hodnotě pH 5,5 a pro *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LTI30 MRS agar o pH 6,5. U *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LTI30 hodnota pH neovlivnila mez detekce (obr. 1). Všechny použité indikátorové kmeny vykazovaly lineární odpověď na koncentraci nisinu vyjádřenou logaritmičticky. Na agaru s *B. stearothermophilus* 796L se vytvořily největší inhibiční zóny u všech sledovaných koncentrací v porovnání s oběma kmeny a dosažitelná mez detekce s použitím *B. stearothermophilus* 796L byla 0,1 IU/ml, pro *M. luteus* 231 0,5 IU/ml a *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LTI30 1 IU/ml. Použití předinkubace (24 h, 3 °C) urychlilo difuzi nisinu, což mělo za následek větší inhibiční zóny, ale minimální detekovatelná hladina zůstala stejná (obr. 2 a 3).

Popisovaná difuzní metoda s indikátorovým kmenem *B. stearothermophilus* 796L dosáhla ve srovnání s publikovanou zahraniční metodou (Rogers, Montville, 1991) využívající ke stanovení nisinu kmen *Lactobacillus sake* širší meze detekce, což jí dává velké předpoklady pro využití v potravinářském průmyslu doma i v zahraničí.

nisin; bakteriocin; agarová difuzní zkouška; *Bacillus stearothermophilus*; *Micrococcus luteus*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*

Contact Address:

Ing. Milada Pločková, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav technologie mléka a tuků, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika,
tel.: 02/2435 3275, fax: 02/311 99 90, e-mail: fpbt-office@vscht.cz

Ústav zemědělských a potravinářských informací

vydal

ZAHRADNICKÝ NAUČNÝ SLOVNÍK

Slovník je koncipován jako moderní odborná encyklopedie všech oborů zahradnictví, tj. ovocnářství, zelinářství, květinářství, sadovnictví, školkařství, vinařství, pěstování léčivých a aromatických rostlin, kultivovaných hub, zpracování ovoce a zeleniny i tropického a subtropického zahradnictví.

V jednotlivých přehledných a srozumitelných heslech jsou shrnuty současné poznatky nejen z oblasti zahradnictví, ale i z oblastí vědních oborů, které jsou zdrojem pokroku v zahradnictví.

Ve slovníku jsou vysvětleny nejzávažnější pojmy užívané v botanice, fyziologii, genetice a šlechtění, biotechnologii a ochraně rostlin. Tím se slovník stává potřebnou pomůckou každému, kdo pracuje s odbornou nebo vědeckou literaturou. S velkou zodpovědností jsou ve slovníku uvedeny platné vědecké i české názvy rostlin, jejich botanické členění i autoři názvů, což umožňuje napravit časté nepřesnosti uváděné v naší odborné literatuře.

Předpokládaný rozsah slovníku bude 5 dílů formátu A4 (každý rok vyjde jeden díl). První díl má 440 stran textu včetně pérovek a černobílých fotografií a 32 barevných tabulí.

Cena prvního dílu je 295 Kč (bez poštovného).

Závazné objednávky zasílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
Encyklopedická kancelář
Slezská 7
120 56 Praha 2

THE FATTY ACID COMPOSITION IN *Hippophae rhamnoides* L. OILS

Jitka MORAVCOVÁ, Vladimír FILIP¹, Kamila KRŮSTKOVÁ,
Vladislav KUBELKA², Valentina JEDINÁKOVÁ

Institute of Chemical Technology – Department of Chemistry of Natural
Compounds, ¹Department of Milk and Fat Technology, and ²Central Laboratories,
Prague, Czech Republic

Abstract: Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters was used to determine the composition of *Hippophae rhamnoides* L. oils isolated from seeds, skins, and flesh. Two varieties were examined and the results were compared with those reported previously.

fatty acids; gas-liquid chromatography; *Hippophae rhamnoides* L.; sea buckthorn; vegetable oil

Hippophae rhamnoides L. (sea buckthorn) berries have been used as a rich source of vitamin C for a long time (Sabalitschka, Michels, 1946; Mascherpa, Marangoni, 1947; Feldheim, Jarmatz, 1956; Gebauer, 1958; Kolodziejcki et al., 1960; Lipparini, 1964; Shnaidman et al., 1965; Ikramova et al., 1977). Ascorbic acid content ranging from 0.2 to 0.9% (w/w) varied with the region in which the fruit was grown. Carotenoids with A-provitamin activity (β -carotene, cryptoxanthin, γ -carotene, and β -zeacarotene) have been also found (Kudritskaya et al., 1989) as well as vitamin E and B-vitamins (Feldheim, Jarmatz, 1956). Such a unique composition of vitamins is due to the relative high fat content both in seeds and pulp. The sea buckthorn oil can be isolated by various methods including centrifugation (Goryaev et al., 1972), diffusion in any vegetable oil (Kazantsev, Okhin, 1958; Golubev et al., 1990) and extraction with organic solvents (Abutalybov et al., 1978; Vetrov et al., 1981; Pimenova et al., 1984; Jing et al., 1991; Moniava et al., 1986; Speteanu et al., 1992) or with supercritical carbon dioxide (Gao, 1989).

Major fatty acids of neutral lipids in seed oil included oleic acid, linoleic acid, and other largely unsaturated acids (Chen et al., 1990; Kaufmann, Roncer, 1955; Aslanov et al., 1985; Bolotova et al., 1984) while pulp oil contained unusually high amount of palmitoleic acid (Shugam,

Shnaidman, 1967; Mamedov et al., 1984; Zhmyrko et al., 1978). The crude oil is coloured deep orange-red by the high amount of carotenoides. The unsaponifiable fraction of sea buckthorn oil further contains tocopherols, sterols, phenolic compounds, free fatty acids, and essential amino acids (Shaidman, Shugam, 1966; Lagazidze et al., 1984; Zhmyrko et al., 1978; Mirgayosiyev, 1992).

The sea buckthorn oil has been widely used for various purposes in the countries of origin. The vitamin concentrates have been produced, it is added as a quality improver to the foamed confectioneries based on agar-containing syrups (Koryachkina et al., 1992), or it is a constituent of skin regenerating cosmetics (Speteanu et al., 1992; Hasegawa, Koresawa, 1990), and hair shampoo (Kloková et al., 1993). The oil also had a therapeutical effect on eye burns (Nikulín et al., 1992), on gastric ulcer (Nasyrov et al., 1981), and on skin re-epithelization (Motoroi et al., 1983). The healing time of postoperative wounds was shortened by adding this oil into the ointment (Kalnbers et al., 1985) and finally, the hepatoprotective actions of seed oil against injury induced by tetrachloromethane were described (Cheng et al., 1992). In rats fed a high-lipid diet, the oil lowered the total serum cholesterol (Chou et al., 1986).

These results briefly summarized above in connection with increasing interest in the cultivation of sea buckthorn prompted us to focus on the lipid composition of two licensed *Hippophae rhamnoides L.* varieties grown in the Czech Republic which were never studied before.

MATERIAL AND METHODS

Material

The fruits of two *Hippophae rhamnoides L.* varieties, e.g. Hergo and Leikora, were collected on the plantation of the agricultural cooperative ADAVO Velký Osek in October, 1992. Berries were immediately frozen, stored at -20°C and used as received.

Sample Preparation

Defrosted berries (50 g) were crushed and the flesh was filtered off through a thin cotton net. The seeds and the skins were separated by hand after drying for 2 h at 105°C . The yields of flesh, seeds and skins as an average of three experiments are given in Table I.

I. The yield (% w/w) of flesh, seeds and skins obtained from *Hippophae rhamnoides L.*

	Hergo	Leikora
Number of berries/50 g	134	107
Flesh	78.8	85.5
Seeds and skins (wet)	21.2	14.5
Seeds (dry)	5.1	4.3
Skins (dry)	4.4	3.9

Oil Isolation

A 5-g amount of dried and pulverized seeds or skins was refluxed with 150 ml of dichloromethane under nitrogen atmosphere for 3 h. After cooling, the mixture was filtered through a glass filter (G3, pore size 16–40 μm , Schott, Jena, Germany) covered with a filter-paper (LS 14, pore size 4.4 μm , Schleicher-Schull, Feldbach, Switzerland). The supernatant was washed with 100 ml of dichloromethane. The filtrate was evaporated under vacuum to dryness and dried.

Flesh (30 g) was extracted three times with 75 ml of chloroform. The organic layers were collected, dried with magnesium sulfate, and evaporated under vacuum to dryness. The yields of oils are given in Table II.

Transesterification

The oil (0.2 g) was stirred with sodium methoxide in methanole (0.5 mol/l, 15 ml) at ambient temperature under nitrogen atmosphere for 6 h. The mixture was then neutralized with acetic acid and evaporated under vacuum to dryness. The residue was separated between water (50 ml) and diethyl ether (50 ml), and the water layer was further extracted with diethyl ether (30 and 15 ml). Ether fractions were collected and washed with sodium bicarbonate solution and water. After drying with magnesium sulfate, ether solution was evaporated to dryness. A solution of fatty acids methyl esters in hexane was filtered prior being analyzed by GLC.

Gas-liquid Chromatography

Analyses were performed on a Chrom 4 Chromatograph (Laboratorní přístroje, Prague, Czech Republic) equipped with FID detector. The solution (10%, w/w) of fatty acid methyl esters in hexane was analyzed on the packed column 2 400 x 3 mm filled with 15% ethylenglycol adipate on Chromaton

N-AW-DMCS (0.125–0.160 mm). Isothermal run at 190 °C was applied with nitrogen as a carrier gas at flow rate 30 ml/min. Fatty acid methyl esters were identified according to retention time of standards and results are given as % (w/w).

RESULTS AND DISCUSSION

Hippophae rhamnoides L. seems not to be a typical oily plant because lipids are distributed between all parts of berries (Table II). The highest content of lipids was found in the skins for both varieties and these contents as well as those for the seeds and the flesh are comparable to the results published previously. Concerning the total oil content practically no significant difference was cropped up between Hergo and Leikora varieties.

II. The comparison of the oil content (% , w/w) in Hergo and Leikora varieties to published data

Production sites	Eastern Siberia	Pamir	Dagestan	Germany	Czech Republic	
					Hergo	Leikora
Seeds	10.3	5–36	11.9	8.2–10.4	14.6	16.3
Skins	23.0	–	36.0	25.2	35.8	18.8
Flesh	–	5.5–17	9.3	–	3.5	4.2
Fruit	–	5.1–13	3.3–4.5	4.8–5.4	6.6	5.9
References	a	b	c	d	this paper	

^aSai-Moiseeva (1940); ^bYusufbekov et al. (1978); ^cDalgatov et al. (1983); ^dFranke, Mueller (1983)

Interestingly, the seeds of varieties Hergo and Leikora contain only approximately 12 and 19% of the total oil, respectively. This fact clearly prefers the whole fruits for the manufacturing of sea buckthorn oil. In addition, the tocopherol concentration in oil from flesh and seeds is similar but the carotenoid content of the flesh oil exceeds many times that of the seed oil (Dalgatov et al., 1983; Zhmyrko et al., 1978).

The fatty acid composition in the seed oil of both varieties was quite different from the composition of the flesh and skin oils (Table III). The major acid of seed oil was oleic acid followed by palmitic and linoleic acid which

III. The fatty acids composition (% w/w) of *Hippophae rhamnoides* L. oils

Acid	Hergo			Leikora		
	seeds	skins	flesh	seeds	skins	flesh
a	8.7	2.1	2.0	4.4	0.6	2.3
10:0	0.2	<0.1	0.3	<0.1	<0.1	0.4
12:0	0.4	<0.1	0.3	<0.1	<0.1	0.2
14:0	0.3	0.2	0.3	0.3	<0.1	0.6
16:0	14.8	35.3	45.8	18.1	31.1	36.4
16:1	2.4	16.6	18.2	2.1	20.2	21.4
18:0	6.6	1.6	1.2	7.0	2.4	0.7
18:1	29.9	26.8	22.9	31.6	24.3	34.1
18:2	13.6	1.6	<0.1	13.9	3.3	<0.1
18:3	3.5	1.7	0.3	5.7	2.5	<0.1
20:0	1.4	0.2	0.4	0.9	0.2	0.4
20:1	0.8	<0.1	0.2	0.4	0.1	0.2
22:0	11.0	5.6	1.9	4.5	4.9	0.6
22:1	4.2	3.0	0.6	2.3	3.5	0.1
24:0	0.8	5.4	0.3	1.1	4.2	0.3
24:1	1.3	<0.1	3.3	5.1	1.2	1.3
b	0.1	0.2	4.9	2.4	1.2	0.8
Σ unst. FA	68.0	49.9	45.6	61.1	55.1	57.3
Σ std. FA	23.2	47.8	47.5	32.1	43.1	39.6

^avolatile compounds with retention time shorter than those of palmitic acid; ^bremaining unidentified compounds

are undoubtedly involved in constitution of principal triglycerides. The total concentration of unsaturated acids is strongly prevailing over saturated fatty acids (unsaturated/saturated): Hergo 1.6, Leikora 1.9. Seed oils also contain about 10% C₂₀, C₂₂, and C₂₄ saturated fatty acids and about 6.5% C₂₀, C₂₂, and C₂₄ unsaturated fatty acids which were not reported previously. Compared with fatty acid distribution known from literature (Table IV), Hergo and Leikora varieties exhibit the higher level of saturated acids and an opposite ratio of oleic to linoleic acid. Interestingly, the linolenic acid concentration estimated is about five times lower than it was published. These observations

IV. Distribution of fatty acids (% w/w) in *Hippophae rhamnoides* L. flesh and seed oil

Acid	Flesh					Seeds	
14:0	–	0.3	–	0.2	0.3	–	0.2
16:0	28.5–44.6	26.2	47 ^a	30.9	28.1	11.6 ^a	13.2
16:1	10.4–22.2	–	22.2	45.6	28.3	19.3	41.1
18:0	–	3.2	–	1.1	4.2	–	7.7
18:1	20.9–37.9	–	37.9	9.4	18.4	44.9	11.0
18:2	–	10.8	3.9	2.2	9.2	34.7	39.6
18:3	–	4.5	2.2	1.6	6.1	27.0	21.8
Σ unst. FA	–	70.3	53.0	68.0	67.4	88.3	78.8
Σ std. FA	–	29.7	47.0	32.0	32.0	11.6	21.1
References	b	c	d	e	f	g	b

^aΣ std. FA expressed as palmitic acid; ^bMamedov et al. (1984); ^cShugam, Shnaidman (1967); ^dFranke, Mueller (1983); ^eMuravev et al. (1984); ^fAslanov, Novruzov (1976); ^gKaufmann, Roncero (1955)

are not so surprising because the proportions of different fatty acids may vary considerably. It is now known that few vegetable oils reflect the influence of climate, temperature, genetic factors, and ripening.

The fatty acid distribution of sea buckthorn seed oil is similar to that of peanut oil for which the following ranges of fatty acid content based upon an evaluation of 82 genotypes were reported: C_{16:0} 7.4–12.9%, C_{18:0} 1.6–5.3%, C_{18:1} 35.7–68.5%, C_{18:2} 14.0–40.3%, C_{20:0} 0.9–2.2%, C_{20:1} 0.6–2.0%, C_{22:0} 1.3–5.1%, and C_{24:0} 0.6–2.0% (Sonntag, 1979). Furthermore, the content of oleic acid increased during ripening while linoleic acid content decreased. The oleic/linoleic acid ratio correlated with growth cycle time and was also found to be an excellent indicator of oil stability. Peanut oil contains only traces of linolenic acid.

The unsaturated/saturated acid ratio for skin and flesh oils shows a difference between the two varieties studied (Table III). For variety Leikora, total unsaturated acids are still prevailing, and the ratio was: skins 1.3, flesh 1.4. On the other hand, both skin and flesh oils of variety Hergo contain approximately equal levels of unsaturated and saturated acids. The fatty acid distributions in skin and flesh oils correspond to results given by Franke,

and Mueller (1983), who evaluated sea buckthorn grown in Germany (Table IV). This can suggest that the fatty acid composition of this type of pulp oil is influenced less by the various conditions mentioned above. This conclusion could be important for industry process and pulp oil can be favoured. Palmitic acid and oleic acid are the major fatty acids. The extremely high content of palmitoleic acid (16–20%) confirms the values reported previously (Table IV). Sea buckthorn pulp oil seems to be a unique type among all vegetable oils. The concentration of palmitoleic acid can be advantageously used as a quality criterion in oil production using extraction with any vegetable oil.

In our opinion, the applicability of *Hippophae rhamnoides* L. oil will increase in food industry as well as in pharmaceutical or cosmetic production in the near future. Further attention should be focused on volatile oil component identification and characterization of the unsaponifiable fraction.

Conclusion

The results demonstrate that genetic factors and growing conditions can cause mainly a deviation in *Hippophae rhamnoides* L. seed oil, whereas the distribution of fatty acids in skin and flesh oils is kept rather constant. For the oil production, the whole fruit is suitable raw material. Both Leikora and Hergo varieties gave similar overall yield of oil with unsaturated acids prevailing only in the case of variety Leikora.

