ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY
FOOD SCIENCES

5

ROČNÍK 15
PRAHA 1997
CS ISSN 0862-8653

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY
FOOD SCIENCES

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Abstracts from the journal is comprised in Agrindex of FAO (AGRIS database), Food Science and Technology Abstracts, Dairy Science Abstracts, Chemical Abstracts, PASCAL – CD-ROM (INIST), 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, prof. Ing. Dušan Čurda, CSc., prof. Ing. Jiří Davídek, DrSc., Ing. Jan Drbohav, CSc., Ing. Jiřina Houšová, CSc., prof. Ing. Ivo Ingr, DrSc., prof. Ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc., Ing. Olga Štiková, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

Prof. Dr. Werner Baltes (Germany), Dr. Reto Battaglia (Switzerland), Ing. Milan Kováč, CSc. (Slovak Republic), Prof. Dr. Halina Kozlowska (Poland), Prof. Dr. Radomir Lásztity (Hungary), O. Univ. Prof. Dr. Werner Pflannhauser (Austria), Prof. Ing. Alexander Príbela, DrSc. (Slovak Republic)

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 1997 is 306 Kč, 76 USD (Europe) and 80 USD (overseas)

Periodicity: The journal is published six times a year.

Contact address: Slezská 7, 120 56 Prague 2, Czech Republic,
tel.: 00 420 2 251 098; fax: 00 420 2 242 539 38; e-mail: fofo@uzpi.cz

© Institute of Agricultural and Food Information, Prague 1997 MK ČR 6696

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 321–328

PREPARATION AND CHARACTERISATION OF A DEXTRAN-LYSOZYME CONJUGATE*

Alexandra PROŠKOVÁ, Marija GOTTVALDOVÁ, Jiří KUČERA

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract: Hen egg lysozyme was attached to dextran or Ida-dextran (Imino--Diacetic Acid) after activation of the polysaccharide by using a periodate oxidative method. The soluble dextran-lysozyme conjugate was purified by gel permeation chromatography. The conjugate enzyme has greater thermal stability compared with native lysozyme, but the antibacterial spectrum is unchanged. The activity yield was 27% only, which is probably done by crosslinking of the activated polysaccharide with the enzyme as a polyfunctional reagent.

lysozyme; dextran; covalent immobilization; bactericidal enzyme conjugate

Lysozyme in the presence of polysaccharides or EDTA is known to modify its activity against different microbial strains. Moreover, naturally occurring glycoproteins and carbohydrate-free enzymes that have been covalently attached to insoluble polysaccharide supports often have stability properties that are superior to those of carbohydrate-free enzymes (e.g. Bustos et al., 1996; Fagain et al., 1994). Even di- or oligosaccharide substituted enzymes show higher thermal stability, compared with native ones. We therefore predicted that conjugates prepared by coupling of lysozyme to dextran or iminodiacetic acid substituted dextran might show the improved stability of the corresponding insoluble conjugate and might show broader antimicrobial spectrum. In this paper, the method of preparation of lysozyme-polysaccharide conjugate and antimicrobial activity against a set of model micro-organisms is described.

* This work was supported by grant of the Grant Agency of Czech Republic, grant no. 525