References

- ABUTALYBOV, M. G. – ASLANOV, S. M. – NOURUZOV, E. N. – GASANOVA, Z. I.: Sea buckthorn oil from oil cakes. U.S.S.R. SU 618404, 1978.
- ASLANOV, S. M. – MAMEDOV, S. Sh. – FARKHADOVA, M. T.: Fatty acid composition of the oil of sea buckthorn seeds. Maslo-Zhir. Prom.-st., 1985: 11–12.
- ASLANOV, S. M. – NOVRUZOV, E. N.: Oil from *Hippophae rhamnoides* pulp. Khim. Prir. Soedin., 1976: 652–653.
- BOLOTOVA, M. N. – TSYBIKOVA, D. Ts. – DARZHANOVA, G. Zh. – NETCHAEV, A. P.: Fatty acid composition of pharmaceutical grade *Hippophae rhamnoides* oil and oil cake. Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Pishch. Tekhnol., 1984: 112–113.
- CHEN, J. – JIANG, Z. – QIN, W. – NI, M. – LI, X. – HE, Y.: Chemical composition and characteristics of sea buckthorn fruit and its oil. Linchan Huaxue Zu Gongye, 10, 1990: 163–175; Chem. Abstr. 115, 1991: 56998.

- CHENG, T. – LI, T. – MA, Z. – CAO, Z. – ZHANG, P.: Protective action of seed oil of *Hippophae rhamnoides* L. (HR) against experimental liver injury in mice. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi*, 26, 1992: 227–229; *Chem. Abstr.* 118, 1993: 94288.
- CHOU, S. – HUANG, D. – JIANG, Z. – YE, Z.: Chemistry and hypolipemic effect of Fructus hippophae oil. *Zhongcaoyao*, 17, 1986: 238–239; *Chem. Abstr.* 105, 1986: 108272.
- DALGATOV, D. D. – MURATCHAEVA, P. M. – OMARIEV, M. M.: Characteristic of the fruit of Dagestan populations of *Hippophae rhamnoides* L. *Rastit. Resur.*, 19, 1983: 351–353.
- FELDHEIM, W. – JARMATZ, E.: Occurrence of β -carotene and the vitamin content of sea buckthorn berries. *Vitamine u. Hormone*, 7, 1956: 263–268.
- FRANKE, W. – MUELLER, H.: Quantity and fatty acids composition of fruit, pulp and seed oil of sea buckthorn fruits. *Angero. Bot.*, 57, 1983: 77–83.
- GAO, Z.: Glyceridic oil in *Hippophae rhamnoides* and its extraction with supercritical carbon dioxide. *Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu* CN 1031108 (1989); *Chem. Abstr.*, 113, 1990: 76900.
- GEBAUER, H.: Vitamins and polants. *Qualitas Plant et Materiae Vegetabiles*, 1958: 161–165; *Chem. Abstr.*, 53, 1959: 6476d.
- GOLUBEV, V. N. – KOLESNIK, A. A. – ISMAILOV, T. K.: Use of membranes in processing of sea buckthorn. *Pishch. Prom.-st.*, 1990: 32–35.
- GORYAEV, M. I. – GLUSHNEV, M. P. – AGEEVA, L. D. – KHIMENTSOV, N. I.: Sea buckthorn oil. U.S.S.R. SU 340432, 1972.
- HASEGAWA, M. – KORESAWA, T.: Cosmetics containing *Hippophae rhamnoides* oil fatty acids and other compounds. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 02108613 (1990); *Chem. Abstr.*, 113, 1990: 138328.
- IKRAMOVA, M. M. – GOLOVATYI, A. I. – TROFIMOVA, E. P.: Content of vitamin C, carotene and crude fat in *Hippophae rhamnoides* L. berries from the Western Pamirs. *Izv. Akad. Nauk Tadzh. SSR, Otd. Biol. Nauk*, 1977: 51–54; *Chem. Abstr.*, 88, 1978: 117827.
- ILIZAROV, G. A. – KUSTUROV, V. I. – UVAROVA, E. S.: Film-forming composition containing iodine for wound healing. U.S.S.R. SU 1540830, 1990.
- JING, J. – ZHANG, W. – QIAO, Q.: Rhamnoide oil extraction method. *Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu* CN 105021,6 1991; *Chem. Abstr.*, 115, 1991: 230924.
- KALNBERS, V. – NAKHIMOVSKAYA, Z. I. – OZOLINS, L. – KATKEVICH, A. K. – SHUBENKO, F. A. – KOSHELEV, Yu. A.: Healing agent. U.S.S.R. SU 884189, 1985.
- KAUFMANN, H. P. – RONCERO, A. V.: Oil from the seed of *Hippophae rhamnoides*. *Grasas y accites*, 6, 1955: 81–87; *Chem. Abstr.* 50, 1956: 2191g.
- KAZANTSEV, V. O. – OKHIN, A. V.: Sea buckthorn oil. U.S.S.R. SU 110280, 1958.

- KLOKOVA, G. I. – OGILETS, M. V. – SHUKHMAN, M. I. – SIMONOVA, L. V. – ZOBOVA, O. B. – TARASOVA, L. A. – RAKISHSHAYA, M. S. – CHIGARIND, K. M.: Shampoo for lightening hair and giving it a silky appearance. U.S.S.R. SU 1742703, 1993.
- KOLODZIEJSKI, J. – GILL, S. – LUCKIEWICZ, I.: The effect of certain stabilizers on vitamin C stability in sea buckthorn juice during storage. *Acta Polon. Pharm.*, 17, 1960: 293–300.
- KORYACHKINA, S. Ya. – KORYACHKIN, V. P. – SANDRAKOVA, I. V. – SKOGOREVA, S. A.: Preparation of an aerated creamed confectionery mass. U.S.S.R. SU 1785423, 1992.
- KUDRITSKAYA, S. E. – ZAGORODSKAYA, L. M. – SHISHKINA, E. E.: Carotenoids of the sea buckthorn variety Obil'naya. *Khim. Prir. Soedin.*, 1989: 852–853.
- LAGAZIDZE, D. S. – MURAV'eva, D. A. – BOSTOGANASHVILI, V. S.: Content of pharmacologically active compounds in oil from the fruit pulp of *Hippophae rhamnoides* grown in Georgia (USSR). *Khim. Pharm. Zh.*, 18, 1984: 713–717.
- LIPPARINI, L.: The ascorbic acid content of the fruit of sea buckthorn. *Quaderni Merceol.*, 3, 1964: 147–153; *Chem. Abstr.*, 64, 1966: 16535.
- MAMEDOV, S. Sh. – ASLANOV, S. M. – ISMAILOV, N. M. – GIGIENOVA, E. J. – UMAROV, A. U.: Fatty acid composition of oil from sea buckthorn. *Maslo-Zhir. Prom.-st.*, 1984: 18–19.
- MASCHERPA, P. – MARANGONI, P.: Vitamin C in *Hippophae rhamnoides*. *Quaderni Nutrie.*, 10, 1947: 5–20; *Chem. Abstr.*, 43, 1949: 5510d.
- MIRGAYOSIYEV, M.: Essential amino acids in fruit of *Hippophae rhamnoides* L. (Western Pamir). *Rastit. Resur.*, 28, 1992: 75–79.
- MONIAVA, I. I. – KERESLIDZE, E. V. – CHKHATARASHVILI, L. E.: Method of producing sea buckthorn oil from press. U.S.S.R. SU 1275032, 1986.
- MOTOROI, M. – BRAD, I. – ZAMFIRESCU, S. – POPESCU, V. – TAMAS, V.: Oily medicinal solution with a regeneration and re-epitelization effect. *Rom. RO* 81790, 1983.
- MURAVEV, I. A. – LAGAZIDZE, D. S. – BOSTOGANASHVILI, V. S.: Properties and fatty acid composition of flesh oil from *Hippophae rhamnoides* grown in Gruzia. *Khim. Pharm. Zh.*, 18, 1984: 461–463.
- NASYROV, Kh. M. – KIN'YABULATOVA, K. Z. – SERDYUK, L. S. – LAZAREVA, D. N. – KLISHO, G. K.: Effect of preparations containing vitamins on the nuclear DNA and RNA cells of the mucous membrane of the stomach in rats with neurodystrophic ulcers. Deposited Doc. 1981, VINITI 4210–81; *Chem. Abstr.*, 98, 1983: 15775.
- NIKULIN, A. A. – YAKUSHEVA, E. N. – ZAKHAROVA, N. M.: Comparative pharmacological estimation of *Hippophae*, *Rosa* and plantain oils in experimental eye burns. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 55, 1992: 64–66.
- PIMENOVA, N. S. – IVANOVA, R. A. – YALYMYCHEVA, G. V. – ZEGELMAN, A. B. – KLIMOVA, N. N. – ANDRONOV, V. A. – KOZLOV, E. J. – TSEPALOV, V. G.: Study of stability of *Hippophae* oil obtained by extraction with Freon-12 and hexane. *Khim. Pharm. Zh.*, 18, 1984: 338–343.

- SABALITSCHKA, T. – MICHELS, H.: The vitamin C content of shallow thorn berries from shore and alpine regions. Sudent. Apoth. Ztg., 86, 1946: 153–154.
- SAI–MOISEEVA, E. G.: Wild berries in eastern Siberia. Trudy Vostock. Sibirsk. Gosudarst. Univ., 4, 1940: 93–99.
- SHNAIDMAN, L. O. – KUSHCHINSKAYA, I. N. – AFANAS'EVA, V. S.: Studies of biologically active substances in natural raw material for production of vitamins and dyes. Proizv. i Ispol'z. Vitaminov, Antibiotikov i Biol. Aktivn. Veshchestv, 1965: 91–107.
- SHNAIDMAN, L. O. – SHUGAM, N. A.: Determination and identification of tocopherols in fruits and oil of sea buckthorn. Izv. Vysshikh. Uchebn. Zavedenii Pishchevaya Tekhnol., 1966: 39–41.
- SHUGAM, N. A. – SHNAIDMAN, L. O.: Fatty acids and phospholipids in sea buckthorn oil. Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved. Pishch. Tekhnol., 1967: 52–54.
- SONNTAG, N. O. V. Peanut oil. In: SWERD, D.: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol. 1. 4th Edition. New York, A Wiley-Interscience Publ. 1979: 363–368.
- SPETEANU, R. – CISMARU, S. – SPETEANU, I. M. – CIUTARU, A. – CISMARU, C.: Trophic, skin-regenerating cosmetic composition. Rom. RO 101667, 1992.
- VETROV, P. P. – IVANAUSKAS, V. – PROKOPENKO, A. P. – DOLGANENKO, L. G.: Study of possibilities of extracting Oleum hippophae using liquefied gas. Pharm. Zh. (Kiev), 1981: 65–67.
- YUSUFBEKOV, Kh. Yu. – GLAZUNOVA, E. M. – GACHECHILADZE, N. D. – BONDAR, V. V. – POTAPOVA, I. M. – ZAPRIJAGAEV, M. L.: Chemical and biological study of some forms of sea buckthorn in the Pamirs. Dokl. Akad. Nauk Tadzh. SSR, 21, 1978: 65–68.
- ZHMYRKO, T. G. – GIGIENOVA, E. J. – UMAROV, A. U.: Vitamins from the oils of *Hippophae rhamnoides* fruit. Khim. Prir. Soedin., 1978 : 313–17.

Received March 6, 1995

Složení mastných kyselin v olejích rostliny *Hippophae rhamnoides* L.

Plody rakytníku řešetlákového *Hippophae rhamnoides* L. jsou dlouhou dobu oblíbené pro vysoký obsah vitamínu C (0,2–0,9 % hmot.) doprovázeného provitaminy A, vitamínem E a vitaminy skupiny B. Toto jedinečné složení vitaminového komplexu je dáno relativně vysokým obsahem lipidů v celém plodu (semena, slupky, dužnina). Rakytníkový olej se vyrábí v oblastech původního výskytu (východní Sibiř, Pamír, Čína, oblast Středozemního moře) a používá se jako aditivní látka do potravin a v kosmetice na výrobu krémů a šamponů. Rakytníkový olej má velice zajímavé biologické účinky – urychluje hojení operačních ran, podporuje reepitelizaci tkáně, hojí spáleniny vzniklé např. po ozařování při léčbě rakoviny a má hepatoprotektivní účinek při otravách organismu chlorovanými látkami.

Zemědělské družstvo ADAVO, Velký Osek pěstuje dvě u nás povolené odrůdy, tj. Hergo a Leikora. Protože je o jeho rozšíření a výrobu oleje zájem a současně chybí jakékoli údaje o složení oleje z našich klimatických podmínek, soustředili jsme se v prvním kroku na studium distribuce mastných kyselin.

Olej byl izolován ze semen, slupek a dužniny obou odrůd extrakcí dichlormethanem a po transesterifikaci byla směs methylesterů mastných kyselin analyzována plynovou chromatografií. Poměr nenasycených kyselin k nasyceným v oleji ze semen činil u odrůdy Hergo 1,6 a u odrůdy Leikora 1,9. Nejvíce byly zastoupeny kyseliny olejová, palmitová a linolová. Toto složení je odlišné od publikovaných údajů, podle nichž je obrácený poměr koncentrací kyselin linolové a olejové a zhruba pětkrát vyšší zastoupení kyseliny linolenové. V oleji ze slupek a dužniny byla ve shodě s literaturou nalezena kyselina palmitová jako majoritní, dále kyselina olejová a mimořádně vysoká koncentrace (až 21 %) kyseliny palmitolejové. Oleje ze slupek a dužniny obsahovaly v případě odrůdy Hergo stejné zastoupení nenasycených a nasycených kyselin, naopak odrůda Leikora vykazovala opět vyšší zastoupení nenasycených mastných kyselin (poměr 1,3). Zdá se, že klimatické podmínky a genetické vlivy působí největší změny ve složení oleje ze semen, zatímco složení oleje slupek a dužniny je víceméně stálé.

Pro účely zpracovatelské je zřejmě výhodnější izolovat rakytníkový olej z celých plodů, které obsahují v čerstvém stavu u odrůdy Hergo 6,6 % a u odrůdy Leikora 5,9 % oleje, obsah kyseliny palmitolejové může sloužit jako kritérium kvality oleje zejména tehdy, bude-li vyráběn metodou extrakce jiným rostlinným olejem. Z hlediska o něco vyššího obsahu nenasycených kyselin je vhodnější odrůda Leikora.

V dalším výzkumu se zaměříme na složení těkavých podílů oleje a na dosud neidentifikované sloučeniny postižitelné metodou GC-MS. Rovněž budeme studovat složení nezmýdelnitelného podílu.

Hippophae rhamnoides L.; mastné kyseliny; plynová chromatografie; rakytník řešetlákový; rostlinné oleje

Contact Address:

Ing. Jitka Moravcová, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav chemie přírodních látek, Technická 5, 166 28 Praha, Czech Republic,
tel.: 02/2435 4283, fax: 02/311 99 90, e-mail: fpbt-office@vscht.cz

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Konference o cizorodých látkách na Slovensku

Ve dnech 9. až 11. května 1995 uspořádal v Tatranské Štrbě Ústav preventivní a klinické medicíny Bratislava společně se Slovenskou společností pro chemii a toxikologii životního prostředí, Slovenskou zemědělskou a potravinářskou inspekcí a Státním zdravotním ústavem Poprad konferenci „Cizorodé látky v poživatinách“. Byla v pořadí již 16. setkáním odborníků na toto téma a vzhledem k blížícímu se životnímu jubileu jednoho z hlavních zakladatelů této tradice byla věnována Ing. Alexandru Sokolayovi, DrSc.

Na dobře navštívené konferenci (kolem 160 účastníků ze Slovenska, z České republiky i z USA) bylo v přednesených referátech (27) a v posterech (23) prodiskutováno téměř celé široké spektrum problematiky cizorodých látek: koncepce zdravotní legislativy v oblasti výživy, kontrola, akreditace laboratoří, monitorovací a informační systémy cizorodých látek v potravinách a krmivech a jejich realizace, analytika včetně metrologické kontroly měřidel a laboratorních zařízení, organizace kruhových testů atd. Na to navázaly informace o současné expozici populace SR a ČR (a jejich určitých skupin) ke kontaminantům v konkrétních potravinách, např. v ovoci (polycyklickými aromatickými uhlovodíky), v potravinách živočišného původu (těžkými kovy v imisních spadech, PCB a rezidui pesticidů), v medu (těžkými kovy), v léčivých rostlinách (rezidui některých herbicidů), v kávě (polyaromatickými uhlovodíky), v mléce a krmivu (PCB), v zelenině, bramborách a sýrech (dusičnany a dusitany), v lihovinách (ftaláty), v pivu (mykotoxinem deoxynivalenolem), jakož i v rozličných potravinách (arzenem, selenem). Některé referáty byly věnovány speciálně zatížení dětského organismu toxickými prvky, organickými kontaminanty, dusičnany a dusitany ve stravě.

Všechny příspěvky byly v plném znění zařazeny do sborníku, který je k dispozici u pořadatelů.

Organizace byla tradičně na vysoké úrovni a celá konference se stala i pěknou manifestací potřebné a oboustranně užitečné spolupráce českých a slovenských odborníků při řešení společných problémů.

doc. Ing. Jaroslav Prugar, DrSc.

STANOVENÍ SALMONEL METODOU ELISA*

Determination of Salmonellas by ELISA

Igor HOCHÉL, Kateřina MÁLKOVÁ, Pavel RAUCH

*Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology,
Prague, Czech Republic*

Abstract: The sandwich ELISA for determination (detection) of *Salmonella enteritidis* cells has been developed, using either commercially available antibody, or laboratory prepared antibody against somatic antigen O: 9, 12. The detection limit of the method is $3.9 \cdot 10^4$ cells/ml (commercially available antibody – PLK), or $6.2 \cdot 10^3$ cells/ml (laboratory prepared antibody – PL1). The antibody PLK does not exhibit the cross-reactivity with somatic antigens O: 1, 2, 12 and O: 4, 5, 12 and with killed cells of *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas cepatia*. However, the cross-reactivity with somatic antigen O: 3, 10 has been observed for antibody PL1 at the concentration higher than $1.6 \cdot 10^7$ cells/ml. In the case of antigens O: 1, 2, 12 and O: 4, 5, 12, the cross-reactivity was conclusive at the antigen concentration higher than $7.5 \cdot 10^7$ cells/ml. The developed method was verified using the determination of somatic antigen O: 9, 12 added to selected food samples. The recovery varied from 91% to 117%.

somatic antigen; cross-reactivity; sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Enzyme Immunoassay (ELISA); *Salmonella enteritidis*

Abstrakt: Byla vyvinuta sendvičová ELISA pro stanovení (detekci) buněk *Salmonella enteritidis* za použití jak komerční protilátky používané k sérotypizaci salmonel, tak laboratorně připravené protilátky proti somatickému antigenu O: 9, 12. Detekční limit metody je $3,9 \cdot 10^4$ buněk/ml (komerčně dostupná protilátka – PLK), nebo $6,2 \cdot 10^3$ buněk/ml (laboratorně připravená protilátka – PL1). Protilátka PLK nevykazuje křížové reakce se somatickými antigeny O: 1, 2, 12 a 4, 5, 12, ani s mrtvými buňkami *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas cepatia*. Naproti tomu u PL1 byly pozorovány křížové interakce antigenu O: 3, 10 při koncentraci od $1,6 \cdot 10^7$ buněk/ml a v případě antigenů O: 1, 2, 12 a 4, 5, 12 při koncentracích vyšších než $7,5 \cdot 10^7$ buněk/ml.

* Práce byla provedena v rámci projektu č. 509/94/1009 podporovaného Grantovou agenturou České republiky.

Vyvinutá metoda byla ověřena stanovením obsahu somatického antigenu O: 9, 12 přidaného do vybraných nekontaminovaných vzorků potravin. Dosažená hodnota recovery se pohybovala v rozmezí 91–117 %.

somatický antigen; křížové reakce; sendvičová enzymová imunoanalýza (ELISA); *Salmonella enteritidis*

Salmonelasy se významně podílejí na nemocnosti alimentárními nákazami, a to nejen u nás, ale i ve vyspělých zemích západní Evropy a USA. Křivka nemocnosti salmonelami má v našich zemích od roku 1952 stoupající tendenci. V roce 1989 bylo zaznamenáno prudké zhoršení epidemiologické situace salmonelos u lidí, což se projevilo téměř trojnásobným zvýšením nemocnosti v České republice – 333 případů na 100 000 obyvatel (Dědičová, Šrámková, 1991). Tento nepříznivý vývoj trvá až do současnosti. Etiologickým agens byla v převážné většině případů *Salmonella enteritidis*, která drží prvenství od roku 1984 a která se stala hlavní příčinou epidemií v závodních jídelnách, zdravotnických zařízeních a obcích. Dalšími frekventovanými sérotypy jsou: *Salmonella typhimurium*, *S. infantis* a *S. hadar* (Dědičová, Šrámková, 1991). V roce 1991 bylo hlášeno v České republice 30 337 případů vyvolaných *S. enteritidis*, což je 84,1 % z celkového počtu 36 086 onemocnění salmonelami. *S. typhimurium* byla etiologickým agens u 5 % případů a na zbývajících onemocněních se podílelo dalších 64 sérotypů. Ve třetím roce trvání epidemie vyvolané *S. enteritidis* tak byl zaznamenán pouze nepatrný pokles nemocnosti, která je však stále 2–3krát vyšší než v letech 1982–1988 (Beneš, Walter, 1992). V roce 1992 dosáhl počet hlášených případů zatím nejvyšší hodnoty 43 558. V roce 1993 nepatrně poklesl počet případů onemocnění salmonelou na 38 688 případů onemocnění (stav k 16. 12. 1993). Nejfrekventovanějšími sérotypy byly *Salmonella enteritidis* (86,8 %), *S. typhimurium* (9,6 %) a *S. agona*, který se podílel na celkovém onemocnění pouhými 0,6 % (Šrámková, Beneš, 1994).

Zatímco zdrojem *S. typhi* je pouze nemocný člověk, u ostatních bakterií rodu *Salmonella* jsou to většinou zvířata: u *S. enteritidis* je to nejčastěji drůbež, u *S. choleraesuis* vepří. Nejdůležitějším zdrojem původců salmonelos je proto syrové maso, čerstvá i sušená vejce, vzácněji sušené mléko, nebo potraviny neživočišného původu. Mezi hlavní důvody zvýšeného výskytu infekcí patří: světový obchod, turistika, veřejné stravování, zkracování doby

vaření, konzumace syrové stravy, omezení konzervačních prostředků a malá informovanost spotřebitelů o trvanlivosti a zacházení s různými potravinami.

V České republice se přítomnost salmonel ve studovaných vzorcích zjišťuje kultivačními metodami podle normy ČSN 56 0088. Avšak konvenční mikrobiologické metody detekce salmonel vyžadují několik kultivačních stupňů pro pomnožení a separaci salmonel, které jsou následovány biochemickými a sérologickými testy. Tyto metody jsou pracné, drahé a časově náročné. Potvrzení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* mikrobiologickými metodami vyžaduje čtyři až pět dní (Elliot et al., 1978). Proto je nezbytné vyvinout rychlé, citlivé a levné metody, které umožní potravinářskému průmyslu i zdravotnickým a kontrolním institucím provádět screeningové analýzy podezřelých nebo kontaminovaných surovin a konečných potravinářských výrobků. Pro tyto účely jsou vhodné imunochemické techniky.

V posledních letech byla vyvinuta řada enzymových imunochemických technik detekce salmonel (Krysinski, Heimsch, 1977; Mattingly, 1984; Ibrahim et al., 1986; Lee et al., 1990; Wyatt et al., 1993), ve kterých jsou využity jak polyklonální, tak monoklonální protilátky. Pomocí těchto metod se podařilo zkrátit dobu stanovení na jeden až dva dny. V současné době jsou principy enzymové imunoanalýzy využívány četnými výrobci při výrobě diagnostických souprav. Dvě z těchto souprav byly oficiálně deklarovány organizací Association of Official Analytical Chemists (Flowers et al., 1986, 1988) pro screeningová stanovení.

Předmětem této studie je vypracovat techniku enzymové imunochemické detekce bakterií rodu *Salmonella* a otestovat použitelnost jak komerčně dostupné protilátky, která je využívána k sérologické diferenciaci salmonel pro tento test, tak vlastní laboratorně připravené protilátky proti somatickému antigenu O: 9, 12.

MATERIÁL A METODY

Materiál

Salmonella O antisérum polyvalentní OA: 1, 2, 12–4, 5, 12–9, 12–[9], 46–3, 10–1, 3, 19–21; Salmonella O antigen 9, 12; Salmonella O antigen 1, 2, 12 a Salmonella O antigen 4, 5, 12 a hovězí sérový albumin byly zakoupeny u firmy Imuna Šarišské Michalany, Slovenská republika; křenová pe-

roxidasu 25 000 U, RZ=3, grad I (kat. č. 108090) u firmy Boehringer Mannheim GmbH, SRN.

o-fenylendiamin dihydrochlorid, (kat. č. P-1526); 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin sulfonová kyselina) diamonná sůl, (kat. č. A-1888), Sigma Chemical Company, St. Louis, USA; Sephadex G-25 coarse, Pharmacia, Uppsala, Švédsko; Tween 20, (kat. č. 93773), 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin byl získán firmy Fluka Chemie AG, Švýcarsko; ostatní chemikálie Lachema Brno, ČR;

Vzorky: palačinky v prášku, zmrzlinová směs višňová, lívanečky s ovesnými vločkami a majonéza Majolka byly odebrány v maloobchodní síti, Sunar byl poskytnut Ústavem technologie mléka a tuků.

Polystyrenové mikrotitrační destičky typ U byly vyrobeny v závodě KOH-I-NOOR Hardtmuth o.p., České Budějovice, ČR.

K vyhodnocení experimentů byl použit fotometr Labsystems Multiscan MCC/340, Helsinky, Finsko.

Izolace a značení imunoglobulinů

Imunoglobuliny byly izolovány z antiséra podle metody, kterou popsali Harboe a Ingild (1973). Jejich značení peroxidasou bylo prováděno jodistanovou oxidační metodou (Wilson, Nakane, 1978). Připravený preparát konjugátu imunoglobulin-peroxidasa měl následující parametry: poměr $P_x/IgG = 1,65$ a koncentrace konjugátu $c = 3,07$ mg/ml.

Dále byla připravena protilátka proti somatickému antigenu OA: 9, 12 imunizací králíků činčila bílá (UHKT Praha). Z izolovaných imunoglobulinů byly připraveny konjugáty imunoglobulin-peroxidasa o parametrech: poměr $P_x/IgG = 1,11$ a koncentrace konjugátu $c = 0,64$ mg/ml.

Stanovení koncentrace antigenu

Koncentrace antigenu byla stanovena počítáním mrtvých buněk salmonel v Bürkerově komůrce pomocí fázové kontrastní mikroskopie.

Kvantifikace antigenu metodou ELISA

Roztok protilátky (imunoglobulinové frakce) ředěný v 0,05M karbonát-bikarbonátovém pufru pH 9,6 se pipetuje v množství 0,1 ml do jamek polystyrenové mikrotitrační destičky. Imobilizace protilátky na povrch mikrotitrační desky probíhá přes noc při teplotě 4 °C. Nenavázané imunoglobuliny

jsou odstraněny odsátím a jamky se třikrát promyjí karbonát-bikarbonátovým pufrům. Pak se do jamek destičky pipetuje 0,1 ml suspenze standardního antigenu (*Salmonella* O antigen 9, 12), ředěné v 0,01M fosfátovém pufru pH 7,4, který obsahuje 0,8% NaCl (PBS). Vzorke se inkubují dvě hodiny při teplotě 37 °C. Po odstranění nezreagovaných složek se jamky destičky třikrát promyjí roztokem PBS, který obsahuje 0,05 % Tweenu 20 (PBST). Do jamek destičky se aplikuje 0,1 ml peroxidového konjugátu ředěného na optimální koncentraci roztokem PBST, do kterého bylo před použitím přidáno 1 % hovězího sérového albuminu (BSA). Imunochemická interakce probíhá 2 hodiny při teplotě 37 °C. Pak se deska opět čtyřikrát promyje roztokem PBST. Nakonec se přidá 0,1 ml substrátu pro peroxidasu (50 mg o-fenylendiaminu na 100 ml 0,1M citrát/fosfátového pufru pH 5,0 + 0,03% H₂O₂). Enzymová reakce se zastaví po 30 minutách inkubace při teplotě 37 °C pomocí 0,05 ml 2M H₂SO₄. Absorbance reakční směsi se měří přímo v jamkách mikrotitrační destičky při vlnové délce 492 nm.

Vyhodnocení výsledků

Kalibrační křivky byly hodnoceny pomocí čtyřparametrové regresní funkce (Karpinski et al., 1987):

$$U = C + \frac{D - C}{1 + e^{-2(\alpha + \beta x)}} \quad [1]$$

kde: C, D – dolní a horní asymptota

a – posun a směrnice

x – dekadický logaritmus koncentrace antigenu

U – absorbance

Detekční limit stanovení byl vypočítán ze součtu průměru hodnot absorbance pro nulovou koncentraci antigenu a trojnásobku směrodatné odchylky vypočítané pro tutéž hodnotu. Koncentrace odečtená z kalibrační křivky odpovídající této absorbanci pak vyjadřuje citlivost testu (Maňal, 1987). Odlehle hodnoty byly vylučovány pomocí Grubbsova testu pro hladinu významnosti $\alpha = 0,01$ (Eckschlager et al., 1980).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Stanovení optimální koncentrace imobilizované protilátky a konjugátu imunoglobulin-peroxidasa

Při vývoji metody ELISA určené k detekci (stanovení) salmonel byly testovány dvě protilátky. Komerčně dostupné polyvalentní antisérum proti O somatickému antigenu OA: 1, 2, 12–4, 5, 12–9, 12–[9], 46–3, 10–1, 3, 19–21 (dále PLK), které se používá k sérotypizaci salmonel, a laboratorně připravená protilátka proti O somatickému antigenu 9, 12 (dále PL1).

Při vývoji sendvičových imunochemických metod je nezbytné nejprve stanovit optimální koncentraci imobilizované protilátky, což je taková koncentrace imunoglobulinové frakce, při které se za daných podmínek váže nejvíce antigenu. Postupem popsáným dříve (R a u c h et al., 1989) byla určena jako optimální koncentrace 7,8 g/ml, a to jak pro komerční, tak pro laboratorně připravené protilátky.

Optimální koncentrace značené protilátky (PLK) byla stanovena dříve popsáným způsobem (R a u c h et al., 1989) a činila 6,1 g/ml.

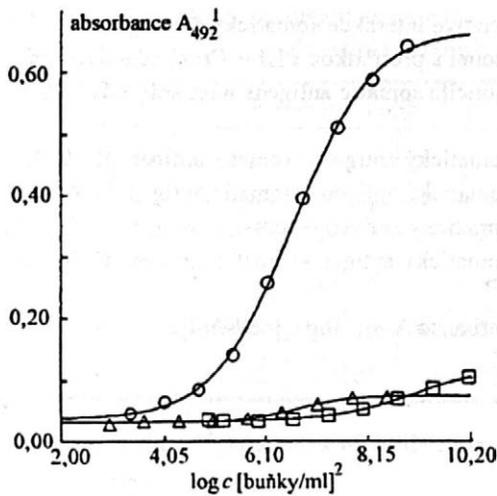
Kalibrační křivka pokrývá koncentrace antigenu $3,9 \cdot 10^4$ až $1 \cdot 10^8$ buněk/ml. Detekční limit $3,9 \cdot 10^4$ buněk/ml byl určen jako průměr detekčních limitů šesti samostatných stanovení. Citlivost ELISA testu je 1,3krát vyšší ve srovnání s metodou posanou v literatuře (L e e et al., 1989).

Pro protilátku PL1 byla nalezena optimální koncentrace konjugátu 0,15 µg /ml. V případě této protilátky pokrývala kalibrační křivka koncentraci antigenu v rozmezí $5 \cdot 10^3$ – 10^8 buněk/ml. Detekční limit byl $6,2 \cdot 10^3$ buněk/ml. Protilátka PL1 vykazuje vyšší specifitu ke studovanému somatickému antigenu a poskytuje téměř 8krát citlivější metodu ELISA ve srovnání s protilátkou PLK.

Testování imunoreaktivity různých druhů O antigenů salmonel

Použitá protilátka (PLK) byla připravena výrobcem proti následujícím šesti druhům somatických antigenů salmonel: 1, 2, 12–4, 5, 12–9, 12–[9], 46–1, 3, 19–21. Vzhledem k této skutečnosti a vzhledem k tomu, že se k detekci salmonel využívala celá imunoglobulinová frakce, byla porovnávána imunoreaktivita vybraného standardního somatického antigenu 9, 12 se somatickými antigeny 1, 2, 12 a 4, 5, 12.

Jak vyplývá z obr. 1, největší afinitu k protilátce vykazuje antigen O: 9, 12. Somatické antigeny 1, 2, 12 a 4, 5, 12 nemají prakticky žádnou imunoreakti-



1. Imunoreaktivita somatických antigenů salmonel (za použití protilátky PLK) –
Immunoreactivity of salmonella somatic antigens (antibody PLK used)

- somatický antigen – somatic antigen O: 9, 12
 □ somatický antigen – somatic antigen O: 4, 5, 12
 Δ somatický antigen – somatic antigen O: 1, 2, 12

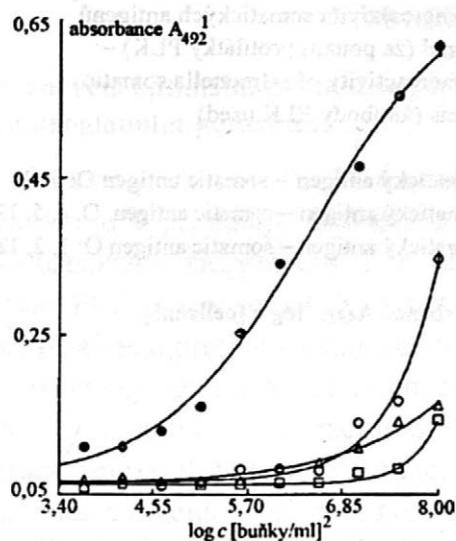
¹absorbance A₄₉₂; ²log c [cells/ml]

vitě k použité protilátce ve sledovaném rozsahu koncentrace antigenu. Testovaná protilátka tedy může být prokazatelně použita k detekci (stanovení) buněk *Salmonella enteritidis*.

Rovněž byly studovány křížové reakce mrtvých buněk dalších kmenů mikroorganismů: *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas cepatia*, a to v rozsahu koncentrace heterologního antigenu 30–1.10¹² buněk/ml. Mrtvé buňky studovaných mikroorganismů nevykazovaly prakticky žádnou křížovou reakci s testovanou protilátkou. Rovněž nebyla pozorována křížová reakce živých buněk *Pseudomonas cepatia* (výsledky nejsou uvedeny). Z uvedeného tedy vyplývá, že výše jmenované mikroorganismy neovlivňují stanovení (detekci) salmonel.

U laboratorně připravené protilátky byl vedle somatických antigenů O: 1, 2, 12 a O: 4, 5, 12 (o koncentraci 5.10³–3,1.10⁸ buněk/ml) také testován somatický antigen 3, 10. Tato protilátka vykazovala křížové interakce s vysokými koncentracemi (od 1,6.10⁷ buněk/ml) antigenu O: 3, 10 (obr. 2). Protože však nebyl k dispozici více koncentrovaný antigen, nebylo možné odhadnout křížové interakce pro 50% nasycení testované protilátky. Přesto je však z obr. 2 patrné, že koncentrace 1.10⁸ buněk/ml antigenu 3, 10 odpovídá koncentraci 1,8.10⁶ buněk/ml standardního antigenu O: 9, 12. Antigeny O: 1, 2, 12 a O: 4, 5, 12 přispívají k absorbanci teprve při vysokých hladinách buněk (7,5.10⁷ buněk/ml a více).

Podobně jako u PLK nebyla prokázána nežádoucí křížová interakce PL1 s mrtvými buňkami *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*.



2. Křížové interakce somatických antigenů salmonel s protilátkou PL1 – Cross-reactivity of salmonella somatic antigens with antibody PL1

- somatický antigen – somatic antigen O: 9, 12
- somatický antigen – somatic antigen O: 4, 5, 12
- △ somatický antigen – somatic antigen O: 1, 2, 12
- somatický antigen – somatic antigen O: 3, 10

¹absorbance A₄₉₂; ²log c [cells/ml]

Vliv doby inkubace značených imunoglobulinů na citlivost detekce salmonel metodou ELISA

Dalším faktorem, který ovlivňuje citlivost a časovou náročnost analýzy, je doba inkubace konjugátu.

Peroxidasou značené imunoglobuliny (PLK) se po aplikaci do jamek mikrotitrační destičky inkubovaly při teplotě 37 °C po dobu 0,5; 1; 2 a 3 hodiny. Po uplynutí příslušné doby se obsah dvou řad jamek odsál, jamky byly promyty PBST a pak byl aplikován substrát pro peroxidasu.

Nejslabší odezva byla pozorována po půlhodinové inkubaci peroxidasového konjugátu, kdy hodnota absorbance pro nejvyšší koncentraci antigenu $2,2 \cdot 10^9$ buněk/ml byla pouze 0,195, a nejsilnější pak po třech hodinách inkubace, kdy absorbance pro koncentraci antigenu $2,2 \cdot 10^9$ buněk/ml činila 0,862. Největší citlivosti metody bylo dosaženo po dvouhodinové inkubaci značených imunoglobulinů. Detekční limit za těchto podmínek činil $3,7 \cdot 10^4$ buněk/ml, zatímco po tříhodinové inkubaci vzrostl na hodnotu $1,80 \cdot 10^6$ buněk/ml (tab. I). S rostoucí dobou inkubace byl rovněž pozorován nárůst nespecifických interakcí (pozadí). V tab. I jsou vedle detekčního limitu a hodnot pozadí uvedeny také parametry získaných kalibračních křivek, vypočtené podle vztahu [1].

Optimální doba inkubace konjugátu byla pro PL1 rovněž dvě hodiny při teplotě 37 °C.

I. Vliv doby inkubace konjugátu na citlivost ELISA salmonel – Influence of incubation time on sensitivity of ELISA for salmonella determination

Doba inkubace ¹ [h]	Parametry kalibrační křivky ²				Detekční limit [buněk/ml] ³	Nespecifická vazba (absorbance A ₄₉₂) ⁴
	C	D	α	β		
0,5	0,0381	0,2076	-5,9932	0,7799	2,22.10 ⁶	0,038±0,006
1,0	0,0262	0,4138	-5,0249	0,5829	2,50.10 ⁵	0,026±0,003
2,0	0,0717	0,8293	-4,2601	0,4924	3,69.10 ⁴	0,073±0,004
3,0	0,1202	1,0186	-5,1088	0,6329	1,80.10 ⁶	0,088±0,038

¹incubation time; ²parameters of calibration curve; ³detection limit; ⁴ non-specific bond (absorbance A₄₉₂)

Z uvedených výsledků je zřejmé, že zkrácení doby inkubace konjugátu za daných podmínek vede sice k urychlení analýzy, ale zároveň k podstatnému snížení její citlivosti.

Porovnání různých druhů chromogenů a substrátů pro enzymovou imunoanalýzu

Křenová peroxidasa je pro svou snadnou dostupnost, příznivou cenu a malou molekulovou hmotnost nejčastěji používaná. Substrátem pro peroxidasu je obvykle peroxid vodíku, ze kterého se působením enzymu uvolňuje kyslík. Uvolněný kyslík pak oxiduje bezbarvý chromogen za vzniku barevných produktů. Většina používaných chromogenů je na bázi aminobenzenu, které po oxidaci tvoří azobenzeny. Řada z těchto látek je mutagenních (Holland et al., 1974; Scharpe et al., 1976).

Byly testovány tři v literatuře popsané druhy substrátů, které se lišily jednak obsahem peroxidu vodíku, jednak použitým chromogenem:

1. OPD – 50 mg o-fenylendiamin dihydrochloridu na 100 ml 0,1M citrát/fosfátového pufru pH 5,0 + 0,03% H₂O₂ (Mančal, 1983).
2. TMB – 1 ml roztoku 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu o koncentraci 10 mg na 1 ml dimethylsulfoxidu do 100 ml 0,1M citrát/acetátového pufru pH 5,8 + 0,006% H₂O₂.
3. ABTS – 1mM ABTS v 0,1M citrát/fosfátového pufru pH 4,3 + 0,002% H₂O₂ (Porstmann et al., 1981).

Testované substráty byly inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C a pak byla enzymová reakce zastavena přidávkem 0,05 ml 2M H₂SO₄ v případě OPD

a TMB, nebo 0,05 ml 1,5mM roztoku azidu sodného v 0,1M kyselině citrónové (ABTS). Absorbance se měřila při vlnové délce 492 nm (OPD), 450 nm (TMB) nebo 414 nm (ABTS).

Detekční limit kalibrační křivky (pro PLK) při použití OPD byl až 62krát nižší než při použití ABTS a jen o 12 % vyšší než po aplikaci TMB (tab. II). Za optimálních podmínek vykazují OPD a TMB téměř identickou citlivost (Bos et al., 1981). I když je roztok ABTS z testovaných substrátů nejméně citlivý poskytuje v průběhu enzymové reakce zelené oxidační produkty s absorpčním maximem při vlnové délce 414 nm. Zelená barva reakčního produktu je zvláště vhodná při vizuálnímu vyhodnocování výsledků oproti žlutým produktům OPD.

II. Vliv druhu substrátu na citlivost ELISA salmonel – Influence of the type of substrate on the sensitivity of ELISA for salmonella determination

Substrát ¹	Detekční limit [buněk/ml] ²	Nespecifická vazba ³ (absorbance A_{492})
OPD	$4,2 \cdot 10^4$	$0,156 \pm 0,016$
TMB	$3,7 \cdot 10^4$	$0,160 \pm 0,018$
ABTS	$2,4 \cdot 10^6$	$0,120 \pm 0,010$

OPD = o-fenylendiamin

TMB = tetramethylbenzidin

ABTS = 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin sulfonová kyselina) diamonná sůl

¹substrate; ²detection limit [cells/ml]; ³non-specific bond (absorbance A_{492})

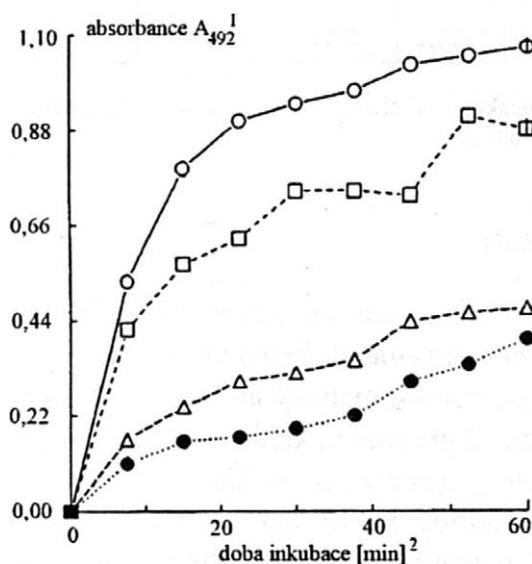
Bos et al. (1981) použili TMB jako chromogen v EIA. Oxidačním produktem je nejprve radikálový kation odpovědný za vznikající modré zbarvení reakční směsi, který po jejím okyselení přechází na žluté difenochinonové barvivo s absorpčním maximem při vlnové délce 450 nm. Proti ostatním testovaným chromogenům je obtížně rozpustný ve vodě, avšak je dostatečně citlivý a nemá mutagenní vlastnosti. Z testovaných substrátů byl nejcitlivější.

OPD je běžně používaný a velmi citlivý chromogen. Je oxidován kyslíkem uvolněným peroxidasou za vzniku 2,2'-diamino-azobenzolu (2,2'-DAB). Vzniklý produkt vykazuje široké maximum při vlnové délce 450 nm při pH kolem 5. K posunu absorpčního maxima dochází, je-li hodnota pH snížena na 1,0 jednotek. Byly zaznamenány určité rozdíly ve vzniku 2,2'-DAB v důsledku

rozdílné přípravy OPD. Použití o-fenylendiamin dihydrochloridu vedlo k 2–3krát nižším extinčním koeficientům než při použití volné báze (Porstmann, Porstmann, 1988).

V literatuře je často uváděna citlivost OPD na světlo. Avšak nestabilita tohoto substrátu v průběhu stanovení a po zastavení enzymové reakce je způsobena především samovolným rozkladem peroxidu vodíku při nízké hodnotě pH reakčního roztoku (Porstmann et al., 1985).

Obr. 3 ukazuje časovou závislost tvorby 2,2'-DAB pro různé koncentrace Salmonella O antigenu 9, 12. Je zřejmé, že reakční doba 30 minut je dostatečná pro spolehlivou detekci vzniku komplexu imobilizovaná protilátka–antigen–značená protilátka. Po uplynutí této doby je již prakticky ustavena chemická rovnováha a při prodloužení doby inkubace dochází pouze k nežádoucímu nárůstu hodnot negativních kontrol (pozadí).



3. Časová závislost tvorby 2,2'-diamino-azobenzolu z OPD – Time dependence of 2,2'-diamino-azobenzol production from OPD

Koncentrace antigenu – Concentration of antigen O: 9, 12:

○ buněk/ml – cells/ml = $8.80 \cdot 10^8$

□ buněk/ml – cells/ml = $1.76 \cdot 10^8$

△ buněk/ml – cells/ml = $1.41 \cdot 10^6$

● buněk/ml – cells/ml = 0.0

¹absorbance A_{492} ; ²incubation time [min]

Ověření správnosti metody

Správnost vypracované metody sendvičového stanovení (detekce) buněk salmonel byla ověřena metodou standardního přidavku somatického antigenu O: 9, 12 do vybraných vzorků potravin. Protože u žádného vzorku nebyly pozorovány nežádoucí interference s testovanou protilátkou (PL1) nebylo nutné extrakty dále ředit. Nalezené hodnoty recovery (tab. III) se pohybují v rozmezí 91–117%.

III. Ověření správnosti stanovení somatického antigenu O: 9, 12 metodou standardního přidavku do vzorků potravin ($n = 6$) – Verification of the correctness of determining salmonella antigen O: 9, 1 2 by the standard supplement method ($n = 6$)

Vzorek ¹	Standardní přidavek ²					
	3,6.10 ⁶ [buněk/ml] ³	recovery [%]	1,3.10 ⁷ [buněk/ml]	recovery [%]	4,79.10 ⁷ [buněk/ml]	recovery [%]
Sunar	4,06±0,1	109,6	1,46±0,1	104,4	4,86±0,1	100,8
Palačinky ⁴	4,16±0,1	112,4	1,36±0,2	95,5	5,06±0,1	104,6
Lívanečky ⁵	3,46±0,2	93,7	1,56±0,1	111,1	4,66±0,3	96,0
Zmrzlinová směs ⁶	3,56±0,1	96,4	1,76±0,1	117,0	4,96±0,3	102,1
Majonéza ⁷	3,76±0,2	106,3	1,26±0,1	91,5	4,56±0,2	94,6
Vaječný salát ⁸	4,06±0,2	111,6	1,26±0,1	91,5	4,86±0,3	100,2
Čerstvý žloutek ⁹	3,36±0,2	90,9	1,26±0,1	91,5	4,86±0,4	101,0
Čerstvý bílek ¹⁰	3,76±0,1	102,7	1,36±0,2	95,5	4,76±0,3	97,5

¹sample; ²standard supplement; ³cells/ml; ⁴pancake; ⁵griddle-cake; ⁶ice mixture; ⁷mayonnaise; ⁸mayonnaise salad with eggs; ⁹egg yolk; ¹⁰egg white

Závěr

Je možné konstatovat, že se podařilo vypracovat metodu ELISA využitelnou ke stanovení (detekci) buněk *Salmonella enteritidis* a dalších kmenů salmonel, jejichž buňky nesou na svém povrchu somatický antigen 9, 12. Byly přitom využity jednak komerčně dostupné protilátky, které se používají k sérotypizaci salmonel, jednak laboratorně připravené protilátky proti somatickému antigenu O: 9, 12. Citlivost metody je srovnatelná s technikami ELISA, které využívají polyklonálních protilátek a které byly publikovány v literatuře.

Literatura

- BENEŠ, Č. – WALTER, G.: Zpráva o epidemiologické situaci v České republice v roce 1991. Zprávy SEVAC, 3, 1992: 111–132.
- BOS, E. S. – DOELEN, A. A., van der – ROOY, N., van – SCHUURS, A. H. W. M.: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay. J. Immunoassay, 2, 1981: 187–204.

- DĚDIČOVÁ, D. – ŠRÁMKOVÁ, H.: Epidemiologická analýza salmonelóz v České republice. *Prakt. Lék.*, 71/19-20, 1991: 613–618.
- ECKSCHLAGER, K. – HORSÁK, I. – KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. *Technický průvodce* 56, Praha, SNTL/ALFA 1980: 50–52.
- ELLIOT, R. P. – CLARKE, D. S. – LEWIS, K. H. – LUNDBECK, H. – OLSIN, J. C. – SIMONSEN, B. (Ed.): *Microorganisms in Foods*. Vol. 1, 2nd ed. Toronto, ICMSF/University of Toronto Press 1978: 160–172.
- FLOWERS, R. S. – ECKNER, K. – GABIS, D. A. – ROBINSON, B. J. – MATTINGLY, J. A. – SILLIKER, J. H.: Enzyme immunoassay for detection of salmonella in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 1986: 786–798.
- FLOWERS, R. S. – KLATT, M. J. – KEELAN, S. L.: Visual immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1988: 973–980.
- HARBOE, N. – INGILD, A.: Immunization, isolation of immunoglobulins. Estimation of antibody titre. *Scand. J. Immunol.*, 2 (Suppl. 1), 1973: 161–164.
- HOLLAND, V. R. – SAUNDERS, B. C. – ROSE, F. L. – WALPOLE, A. L.: Safer substitute for benzidine in the detection of blood. *Tetrahedron*, 30, 1974: 3299–3302.
- IBRAHIM, G. F. – LYONS, M. J. – WALKER, R. A. – FLEET, G. H.: Rapid detection of salmonellae in foods using immunoassay system. *J. Food Protect.*, 49, 1986: 92–98.
- KARPINSKI, K. F. – HAYWARD, S. – TRYPHONAS, H.: Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulin levels using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Immunol. Methods*, 103, 1987: 189–194.
- KRYSINSKI, E. P. – HEIMSCH, R. C.: Use of enzyme-labeled antibodies to detect *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1977: 947–954.
- LEE, H. A. – WYATT, G. M. – BRAMHAM, S. – MORGAN, R. A.: Rapid Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Salmonella enteritidis* in eggs. *Food Agric Immunol.*, 1, 1989: 89–99.
- LEE, H. A. – WYATT, G. M. – BRAMHAM, S. – MORGAN, R. A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1990: 1541–1546.
- MANČAL, P.: Enzymová imunoanalýza EIA. In: Informační služba SEVAC 1983.
- MANČAL, P.: Metody enzymové imunoanalýzy. In: Informační služba SEVAC 1987.
- MATTINGLY, J. A.: An enzyme immunoassay for detection of all *Salmonella* using a combination of a myeloma protein and a hybridoma antibody. *J. Immunol. Meth.*, 73, 1984: 147–156.
- PORSTMANN, B. – PORSTMANN, T.: Chromogenic substrates for enzyme immunoassay. In: NGO, T. T. (Ed.): *Nonisotopic Immunoassay*. New York, Plenum Press 1988: 57–84.

PORSTMANN, B. – PORSTMANN, T. – NUGEL, R.: Comparison of chromogen for the determination of the horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 19, 1981: 435–439.

PORSTMANN, T. – PORSTMANN, B. – WIETSCHKE, R. – BAEHR, R., von – EGGER, E.: Stabilization of the substrate reaction of horse radish peroxidase with o-phenylenediamine in the enzyme immunoassay. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 23, 1985: 41–44.

RAUCH, P. – HOCHÉL, I. – BERÁNKOVÁ, E. – BŘEZINA, P.: Enzymová imunoanalýza kuřecího pepsinu v sýrech. *Potrav. Vědy*, 7, 1989: 113–119.

SCHARPE, S. L. – COOREMAN, W. M. – BLOMME, W. J. – LAEKEMAN, G. M.: Quantitative enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, 22, 1976: 733–738.

ŠRÁMKOVÁ, H. – BENEŠ, Č.: Salmonelózy v České republice v letech 1989 až 1993. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 43, 1994: 47–54.

WILSON, N. B. – NAKANE, P. K.: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W. – HOLUBAR, K. – WICK, G. (Eds.): *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Elsevier/North Holland 1978: 215–225.

WYATT, G. M. – LANGLEY, M. N. – LEE, H. A. – MORGAN, M. R. A.: Further studies on the feasibility of one-day salmonella detection by enzyme linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1993: 1383–1390.

ČSN 56 0088. Potravinářské výrobky. Průkaz bakterií rodu *Salmonella*. 1987.

Došlo 20. 3. 1995

Kontaktní adresa:

Ing. Igor Hochel, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika,
tel.: 02/2435 3019, fax: 02/24311082, e-mail: hochel@saguaro-vscht.cz

DISTRIBÚCIA ORTUTI V MLIEKU

Distribution of Mercury in Milk

Mária KOREŇOVSKÁ, Oľga POLÁČEKOVÁ

Food Research Institute, Bratislava, Slovak Republic

Abstract: The distribution of mercury was studied in different fractions of artificially contaminated milk, gained after fractionation by centrifugation and acid coagulation. 20.4% of the total amount of mercury added as $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ went to the cream, and 71.3% to the skim milk. The milk fat contains 16%, the casein 49%, and the whey 22% of mercury. In technological process of cream and butter production, higher content of mercury was determined in cream by 70% and in butter by 145% in comparison with base material – milk. The mercury content in milk and selected milk products was determined. The mercury content in different fractions was determined on one purpose atomic absorption spectrometer.

mercury; distribution; fractionation; milk; milk products

Abstrakt: V práci je sledovaná distribúcia ortuti v jednotlivých frakciách umelo kontaminovaného mlieka, získaných frakcionáciou pomocou odstredovania a kyslého zrážania. Z celkovej ortuti, pridanej vo forme $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, prešlo do smotany 20,4 % a do odstredeného mlieka 71,3 % ortuti. V mliečnom tuku bolo 16 %, v kazeíne 49 % a v srvátke 22 % ortuti. V technologickom procese výroby smotany a masla sa zistilo zvýšenie obsahu ortuti v smotane o 70 % a v masle o 145 % oproti vstupnej surovine – mlieku. Stanovil sa obsah ortuti v mlieku a vybraných mliečnych výrobkoch. Obsah ortuti v jednotlivých frakciách sa stanovil na jednoúčelovom atómovom absorpčnom spektrometri.

ortuť; distribúcia; frakcionácia; mlieko; mliečne výrobky

V životnom prostredí, ktoré človeka obklopuje, je dokázané, že obsah ortuti stále vzrastá. Zdrojom sú nielen odpadové vody a exhaláty zo závodov elektrotechnického, chemického a farmakologického priemyslu, ale aj jej uvoľňovanie pri spaľovaní fosílnych palív a pri spracovaní rúd. Sekundárnym zdrojom kontaminácie sú aj niektoré pesticídne prostriedky, ktoré sa používajú v poľnohospodárstve. Každý ďalší prísun môže znamenať pre

ľudský a zvlášť detský organizmus ohrozenie. Je preto potrebné poznať a sledovať nielen absolútne množstvo jednotlivých toxických kovov v potravinárskych surovinách, ale aj ich distribúciu do ich hlavných zložiek, ktoré sú zvyčajne zdrojom pre výrobu potravín, ktoré majú významné postavenie vo výžive obyvateľstva.

Veľmi významnou surovinou a požívatinou pre všetky vekové kategórie konzumentov je mlieko. Sledovaním distribúcie kovov v mlieku s využitím izotopov sa zaoberalo viacero prác. King et al. (1959) sledovali distribúciu medi a železa, Roh et al. (1975a, b) kadmia a ortuti a Mirc hi et al. (1989, 1990, 1991) olova, cézia a zinku. Sledovaním dynamiky výskytu kadmia, olova a zinku pri technologickom spracovaní mlieka sa zaoberali Papajová a Hermanová (1989).

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie množstva a distribúcie ortuti v mlieku a mliečnych výrobkoch. Práca bola jedným z podkladov pre zmenu najvyšších prípustných množstiev ortuti v mlieku a mliečnych výrobkoch platných v Slovenskej republike do začiatku roku 1994 (0,002 mg Hg v 1 kg).

MATERIÁL A METÓDY

Na distribúciu ortuti v mlieku sme použili surové mlieko s obsahom tuku 4,0 % odobrané v mliekárni Milex, Bratislava. Nameraný obsah ortuti bol 0,0004 mg/kg, preto sme mlieko v laboratórnych podmienkach umelo kontaminovali roztokom $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ tak, aby obsah v mlieku bol približne 1,0 mg Hg na 1 kg.

Na sledovanie prirodzenej distribúcie ortuti v technologickom procese výroby smotany a masla sme vstupnú surovinu a jednotlivé frakcie odoberali z výrobného procesu mliekárni Milex, Bratislava.

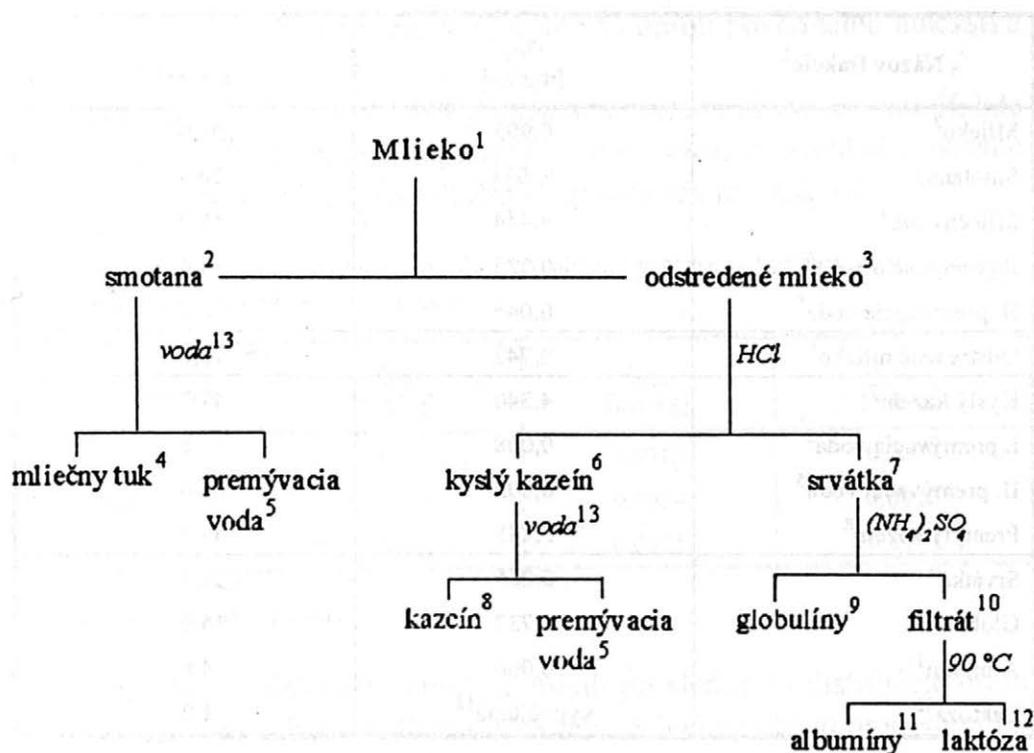
Analyzované mliečne výrobky boli zakúpené v obchodnej sieti v Bratislave. Na meranie množstva ortuti sme použili jednoúčelový analyzátor AMA 254, Altec s.r.o., Praha, kde sme priamo navažovali 100–200 mg vzorky bez predchádzajúcej mineralizácie.

Všetky použité chemikálie boli čistoty p.a., voda bola dvakrát destilovaná.

Frakcionácia mlieka

Kontaminované mlieko sa zohrievalo na vodnom kúpeli pri 37 °C za občasného premiešavania a po dvoch hodinách sa v ňom stanovilo množstvo ortuti. Smotana sa odstredila na odstredivke pri 5 000 otáčkach po dobu

10 minút, premyla destilovanou vodou o teplote 40 °C, odstredila a získali sa dve frakcie: mliečny tuk a voda. Odstredené mlieko sa previedlo do izoelektrického bodu kazeínu (pH = 4,6) opatrným pridávaním HCl ($c = 1 \text{ mol/dm}^3$). Kazeín vyvločkoval do druhého dňa v chladničke. Po odstredení sa srvátka zliala, kazeín sa premyl 2-krát destilovanou vodou a nechal sa voľne vysušiť. Za stáleho miešania sa previedol do roztoku, postupným pridávaním NaOH ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$) a odstredením sa z neho oddelil zvyšok tuku, fosforečnanu vápenatého, eventuálne zvyšok kazeínatu vápenatého. Z presného objemu srvátky sa vyzrážal globulín pomocou nasýteného roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Filtrát sa zahrial na 90 °C, vyzrážali sa z neho albumíny a v roztoku zostala laktóza. V priebehu frakcionácie bol v každej frakcii stanovený obsah ortuti a zistená jej hmotnosť. Schematické znázornenie frakcionácie je na obr. 1.



¹milk; ²cream; ³skim milk; ⁴milk fat; ⁵washing water; ⁶acid casein; ⁷whey; ⁸casein; ⁹globulin; ¹⁰filtrate; ¹¹albumin; ¹²lactose; ¹³water

1. Schéma frakcionácie kontaminovaného mlieka - Scheme of fractionation of contaminated milk

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z celkového množstva pridanej ortuti do mlieka sme vo frakciách namerali 92 % ortuti. Do smotany prešlo približne 20,4 % a do odstredeného mlieka 71,3 % ortuti. V mliečnom tuku bolo namerané 16 % ortuti, v odstredenom mlieku v kazeínovej frakcii 49 % a v srvátkovej proteínovej frakcii 22 % ortuti. Malé množstvo ortuti vo vymytej kazeínovej vode (0,2 %) a v srvátkovom filtráte po vyzrážaní globulínu a albumínu (1,2 %) dokazuje, že ortuť je pevne naviazaná na mliečnych proteínoch a neviaže sa na laktózu.

Relatívne väčšie množstvo ortuti bolo namerané v prvej oplachovej vode (3,4 %), čo súvisí s mliekom, ktoré sa dostalo do tejto frakcie pri oddeľovaní

I. Distribúcia pridanej ortuti v mlieku – Added mercury distribution in milk

Názov frakcie ¹	m_{Hg} [mg/kg]	x [hmot. %]
Mlieko ²	0,995	100,0
Smotana ³	5,011	20,6
Mliečny tuk ⁴	4,444	16,0
I. premývacia voda ⁵	0,225	3,4
II. premývacia voda ⁵	0,045	0,9
Odstredené mlieko ⁶	0,742	71,3
Kyslý kazeín ⁷	4,340	49,2
I. premývacia voda ⁵	0,008	0,16
II. premývacia voda ⁵	0,003	0,06
Premytý kazeín ⁸	5,748	49,0
Srvátka ⁹	0,265	21,8
Globulín ¹⁰	5,732	15,9
Albumín ¹¹	0,060	4,8
Laktóza ¹²	vypočítané ¹³	1,2

m_{Hg} = priemerný obsah ortuti nameraný vo frakciách – average mercury content measured in fractions

x = priemerná hodnota percentuálneho obsahu Hg v jednotlivých frakciách mlieka – average value of Hg percentage content in different milk fractions

¹ fraction name; ² milk; ³ cream; ⁴ milk fat; ⁵ washing water; ⁶ skim milk; ⁷ acid casein; ⁹ whey; ¹⁰ globulin; ¹¹ albumin; ¹² lactose; ¹³ calculated

smotany. Všetky hodnoty uvedené v tab. I sú priemernou hodnotou z troch frakcií umelo kontaminovaného mlieka.

R o h et al. (1975) na základe prepočtu obsahu frakcií na proteín ($N \times 6,38$) zistili, že pridaná ortuť sa koncentruje väčšinou v tukových guľôčkových membránach. Množstvo ortuti v membráne vypočítané na gram proteínu bolo skoro 100-krát väčšie než v srvátkových proteínoch. Na základe toho možno predpokladať, že ortuť sa prednostne viaže s aminokyselinami, a to najmä s tými, ktoré obsahujú -SH skupinu.

Získané výsledky distribúcie ortuti vo frakciách mlieka sa približne zhodujú s výsledkami sledovania distribúcie Hg v mlieku po pridaní rádionuklidu $^{203}\text{HgCl}_2$, ktoré publikovali R o h et al. (1975a).

Pri sledovaní technologického procesu výroby smotany a masla sa v dôsledku prirodzenej kumulácie v mliečnom tuku obsah ortuti v smotane zvýšil približne o 70 % a v masle až o 145 % oproti pôvodnému množstvu v mlieku.

Stanovené množstvá ortuti v mlieku, smotane a masle sú uvedené v tab. II, kde priemerná hodnota je zistená z piatich odberov vzoriek. Prehľad o obsahu ortuti v niektorých vybraných mliečnych výrobkoch je v tab. III.

II. Obsah ortuti v mlieku, smotane a masle z výrobného procesu – Mercury content in milk, cream, and butter from production process

Názov výrobku ¹	x_{\min} [mg/kg]	x_{\max} [mg/kg]	$\bar{x}_{\text{priem.}}$ [mg/kg]
Mlieko ²	0,0005	0,0012	0,0009
Smotana ³	0,0006	0,0024	0,0016
Maslo ⁴	0,0008	0,0035	0,0023

¹product name; ²milk; ³cream; ⁴butter

Vychádzajúc z výsledkov, ktoré sa získali pri sledovaní distribúcie ortuti v mlieku a na základe výsledkov sledovania technologického procesu výroby smotany a masla, bolo zrejmé, že maslo a smotana majú nereálne stanovený limit. Ak vstupná surovina obsahovala podlimitné množstvo ortuti (limit pre mlieko bol 0,002 mg/kg), nie vždy sa z nej dala vyrobiť smotana a maslo, ktoré by vyhoveli platnému limitu (0,002 mg Hg/kg), hoci tvaroh a syry boli zaradené do kategórie s limitom 0,02 mg Hg/kg. Nakoľko obsah ortuti vzťahovaný na hmotnosť je približne rovnaký v smotane a v kazeíno-

III. Obsah ortuti v jednotlivých typoch mliečnych výrobkov – Mercury content in different types of milk products

Názov výrobku ¹	Počet vzoriek ²	x_{\min} [mg/kg]	x_{\max} [mg/kg]	x_{priem} [mg/kg]
Mlieko plnotučné ³	12	0,0001	0,0012	0,0007
Mlieko acidofilné ⁴	5	0,0005	0,0015	0,0008
Smotana kyslá ⁵	10	0,0003	0,0050	0,0017
Maslo ⁶	10	0,0003	0,0028	0,0012
Maslo nátierkové ⁷	5	0,0005	0,0007	0,0006
Rama	5	0,0001	0,0004	0,0003
Jogurt biely ⁸	10	0,0001	0,0004	0,0002
Eidam ⁹	10	0,0003	0,0071	0,0013
Parenica ⁹	5	0,0003	0,0014	0,0009
Lunex ⁹	5	0,0003	0,0013	0,0008
Syrokrém ⁹	10	0,0002	0,0026	0,0010
Delikates ⁹	5	0,0006	0,0027	0,0011
Dietetický syr ⁹	10	0,0004	0,0014	0,0008
Tvrde tavené syry ⁹	11	0,0003	0,0026	0,0009

¹product name; ²number of samples; ³whole milk; ⁴acidophilous milk; ⁵ripened cream; ⁶butter; ⁷butter spread; ⁸white yoghurt; ⁹different types of cheese

vej frakcii, odporučilo sa zaradiť smotanu, maslo, tvaroh a syry do spoločnej kategórie „mliečne výrobky“ s limitom 0,02 mg Hg/kg.

Literatúra

- KING, R. L. – LUICK, J. R. – LITMAN, I. I. – JENNINGS, W. G.: Distribution of natural and added copper and iron in milk. *J. Dairy Sci.*, 42, 1959: 780–790.
- MIRCHI, R. – KMÍNKOVÁ, M. – KOCOUREK, V.: Distribuce olova v mléce. *Potrav. Vědy*, 7, 1989: 53–57.
- MIRCHI, R. – KMÍNKOVÁ, M.: Distribuce ⁶⁵Zn uměle přidaného do mléka a mléčných frakcí. *Potrav. Vědy*, 9, 1991: 197–202.
- MIRCHI, R. – KMÍNKOVÁ, M. – DĚDEK, M.: Přenos ¹³⁷Cs do mléčných produktů a mléčných frakcí. *Potrav. Vědy*, 8, 1990: 51–56.
- PAPAJOVÁ, H. – HERMANOVÁ, V.: Sledovanie dynamiky výskytu kadmia, olova a zinku pri technologickom spracúvaní mlieka. *Bull. PV*, 28, 1989: 303–308.

PAPAJOVÁ, H. – SLOTTOVÁ, A. – HERMANOVÁ, V. – BAJZÍK, I.: Výskum dynamiky zmien cudzorodých látok v technológii požívatin. [Výskumná správa.] Žilina, VÚM zväzok I. 1991 a zväzok II. 1993.

ROH, J. K. – BRADLEY, J. R. – RICHARDSON, T. – WECKEL, K. G.: Distribution and removal of added mercury in milk. J. Dairy Sci., 58, 1975a: 1782–1788.

ROH, J. K. – BRADLEY, J. R. – RICHARDSON, T. – WECKEL, K. G.: Distribution and removal of cadmium from milk. J. Dairy Sci., 58, 1975b: 376–381.

Došlo 16. 3. 1995

Kontaktní adresa:

RNDr. Mária Koreňovská, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4,
820 06 Bratislava, Slovenská republika, tel.: 07/213 640, fax: 07/526 14 17

Ústav zemědělských a potravinářských informací

vydává v roce 1995 následující

POTRAVINÁŘSKÉ PUBLIKACE NEPERIODICKÉ

Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích

(E. Jičínská – J. Havlová)

Asi 100 stran, předběžná cena 140 Kč.

**Metody detekce a prevence patogenních mikroorganismů
v potravinách a v prostředí potravinářských závodů**

(E. Jičínská – J. Havlová)

Asi 80 stran, předběžná cena 120 Kč

**Slovník mlýnských, pekárenských, těstářenských, cukrářských
a extruzních výrazů** *(J. Skládalová – O. Kopáčová)*

Asi 100 stran, předběžná cena 150 Kč.

Potravinářství 94 *(L. Benešová a kol.)*

Asi 100 stran, předběžná cena 150 Kč.

Připravovaný sborník volně navazuje svým obsahem na předchozí dva svazky.

Výživa ve stáří *(J. Dostálová – B. Turek)*

Asi 60 stran, předběžná cena 85 Kč.

Uvedené publikace můžete objednat na adrese:

Ústav zemědělských a potravinářských informací

Londýnská 55, 120 21 Praha 2,

tel.: 02/250 051-4, fax: 02/207 411

PŘEHLEDY

PŘÍPRAVA A POUŽITÍ ESTERŮ MASTNÝCH KYSELIN SE SACHAROSOU*

Miroslav MAREK, Michal VOLDŘICH, Dušan ČURDA, Jan KOPEČNÝ¹

Vysoká škola chemicko-technologická – Ústav konzervace potravin a technologie masa, Praha; ¹Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Praha-Uhřetěves

Vysoký podíl tuků v potravě a s tím spojené riziko onemocnění ischemickou nemocí srdeční, arteriosklerosou a nemocemi látkové výměny vedou ke snaze redukovat nebo nahradit tuky v potravě. Polyestery sacharosy o stupni acylace 5 až 8 odvozené od vyšších mastných kyselin mají stejné fyzikální a organoleptické vlastnosti jako tuky, nehydrolyzují se však lipasami a v gastrointestinálním traktu působí jako lipofilní solvent cholesterolu snižující jeho vstřebávání (Boggs, 1986). Pro tyto své vlastnosti jsou polyestery mastných kyselin se sacharosou považovány za jedny z nejperspektivnějších nekalorických náhrad tuků, v literatuře často označovaných jako „nekalorické tuky“. Očekává se jejich značná produkce a spotřeba, podle optimistických předpovědí potenciálních výrobců (Procter and Gamble) by spotřeba nekalorických náhrad tuku na bázi polyesterů sacharosy měla v budoucnu činit 35 až 70 % současné spotřeby stolních olejů (Akoň, 1994). Problém je v posledních deseti letech intenzivně studován, zejména v USA, zatím však nebylo povoleno jejich použití jako náhrady tuků.

V širší míře jsou estery a polyestery sacharosy používány jako potravinářská aditiva (obvykle v množství do 1 %). Estery sacharosy s mastnými kyselinami o stupni esterifikace 1 až 3 mají vlastnosti povrchově aktivních látek, jsou využívány v trávicím traktu, používají se jako solubilizační, hydratační, dispergační, stabilizační a emulgační aditiva (Harrigan, Breene, 1989), jako antimikrobiální prostředky a dále jako látky vytvářející ochranné filmy pokrývající ovoce a zeleninu (Drake et al., 1987).

Příprava esterů mastných kyselin se sacharosou

Při esterifikaci sacharosy může vzniknout 8 mono-, 28 di-, 56 tri-, 70 tetra-, 56 penta-, 28 hexa-, 8 hepta a 1 okta-O-acylsacharosa, celkem tedy 255 látek (Vydra, Čapek, 1989). Volba činidel a reakčních podmínek vychází především

* Práce byla provedena v rámci výzkumného úkolu č. 510/94/1691 financovaného GA ČR.

z účelu, pro který jsou příslušné estery připravovány. Při esterifikaci do nižšího stupně jsou přednostně acylovány reaktivnější primární hydroxylové skupiny na C-6 u glukosy a na C-1' a C-6' u fruktosy, přičemž substituce na C-1' probíhá z důvodů sterických zábran poněkud pomaleji. Získané mono-, di- a triestery sacharosy s mastnými kyselinami představují velmi kvalitní neionogenní tenzidy s širokým rozmezím hodnot HLB (5-16) a možností biologické degradace. Při jejich výrobě jsou rozhodující výrobní náklady, naproti tomu lokalizace acylových skupin na sacharosovém skeletu a do jisté míry i druh acylové skupiny jsou podružné, protože povrchově aktivní účinek produktu je dán hydrofobním charakterem acylu a hydrofilním charakterem sacharosového zbytku.

Estery sacharosy s mastnými kyselinami o nízkém stupni esterifikace je možno připravit přímou reakcí s mastnými kyselinami (Bertsch et al., 1965) nebo pomocí chloridů a anhydridů mastných kyselin (v patřičném molárním ekvivalentu). Při předpokládaném rozsahu a účelu použití esterů sacharosy s vyššími mastnými kyselinami však nepřicházejí tyto klasické metody esterifikace v úvahu. Proto byly vypracovány technologie založené na transesterifikaci sacharosy metylestery vyšších mastných kyselin. Tato bazicky katalyzovaná transesterifikace byla původně prováděna za přítomnosti rozpouštědel jako je dimetylformamid, dimetylsulfoxid nebo dimetylpyrolidon. Komerčně byla realizována v roce 1959 v Japonsku firmou Dai-Nippon sugar Manufacturing Co., Ltd, pro výrobu potravinářských aditiv. V USA však nebylo použití těchto aditiv povoleno pro jejich odér a přítomnost toxických zbytků rozpouštědel. Relativně bezpečnější postup spočívá v provádění této transesterifikace ve formě mikroemulze sacharosy v propylenglykolu jako rozpouštědla s metylestery mastných kyselin za přítomnosti uhličitanu draselného jako katalyzátoru (Osipow, Rosenblatt, 1967). Produktem reakce je 85 % monoesterů a 15 % diesterů sacharosy (po vyčištění). Tento postup byl později vylepšen náhradou propylenglykolu vodou (Kosaka, Yamada, 1977).

Nepřípustnost použití organických rozpouštědel společně se snahou o zvýšení efektivnosti přípravy esterů mastných kyselin se sacharosou vedly k řadě studií věnovaných transesterifikačním reakcím bez přítomnosti jakéhokoliv rozpouštědla. Postup, který vyvinuli Feuge et al. (1970), spočívá v reakci roztavené sacharosy (b. t. 185 °C) s metylestery mastných kyselin za přítomnosti lithného, sodného a draselného mýdla jako rozpouštědla a katalyzátoru při teplotách mezi 170 a 187 °C. Nevýhodou tohoto postupu je příliš vysoká teplota, při které se roztavená sacharosa rychle rozkládá na černou dehtovitou hmotu. U obou postupů (s rozpouštědly i bez nich) je výhodné použít sníženého tlaku, aby mohl oddestilovávat alkohol jako vedlejší produkt reakce. Z mnoha studií věnovaných přípravě esterů mastných kyselin níže substituované sacharosy (Lemieux, McInnes, 1962; Jones, 1981) vyplývá společný závěr, že čím větší poměr sacharosy k mastným kyselinám je použit, tím větší je výtěžek mono- a diesterů sacharosy, a naopak

velký přebytek metylesterů mastných kyselin poskytuje vyšší podíl vysoce substituované sacharosy.

Technologicky atraktivní je též transesterifikace sacharosy přírodními triacylglyceroly (Vydra, Čapek, 1989). Produkt reakce však obsahuje kromě mono- a diesterů sacharosy i mono- a diacylglyceroly (mající rovněž povrchově aktivní vlastnosti). Tato směs esterů, v níž převažují estery s acylovými skupinami v polohách 6 a 6', nepřiliš správně označovaná jako „cukroglyceridy“, se u nás vyrábí pod obchodním názvem Helavin.

Pro syntézu esterů mastných kyselin se sacharosou byla použita též enzymaticky katalyzovaná esterifikace. Této problematice bude věnován samostatný souhrnný článek.

Příprava polyesterů sacharosy s mastnými kyselinami

Pro přípravu polyesterů mastných kyselin se sacharosou je možné použít téměř shodných postupů jako v případě nízkosubstituovaných esterů s tím, že je potřebný vyšší přebytek reagujících derivátů mastných kyselin. I když tyto klasické způsoby esterifikace (Hess, Messmer, 1921) byly studovány především v souvislosti s přípravou polyesterů sacharosy, pro technologickou realizaci se ukázala jako daleko schůdnější bazicky katalyzovaná transesterifikace sacharosy (Yamamoto, Kinami, 1986), okta-O-acetylsacharosy (Mieth et al., 1983) nebo parciálně acetylované sacharosy (Musso et al., 1982) alkylestery vyšších mastných nasyčených nebo nenasycených kyselin. Tuto transesterifikaci lze provést v roztoku sacharosy ve vysokovroucích aprotických rozpouštědlech nebo bez přítomnosti rozpouštědla. Vždy je však třeba pracovat s přebytkem alkylesterů vyšších mastných kyselin, aby reakce proběhla v uspokojivém výtěžku a s dostatečně vysokým stupněm esterifikace.

Přímá esterifikace sacharosy je limitována její tendencí ke karamelizaci při teplotách nad 185 °C. Rizzi a Taylor (1978) proto rozdělili syntézu bez použití rozpouštědla na dva stupně. V prvním stupni reagují metylestery mastných kyselin s volnou sacharosou v molárním poměru 3 : 1 za přítomnosti draselných mýdel poskytující homogenní taveninu během 2–3,5 hodin obsahující převážně estery sacharosy o stupni esterifikace 1–3. Ve druhém stupni je pak při použití přebytku metylesterů mastných kyselin dosaženo po 6 h při 130–150 °C 90% výtěžku polyesterů sacharosy (vztaženo na sacharosu). V obou stupních je reakce katalyzována přísadkou alkalických kovů nebo jejich hydridů. Nevýhodou tohoto postupu je prodloužení reakční doby a hlavně ekonomicky nevýhodné zvýšení poměru metylesterů mastných kyselin k sacharose na 16 : 1. Proto byl tento postup dále optimalizován řadou modifikací, v nichž např. je zahřívána směs sacharosy, metylesterů a 2-metoxyethyl esterů mastných kyselin, jejich alkalických mýdel a uhlíčitanu draselného a uhlíčitanu sodného za tvorby homogenní taveniny (Volpenhein, 1985). Po přidávku přebytku metylesterů mastných kyselin (v poměru 12 : 1)

a zahřívání na 120–180 °C při sníženém tlaku po dobu 2–8 h je získána směs vyšších polyesterů obsahující 36 až 85 % oktaesteru.

Při syntéze polyesterů sacharosy s mastnými kyselinami vycházející z oktaacetátu sacharosy bylo reakcí s metylesterem palmitové kyseliny za přítomnosti 2 % sodíku nebo draslíku dosaženo při teplotě 110–130 °C po 3–6 h reakce za sníženého tlaku (2 000–3 333 Pa) 80–90% výtěžku polyesterů (vztaženo na výchozí oktaacetát) (Mieth et al., 1983). Pokud je při reakci dosaženo vyššího vakua (< 666 Pa), je možné i při teplotách kolem 105 °C dosáhnou přes 99 % výtěžku (Ako, Swanson, 1990).

S ohledem na požadované fyzikálně chemické a organoleptické vlastnosti finálního produktu a jeho hygienickou nezávadnost je třeba z něho beze zbytku odstranit přebytečné alkylestery vyšších mastných kyselin a estery sacharosy s těmito kyselinami o stupni esterifikace nižším než 4. To se dosud provádí extrakcí produktu transesterifikační reakce sacharosy s alkylestery vyšších mastných kyselin alkoholem, nejčastěji metanolem, a hexanem (Ako, Swanson, 1990). Pro odstraňování nezreagovaných metylesterů mastných kyselin byla rovněž použita ekonomicky značně náročná molekulární destilace při 60–150 °C (Volpenhein, 1985; Yamamoto, Kinami, 1986).

Poznatku, že polyestery mastných kyselin se sacharosou nejsou hydrolyzovány lipolytickými enzymy, využívá biotechnologický způsob čištění těchto polyesterů. Pomocí lipas nebo mikroorganismů vykazujících lipolytickou aktivitu (např. *Candida lipolytica*) ať již v nativní, nebo imobilizované formě je z reakční směsi transesterifikace sacharosy a metylesterů mastných kyselin odstraňován jednak přebytek metylesterů mastných kyselin a jednak estery sacharosy s těmito kyselinami o stupni esterifikace nižším než 5 (Marek et al., 1991).

Fyzikálně chemické vlastnosti

Velká pozornost byla věnována studiu fyzikálně chemických vlastností esterů sacharosy s mastnými kyselinami o stupni esterifikace nižším než 4 (Osipow et al., 1956). Tyto látky jsou rozpustné v horké vodě, v etanolu, metanolu a v acetonu. Dalšími typickými vlastnostmi pro tyto látky jsou tvorba pěny, smáčivost, snižování povrchového a mezifázového napětí a nezanedbatelná je i jejich stabilita. Hydrofilní a lipofilní rovnováha (HLB) těchto emulgátorů závisí:

- a) na stupni substituce,
- b) na délce řetězce mastné kyseliny,
- c) na přítomnosti dvojně nebo trojně vazby, tj. na stupni nenasycení (Gupta et al., 1983b).

Tyto estery se ukázaly jako velmi dobré emulgační prostředky a jako neionogenní detergenty s nízkou toxicitou, které mohou být úspěšně využívány v kosmetice, ve farmaceutickém průmyslu a v potravinářství.

Fyzikální vlastnosti polyesterů sacharosy s mastnými kyselinami, jako je barva, konsistence, hustota a refrakce, jsou velmi podobné rostlinným a stolním olejům (Akoḥ, Swanson, 1990; Jandacek, Webb, 1978). Hodnota HLB 3,5 předurčuje polyestery sacharosy jako vhodná emulgační aditiva pro emulze vody v olejích, tj. jako emulgátory v másle, margarínu, v nízkokalorických pomazánkách, karamelu, čokoládě, cukrářských výrobcích a pokrmových tucích (Akoḥ, 1992).

Analytické metody stanovení esterů mastných kyselin se sacharosou

K izolaci, purifikaci i vlastnímu stanovení esterů a polyesterů sacharosy s mastnými kyselinami mohou být využity všechny metody a přístroje používané v chemii lipidů, jako je sloupcová a tenkovrstvá chromatografie, plynová a vysokoúčinná chromatografie, hmotnostní a infračervená spektroskopie a nukleární magnetická rezonance. Pro izolaci esterů s nízkým stupněm substituce byla popsána řada způsobů, jedním z nejjednodušších je izolace produktu odpařením reakční směsi dosucha a rozdělením zbytku mezi *n*-butanol a 5% chlorid sodný. Monoestery je poté možné vysrážet acetonem při $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lemieux, McInnes, 1962). Rovněž tak pro izolaci polyesterů existuje celá řada postupů, jejichž variace závisejí na výchozím materiálu, druhu syntézy, použitém katalyzátoru i formě produktu. Běžným postupem je neutralizace reakční směsi kyselinou octovou, následné promytí metanolem, vybělení přídavkem aktivního uhlí, zfiltrování a odpaření rozpouštědel. Vlastní stanovení polyesterů sacharosy s mastnými kyselinami se nejčastěji provádí pomocí tenkovrstvé chromatografie (Mieḥ et al., 1983) spojené s detekcí postřikem kyselinou sírovou s naftoresorcinolem a následným zahřátím. Místa s polyestery se zbarví růžovo-fialově. [V případě přítomnosti esterů sacharosy s nižším stupněm esterifikace (pod 4) je identifikována celá řada skvrn indikujících různé izomery (Weiss et al., 1971)].

Kvantitativní určení stupně substituce bylo prováděno rovněž mnoha způsoby, z nichž nejčastější jsou denzitometrická měření tenkovrstvých chromatogramů (Weiss et al., 1971), plynová chromatografie na stanovení celkového obsahu esterů, vysokoúčinná chromatografie na reverzní fázi (Mattson et al., 1971) a vysokoúčinná gelová permeabilní chromatografie (Birch, Crowe, 1976). Stupeň substituce byl rovněž stanoven pomocí protonové a C-13 NMR spektroskopie (Akoḥ, Swanson, 1990). Pro infračervenou spektroskopii esterů sacharosy s mastnými kyselinami jsou v závislosti na výchozím materiálu charakteristické absorpční pásy $3\ 420\text{--}3\ 500\text{ cm}^{-1}$ (OH), $1\ 740\text{--}1\ 750\text{ cm}^{-1}$ (ester C=O), $1\ 460$ až $1\ 470\text{ cm}^{-1}$ (C-H v CH_3 a/nebo CH_2) a $900\text{--}920\text{ cm}^{-1}$ (rotační vibrace). I když estery sacharosy s mastnými kyselinami zdaleka nejsou těkavými látkami, byla pro jejich stanovení použita též kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektroskopií (Gupta et al., 1983a, b). Volné hydroxylové skupiny byly předem sily-

lovány, přesto potřebný teplotní gradient dosahoval až 380 °C. Pro stanovení stupně substituce se však častěji estery sacharosy hydrolyzují a uvolněné mastné kyseliny se stanoví ve formě metylesterů.

Použití esterů sacharosy a mastných kyselin v potravinářství

Fyzikálně chemické vlastnosti esterů sacharosy a tím i způsob jejich využití při výrobě potravin je dán stupněm esterifikace. Polyestery sacharosy se stupněm esterifikace 5 až 8 mají fyzikálně chemické vlastnosti tuků – triacylglyceridů, nejsou ze sterických důvodů využívány v trávicím traktu a byly připraveny jako jedna z možností náhrady tuků.

Nejdůležitějšími producenty ve světě jsou Mitsubishi-Kasei Corporation a Procter and Gamble. V Japonsku vyrábějí a distribuují téměř výhradně nižší estery, zatímco Procter and Gamble vyvíjí již od poloviny osmdesátých let aktivity směřující k zavedení polyesterů sacharosy s 6 až 8 mastnými kyselinami, tzv. Olestry jako náhrady tuků (Gillis, 1988; Jandacek, 1991). Povolení použití Olestry je ovlivňováno řadou faktorů, polyestery sacharosy nelze chápat jako aditiva, ale jako potenciální makrosložku potravin. Zatímco aditivní látky se dávkují v množstvích do 1 %, v případě Olestry by podíl v potravině mohl být vyšší než 10 % (Swanson, Akoh, 1994). Studie Food and Drug Administration (FDA) potřebné pro schválení výrobku vyžadují podávání zkoušené látky laboratorním zvířatům v množství, které odpovídá stonásobku očekávané spotřeby pro lidskou výživu. Z uvedených důvodů jsou krmné pokusy neproveditelné (Mentzer-Morrison, 1994). To je také jeden z důvodů, proč dosud nebylo povoleno pro použití polyesterů sacharosy jako náhrady tuků uděleno. Dalšími důvody mohou být potenciální rizika spojená s konzumací vyšších množství Olestry v potravě. Kromě pozitivních nutričních vlastností, jako jsou snížení energetické hodnoty stravy při zachování sensorických vlastností tučných potravin, schopnost vyplavovat cholesterol z organismu a snižovat hladinu cholesterolu v krvi, pozitivní účinek při vyplavování toxických lipofilních látek z organismu při současném minimálním vlivu na resorpci v tucích rozpustných vitaminů a vlivu na vstřebávání orálně podávaných léčiv, je pravidelný vyšší příjem polyesterů sacharosy spojen také s mírnými negativními důsledky (Tomá et al., 1988). U většiny z testovaných jedinců bylo pozorováno celkové zrychlení průchodu podané stravy traktem a u některých z konzumentů byla zjištěna též flatulence, spontánní exkrece, zvýšené nucení a podobné projevy (Glück et al., 1980). Přes uvedené poznatky většina publikovaných studií nasvědčuje, že bezpečná denní dávka polyesterů by mohla činit asi 30 g, což odpovídá snížení kalorické hodnoty o 270 kalorií (Tomá et al., 1988; Aggarwal et al., 1993). V porovnání s dalšími nekalorickými náhradami tuků je v případě polyesterů sacharosy vývoj nejdále a jejich širší použití je obecně očekáváno.

Použití esterů sacharosy se stupněm esterifikace 1 až 3

Estery sacharosy s vyššími mastnými kyselinami o nízkém stupni esterifikace jsou netoxické, rychle a úplně biologicky odbouratelné a ani produkty jejich metabolismu nejsou zdraví škodlivé. Používají se při výrobě mycích prostředků, kosmetických přípravků a v potravinářském průmyslu jako aditiva – emulgátory a stabilizátory. V cereálních výrobcích prodlužují jejich trvanlivost, příznivě ovlivňují i vlastní technologii. Ve farmacii se používají k solubilizaci, jako pojidla a k pokrývání tablet. Slibné je i jejich použití v textilním, papírenském a tabákovém průmyslu (Vydra, Čapek, 1989). Výhodou esterů sacharosy je jejich „přirozený“ původ, v některých oblastech svými vlastnostmi navíc předčí jiné používané látky.

Velmi časté je použití emulgátorů na bázi esterů sacharosy v mléčných a mléku podobných výrobcích, např. při přípravě umělého mléka (emulgovaného tuku) pro krmné účely. V kombinaci s monoglyceridy a dalšími emulgátory jsou užívány také při výrobě nemléčné smetany do kávy (Walker, 1984). Uplatnění nacházejí také při výrobě šlehaných polev nebo šlehačky, do kterých jsou přidávány v koncentracích nižších než 1 %. Přídavek 0,2 % do zmrzlinových směsí pomáhá stabilizovat zmrzlinu v širším intervalu teplot (zmrzlina drží bez porušení konzistence delší dobu), udržovat její viskozitu a snižovat riziko vydělení tuku během zmrazování a mrazírenského skladování. Obecně přídavek esterů sacharosy zlepšuje charakteristiky tání zmrzliny (Walker, 1984).

Přídavek 0,05 % esterů sacharosy do nízkotučného jogurtu pozitivně ovlivňuje vlastnosti produktu, zejména stabilitu konzistence, homogenitu a senzorické vlastnosti. Jogurty připravené s přídavkem esterů sacharosy s kyselinou stearovou s HLB hodnotami od 5 do 9 byly hladší s příjemnou konzistencí proti jogurtům připraveným bez přídavku esterů, které měly drsnou až zrnitou konzistenci. Účinek přídavku esterů sacharosy spočívá v jejich vlivu na snížení protein-protein interakcí a omezení agregačních pochodů ve výrobku. Jogurt s přídavkem nižších esterů sacharosy s mastnými kyselinami je rovněž stabilní delší dobu při vyšších než chladírenských teplotách skladování (Farooq, Haque, 1992).

Široké uplatnění nacházejí nižší estery sacharosy s mastnými kyselinami v pekařství. Přídavek esterů sacharosy zvyšuje měkkost střídky, zvyšuje objem bochníku a údržnost bílého chleba (Walker, 1984). Optimální koncentrace esterů sacharosy je asi 1 % hmotnosti mouky pro estery sacharosy s vyšší HLB hodnotou. Estery sacharosy zlepšují vlastnosti chleba podobně jako 2-O-stearyl-mléčnan sodný (SSL), který je obecně používán pro zlepšení objemu bochníků a vyšší měkkost střídky.

Princip účinku esterů sacharosy v pekárenských produktech spočívá ve dvou oblastech: v emulgačním účinku a v ovlivnění retrogradace škrobu. Emulgační vlastnosti zajišťují, že všechny přísady jsou rovnoměrně rozptýleny v celém objemu

těsta. Zatímco estery sacharosy nepůsobí v těstě jako emulgátory v klasickém smyslu slova, údržnost, objem, zrnění a struktura jsou po jejich přidávku lepší (Ebeler, Walker, 1984). Estery sacharosy zpomalují slepení a želatinizaci škrobových zm v těstě a pozitivně ovlivňují jeho vlastnosti při dalším zpracování. Teplota želatinizace pšeničného škrobu se přidávkem esterů sacharosy zvyšuje. Jak uvádí Walker (1984), může malý přídavek esterů sacharosy do těsta znamenat zlepšení vlastností cereálních výrobků, zvýšení produktivity výroby a snížení nákladů.

V masném průmyslu našly estery sacharosy s nízkým stupněm esterifikace mastnými kyselinami uplatnění jako emulgátory při výrobě masových pomazánek (Hara, 1989).

Estery sacharosy s mastnými kyselinami jsou také součástí směsí určených k povrchovému ošetření ovoce a zeleniny (Shi, Gu, 1986; Fukushima, 1989). Příkladem takového použití je povlékání povrchu čerstvých plodů ovoce a zeleniny k prodloužení jejich skladovatelnosti. Ošetření plodů povlečením lipofilní vrstvou nahrazuje zabalení do plastové fólie – hlavním efektem je zamezení ztrát vody vysycháním během skladování. Dalším příznivým důsledkem je ovlivnění rychlosti výměny plynů, i pro plyny (kyslík, oxid uhličitý) propustný film lipofilního povlaku omezí výměnu plynů a sníží rychlost dýchání pletiv a tím i fyziologických změn spojených s dozráváním plodů. Použití povlaků také snižuje riziko poškození vůči chladu citlivých druhů ovoce a zeleniny (Chen, Paull, 1986) a brání snížení sensorické a nutriční hodnoty v důsledku poškození chladem, jako je např. enzymové hnědnutí uvnitř poškozených pletiv.

Obvykle jsou aplikované látky nanášeny postříkem plodů nebo namáčením do emulzí nebo roztoků, současně mohou být použity povolené pesticidní přípravky. Tím je také optimalizováno použití agrochemikálií, které jsou nanášeny homogenně v nejnižší účinné koncentraci a jsou fixovány po celou dobu na povrchu ošetřených plodů (Kopecký, 1977). Popsaný způsob ošetření se používá v kombinaci s chladírenským skladováním u jablek, manga (Joseph, Aworth, 1992), citrusového ovoce (Cohen et al, 1990), některých peckovin, ananasů, hrušek, rajských jablek, melounů, okurek, paprik, brambor a dalších druhů ovoce a zeleniny (Kopecký, 1977). Výhodou použití esterů sacharosy proti dalším prostředkům používaným k povlékání ovoce a zeleniny je jejich definovaná čistota, zaručené složení a charakter blízký přirozeným složkám ovoce.

Pro svoje antimikrobní vlastnosti (Beuchat, 1980; Kato, Arima, 1970; Marshall, Bullerman, 1986) našly estery sacharosy s mastnými kyselinami rovněž uplatnění při sterilizaci potravin (Nakamura, Kawaguchi, 1993).

Použití polyesterů sacharosy se stupněm esterifikace 5 až 8

Potenciální aplikace polyesterů sacharosy jsou také široké. Více než polovina spotřebitelů dnes dává přednost nízkokalorickým výrobkům – pomazánkám se sní-

ženým obsahem tuků, odlehčeným zmrzlínám, nízkotučným sýrům apod., ještě více konzumentů vyjádřilo zájem o částečnou náhradu tuků ve smažených a podobných výrobcích (Swanson, Akoh, 1994). Chuť a vůně srovnatelná s výrobkem vyrobeným klasickou cestou je v těchto případech rozhodujícím faktorem. Proto je nezbytné, aby náhrada tuků měla také srovnatelné funkční vlastnosti. Z uvedeného pohledu polyestery sacharosy nároky splňují.

Polyestery sacharosy mohou být syntetizovány z různých tuků (mléčného tuku, sádla, loje, rostlinných olejů apod.). Vlastnosti polyesterů mohou být upraveny podle nároků na bod tání, konzistenci a další funkční vlastnosti výběrem mastných kyselin z přirozených triglyceridů a dalších zdrojů. Připravené polyestery mohou částečně nebo úplně nahradit tuk nebo olej v pečivu, sýrech, v mléčných výrobcích, stejně jako mohou být použity pro smažení.

Firma Procter and Gamble intenzivně pracuje na zavedení použití polyesterů sacharosy jako náhrady tuků již od roku 1971 (Swanson, Akoh, 1994). V roce 1987 v petici pro Food and Drug Administration navrhovala tyto podmínky pro použití Olestry jako nekalorické náhrady tuků:

- použití přísadků maximálně 35 % hmotnostních do tuku do pečiva, salátových olejů, tuků a olejů na vaření pro malospotřebitele v domácnostech;
- použití Olestry do 35 % hmotnostních jako přísadka do tuků a olejů pro hromadné stravování a pro výrobu a distribuci potravin a přísadka Olestry do 75 % hmotnostních do tuků a olejů používaných ke smažení;
- použití Olestry do 75% podílu v olejích a tucích pro výrobu snacků, bramborových lupínků, kukuřičných čipsů, extrudovaných výrobků a podobných produktů (Ziller, 1987).

Během let bylo patentováno široké spektrum aplikací polyesterů sacharosy, zejména firmou Procter and Gamble. Patenty (Adams et al., 1990; Kong-Chan et al., 1991; Young et al., 1992) na použití polyesterů sacharosy uvádějí zlepšení chuti, vůně a konzistence (pozitivní úpravu taktilních vlastností potraviny vyvolávající pocit hladkosti v ústech) pro ledové polevy na pečivu, šlehačkové pěny, cukrářské polevy, zeleninové zálivky, pomazánková másla, ztužené tuky, arašidové máslo, smetanové krémy, smetanové sýry, mražené dezerty atd. Použití polyesterů sacharosy v koncentraci do 0,1 % hmotnostního do salátových olejů zpomaluje krystalizaci vysokotajících složek oleje a brání jeho zakalení během skladování v chladu. Obdobně přispívá ke stabilitě majonéz při jejich dlouhodobém chladiřském skladování (Baur, Lutton, 1964). Našlehané výrobky připravené jako disperze dusíku jsou vysoce odolné proti sednutí, beze změn struktury jsou skladovatelné více než šest měsíců při pokojové teplotě (Adams et al., 1990). Podle údajů uvedených v patentech mají čedar a smetanové sýry, bramborové lupínky, popcorn, puffy, pelety a další extrudované výrobky, krackery i extrudované plátky ovoce v případě použití polyesterů sacharosy lepší vlastnosti, chuť i vůni. Estery

sacharosy s vyšším stupněm esterifikace se rovněž přidávají jako součást jedlých povlaků používaných pro zabránění přístupu vody k trvanlivému pečivu a k udržení jeho křehkosti (Greener, Fennema, 1992).

Vedle srovnatelných nebo lepších senzorických vlastností vykazují estery sacharosy také podobné funkční vlastnosti. Porovnání stability oleje a Olestry stejného kyselinového složení při dlouhodobém tepelném namáhání odpovídajícím hlubokému smažení ukázalo, že Olestra se svoji stabilitou minimálně vyrovná oleji na smažení (Henry et al., 1992). Podobný srovnávací pokus s oxidací během 12 hodin záhřevu na 100 °C vedl ke zjištění vyšší stability oktaesterů sacharosy. Olej se stejným složením mastných kyselin se za stejných podmínek oxidoval rychleji než směs čistých oktaesterů sacharosy (Rios et al., 1992).

Další oblasti použití

Vzhledem k růstu významu produkce tzv. nutriceutik – výrobků na hranici potravin a léčiv – nejsou z hlediska potravinářských aplikací nezajímavé farmakologické aplikace esterů a polyesterů sacharosy.

Mattson (1977) patentoval preparát na bázi polyesterů sacharosy obohacený vitaminy rozpustnými v tucích jako nízkokalorickou potravinu a v upravené formě jako prostředek pro prevenci hypercholesterolemie. Podobně jsou polyestery sacharosy navrhovány pro detoxikaci organismu zasaženého toxickými lipofilními produkty (např. DDT a PCB), podávání polyesterů urychluje vyloučení toxických látek z organismu (Volpenhein, Jandacek, 1980).

Polyestery sacharosy podávané orálně samotné nebo v kombinaci s lithocholovou kyselinou jsou pokládány také za bezpečný a účinný prostředek pro rozpouštění žlučových kamenů (Jandacek, 1981).

Estery sacharidů a deriváty glykosidů byly popsány též jako perspektivní prostředek proti neoplasmám, akné, psoriase, alergickým a zánětlivým dermatózám při povrchové aplikaci (Bollag, Wys, 1982).

Literatura

- ADAMS, K. D. – GRUENBACHER, D. P. – NOBLE, K. H.: Shelf stable highly aerated reduced calorie food products. U.S. Patent 4 919 964, 1990.
- AGGARWAL, A. M. – CAMILLIERY, M. – PHILIPS, S. F. – SCHLAGHECK, T. G. – BROWN, M. L. – THOMFORDE, G. M.: Olestra, a nondigestible, nonabsorbable fat. Effect on gastrointestinal and colonic transit. *Dig. Dis. Sci.*, 38, 1993: 1009–1014.
- AKOH, C.C. : Emulsification properties of polyesters and sucrose ester blends I: Carbohydrate fatty acid polyesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1992: 9–13.

- AKOH, C. C.: Synthesis of carbohydrate fatty acid polyesters. In: AKOH C. C. – SWANSON B. G. (Eds.): Carbohydrate polyesters as fat substitutes. New York, Marcel Dekker, Inc. 1994: 9–35.
- AKOH, C. C. – SWANSON, B. G.: Optimization of sucrose polyester synthesis: comparison of properties of sucrose polyesters, raffinose polyesters and salad oils. *J. Food Sci.*, 55, 1990: 236–243.
- BAUR, F. J. – LUTTON, E. S.: Salad oils and method of making them. U.S. Patent 3 158 490, 1964.
- BERTSCH, H. – PÜSCHEL, F. – ULSPERGER, E.: Manufacture and uses of fatty acid sugar esters. *Tenside*, 2, 1965: 397–404.
- BEUCHAT, L. R.: Comparison of anti-Vibrio activities of potassium sorbate, sodium benzoate, and glycerol and sucrose esters of fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 1980: 1178–1184.
- BIRCH, C. G. – CROWE, F. E.: Determination of sucrose polyesters by high performance gel permeation chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53, 1976: 581–583.
- BOGGS, R. W.: Sucrose polyester (SPE) – a non-caloric fat. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 88, 1986: 154–158.
- BOLLAG, W. – WYS, P. C.: Neoplastic compounds: sugar esters and glycosides. U. S. Patent 4 316 983, 1982.
- CHEN, N. M. – PAULL, R. E.: Development and prevention of chilling injury in papaya fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 111, 1986: 639–643.
- COHEN, E. – SHALOM, Y. – ROSENBERGER, I.: Postharvest ethanol buildup and off-flavor in Murcott tangerine fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 115, 1990: 775–778.
- DRAKE, S. R. – FELLMAN, J. K. – NELSON, J. W.: Post-harvest use of sucrose polyesters for extending the shelf-life of stored „golden delicious“ apples. *J. Food Sci.*, 52, 1987: 1283–1285.
- EBELER, S. E. – WALKER, C. W.: Effect of various sucrose fatty acid esters emulsifiers on high-ration white layer ckes. *J. Food Sci.*, 49, 1984: 381–385.
- FAROOQ, K. – HAQUE, Z. U.: Effect of sugar esters on the textural properties of nonfat low calorie yogurt. *J. Dairy Sci.*, 75, 1992: 2676–2680.
- FEUGE, R. O. – ZERINGUE, H. J., Jr. – WEISS, T. J. – BROWN, M.: Preparation of sucrose esters by interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 1970: 56–60.
- FUKUSHIMA, T.: Water-soluble nonionic surfactand compositions for preservation of vegetables and fruit. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 309 639*, 1989.
- GILLIS, A.: Fat substitutes, create new issues. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1988: 1708–1712.
- GLÜCK, C. J. – JANDACEK, R. J. – SUBBIAH, M. T. R. – GALLON, L. – YUNKER, R. – ALLEN, C. – HOGG, E. – LASKARZEWSKI, P. M.: Effect of sucrose polyester on fecal bile acid excretion and composition in normal men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 1980: 2177–2185.

- GREENER, I. – FENNEMA, O.: Lipid-based edible films and coatings. *Lipid Technology*, March-April, 1992: 34–38.
- GUPTA, R. K. – JAMES, K. – SMITH, F. J.: Analysis of sucrose mono- and diesters prepared from triglycerides containing C12 –C18 fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1983a: 1908–1913.
- GUPTA, R. K. – JAMES, K. – SMITH, F. J.: Sucrose esters and sucrose esters/glyceride blends as emulsifiers. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1983b: 862–866.
- HARA, S.: Manufacture of low-fat meat pastes. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 179 667*, 1989.
- HARRIGAN, K. A. – BREENE, W. M.: Fat substitutes: sucrose esters and simplese. *Cereal Foods World*, 34, 1989: 261–265.
- HENRY, D. E. – TALLMADGE, D. H. – SANDERS, R. A. – GARDNER, D. R.: Characterization of used frying oils. Part 2: Comparison of olestra and triglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1992: 509–519.
- HESS, K. – MESSMER, E.: Über die Synthese von Fettsäure Derivaten der Zuckerrarten. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 54B, 1921: 499–523.
- JANDACEK, R. J.: Devaloping a fat substitute. *Chemtech*, 21, 1991: 398–402.
- JANDACEK, R. J.: Galstone dissolution composition and method. U.S. Patent 4 264 583, 1981.
- JANDACEK, R. J. – WEBB, M. R.: Physical properties of pure sucrose octaesters. *Chem. Phys. Lipids*, 22, 1978: 163–167.
- JONES, H. F.: Process for the preparation of sucrose monoesters. U.S. Patent 4 306 062 (1981).
- JOSEPH, K. – AWORH, O. C.: Post harvest treatment of wild mango (*Irvingia gabonensis*) for improved shelf life. *Food Chem.*, 44, 1992: 45–48.
- KATO, A. – ARIMA, K.: Inhibitory effect of sucrose esters of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 1970: 596–599.
- KONG-CHAN, J. L. Y. – HELLYER, J. A. – TAFURI, M. W.: Simulated cheese analogs with reduced animal fat and calories. U.S. Patent 5 061 504, 1991.
- KOPEC, K.: Uskladňovanie zahradických plodín. Bratislava, Príroda 1977.
- KOSAKA, T. – YAMADA, T.: New plant and new applications of sucrose esters. In: HICKSON, J. L. (Ed.): *Sucrochemistry*. Washington, D.C., American Chemical Society 1977: 84 – cit. AKOH, C. C. – SWANSON, B. G. (1994).
- LEMIEUX, R. U. – McINNES, A. G.: The preparation of sucrose monoesters. *Can. J. Chem.*, 40, 1962: 2376–2382.
- MAREK, M. – MUSIL, P. – ČAPEK, K. – RANNÝ, M.: Způsob výroby esterů sacharosu s vyššími mastnými nasycenými nebo nenasycenými kyselinami. Czech. Patent. 269 749, 1991.
- MARSHALL, D. L. – BULLERMAN, L. B.: Antimicrobial activity of sucrose fatty acid esters emulsifiers. *J. Food Sci.*, 51, 1986: 486–488.

- MATTSON, F. H.: Composition for inhibiting absorption of cholesterol. U.S. Patent 4 034 083, 1977.
- MATTSON, F. H. – HEALTHY, M. – VOLPENHEIN, R. A.: Low calorie fat containing food composition. U.S. Patent 3 600 186, 1971.
- MENTZER-MORRISON, Z.: Fat substitutes in foods: Growing Demand and Potential Market. In: AKOH, C. C. – SWANSON, B. G. (Eds.): Carbohydrate polyesters as fat substitutes. New York, Marcel Dekker, Inc. 1994: 237–259.
- MIETH, G. – ELSNER, A. – WEISS, A.: Zur synthese und charaktisierung von saccharose-fettsaure polyestern, 1. Mitt. über ein neues synthese verfahren. Nahrung, 27, 1983: 747–751.
- MUSSO, S. – PAGES-XATART, P. X. – BOUVRON, C.: Sugar esters and especially saccharose esters. Eur. Patent 62565, 1982.
- NAKAMURA, S. – KAWAGUCHI, J.: High-pressure sterilization of food using sucrose fatty acid esters. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP. 05 284 949, 1993.
- OSIPOW, L. I. – ROSENBLATT, W.: Micro-emulsion process for the preparation of sucrose esters. J. Am. Oil Chem. Soc., 44, 1967: 307–311.
- OSIPOW, L. I. – SNELL, F. D. – YORK, W. C. – FINCHLER, A.: Methods of preparation of fatty acid esters of sucrose. Ind. Eng. Chem., 48, 1956: 1459–1465.
- RIOS, J. J. – PEREZ-CAMINO, M. C. – MARQUEZ-RUIZ, G. – DOBARGANES, M. C.: Comparison of oxidation of sucrose octaesters and triacylglycerols derived from olive oil. Food Chemistry, 44, 1992: 357–362.
- RIZZI, G. P. – TAYLOR, H. M.: A solvent-free synthesis of sucrose polyesters. J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 1978: 398–401.
- SHI, N. – GU, X.: Studies on use of sucrose fatty acid esters as preservatives for citrus fruits. Shipin Kexue, 83, 1986: 55–57, podle Chem. Abstr., 106, 1987, 118 427e.
- SWANSON, B. G. – AKOH, C. C.: A Background and History of Carbohydrate Polyesters. In: AKOH, C. C. – SWANSON, B. G. (Eds.): Carbohydrate polyesters as fat substitutes. New York, Marcel Dekker, Inc. 1994: 1–9.
- TOMA, R. B. – CURTIS, D. J. – SOBOTOR, C.: Sucrose Polyester: Its Metabolic Role and Possible Future Applications. Food technology, January 1988: 93–95.
- VOLPENHEIN, R. A.: Synthesis of higher polyol fatty acid polyesters using carbonate catalysts. U.S. Patent 4 517 360, 1985.
- VOLPENHEIN, R. A. – JANDACEK, R. J.: Detoxifying lipophilic toxins. U.S. Patent, 4 241 054, 1980.
- VYDRA, T. – ČAPEK, K.: Chemie sacharosy. Chem. Listy, 83, 1989: 686–715.
- WALKER, C. E.: Food application of sucrose esters. Cereal Foods World, 29, 1984: 286–292.
- WEISS, T. J. – BROWN, M. – ZERINGUE, H. J. – FEUGE, R. O.: Quantitative estimation of sucrose esters of palmitic acid. J. Am. Oil Chem. Soc., 48, 1971: 145–148.

YAMAMOTO, T. – KINAMI, K.: Production of sucrose fatty acid polyester. U.S. Patent 4 611 055, 1986.

YOUNG, J. D. – KESTLER, J. J. – WEHMEIR, T. J. – FOX, M. M. – LETTON, J. C.: Reduced calorie potato chips and other low moisture fat-containing foods having less waxiness and improved flavor display. U.S. Patent 5 085 884, 1992.

ZILLER, S. A.: Olestra as calorie free substitute for fats and oils. Cincinnati, OH, Procter and Gamble 1987: 1036.

Preparation and use of sucrose fatty acid esters

Review deals with different ways of synthesis of sucrose fatty acid esters and their application in food industry and in other fields of practice. Experimental, technical and environmental aspects of preparation of esters with low degree of esterification (up to three fatty acids in the molecule) and sucrose polyesters of higher degree of esterification are discussed. The analytical procedures for their determination are described as well. The possibilities of practical use and general properties (nutrative value, antimicrobial effects, physical properties, etc.) of the both types of sucrose esters are summarized.

Kontakní adresa:

Doc. Ing. Miroslav Marek, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická,
Ústav konzervace potravin a technologie masa, Technická 5, 166 28 Praha 6,
Česká republika, tel.: 02/2435 3083, fax: 02/311 90 99;
e-mail: fpbt-office@vscht-cz

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Životní jubileum Ing. Alexandra Szokolaye, DrSc.

V červenci t. r. oslavil v Bratislavě své okrouhlé narozeniny jeden z nejvýznamnějších československých potravinářských chemiků – Ing. A. Szokolay, DrSc. (*15. 7. 1925). Od ukončení studií v roce 1952 se dodnes nepřetržitě zabývá problematikou cizorodých látek potravinového řetězce a obecnou ekotoxikologií.

Podstatnou část svého odborného života prožil jubilant ve zdravotnickém výzkumu, zprvu v bývalém Výzkumném ústavu hygieny a poté ve Výzkumném ústavu preventivního lékařství v Bratislavě. Zde jej také zastihla éra intenzivní chemizace našeho zemědělství se svými pozitivními i negativními dopady. Právě méně příznivé důsledky na zdraví člověka a životní prostředí se staly hlavním předmětem jeho zájmu. Nejhlouběji propracoval problematiku pesticidů, zejména v živočišných produktech.

V období 1967 až 1969 pracoval v Německu jako stipendista Nadace Alexandra von Humboldta. Plných 16 let byl externím spolupracovníkem FAO/WHO. Od roku 1966 do roku 1991 přednášel na Slovenské technické univerzitě (bývalé SVŠT). V letech 1981 až 1988 zastával funkci ředitele Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě. V současné době je expertem Státního zdravotnického ústavu SR.

V oblasti cizorodých látek je jubilant všeobecně uznávaným a vysoce ceněným odborníkem a je možné bez nadsázky hovořit o jím založené vědecké škole této disciplíny. Za vyvrcholení jeho neobyčejně bohaté publikační činnosti (přes 280 vědeckých a odborných statí včetně šesti knih a téměř tolik přednášek na konferencích, symposiích a seminářích doma i v zahraničí) je možné označit tyto monografie: *Szokolay, A.: Cudzorodé látky v poživatinách* (Martin 1969 a 1983) a *Rozsival L., Engst R., Szokolay A.: Fremd- und Zusatzstoffe in Lebensmitteln* (Leipzig 1978). Tyto publikace stále slouží jako jedny ze základních příruček potravinářských a zdravotnických výzkumných a kontrolních pracovišť.

Významný podíl v odborné činnosti Ing. Szokolaye zaujímají i práce z analytické oblasti. Nezůstával přitom jen u samotných metod stanovení, vždy se snažil odevzdat své poznatky do praxe cestou návrhů na legislativní úpravy a kritéria uplatňovaná při hodnocení úrovně výživy obyvatelstva.

A. Szokolay je také jedním z hlavních zakladatelů a organizátorů konferencí o cizorodých látkách, které jsou už po několika desetiletí pravidelně pořádány v Tatrách. Letošní v pořadí už XVI. konference v Tatranské Štrbě byla věnována právě jubilantově počtě.

Ing. Alexandr Szokolay, DrSc., patří do elitní skupiny osobností československých potravinářských věd. Po rozdělení státu je horlivým zastáncem co nejširších a nejčastějších kontaktů a konkrétní spolupráce českých a slovenských odborníků.

Přejeme mu ještě mnoho let dobré duševní a tělesné kondice, která mu umožní další čínorodou práci v oboru, který má rád a v němž stále mnoho znamená.

doc. Ing. Jaroslav Prugar, DrSc.

Instructions for authors

Manuscripts in duplicate should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic.

Authors have full responsibility for the contents of their papers, including any correction made by the editors. The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

Original papers should not consist of more than 12 typewritten pages (2-linespacing), short communications may not exceed 3 typewritten pages. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

Abstract is an information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes. It is published in the language the paper is written in, it should comprise base numerical data including statistical data. Each manuscript must contain a short or a longer summary.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

Material and Methods: Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. The same data should not be presented in both tables and figures. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited).

The **citations** shall be presented pursuant to the standard. They are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number.

OBSAH – CONTENTS

Pokorný J., Kalinová L., Velíšek J.: Time-intensity bitterness evaluation of bitter liqueurs – Časová závislost při stanovení intenzity hořkosti hořkého likéru	257
Bílková K., Králová B.: α -glucosidases from microbial sources – α -glucosidasa z mikrobiálních zdrojů	267
Pločková M., Chumchalová J., Husáková J., Šviráková E.: Agar diffusion assay for nisin quantification using <i>Bacillus stearothermophilus</i> as an indicator organism – Kvantitativní stanovení nisinu agarovou difuzní metodou za použití indikátorového kmene <i>Bacillus stearothermophilus</i>	279
Moravcová J., Filip V., Křístková K., Kubelka V., Jedináková V.: The fatty acid composition in <i>Hippophae rhamnoides</i> L. oils – Složení mastných kyselin v olejích rostliny <i>Hippophae rhamnoides</i> L.	287
Hochel I., Málková K., Rauch P.: Stanovení salmonel metodou ELISA – Determination of salmonellas by ELISA	299
Koreňovská M., Poláčeková O.: Distribúcia ortuti v mlieku – Distribution of mercury in milk	313
PŘEHLEDY – REVIEWS	
Marek M., Voldřich M., Čurda D., Kopečný J.: Příprava a použití esterů mastných kyselin se sacharosou – Preparation and use of sucrose fatty acid esters.	321
Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA	
Prugar J.: Konference o cizorodých látkách na Slovensku	298
ŽIVOTNÍ JUBILEA	
Prugar J.: Životní jubileum Ing. Alexandra Szokolaye, DrSc.	335

Vědecký časopis POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY ♦ Vydává Česká akademie zemědělských věd – Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha ♦ Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/251 098, fax: 02/257 090, e-mail: braum@uzpi.agrec.cz ♦ Sazba a tisk: ÚZPI Praha ♦ © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1995

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2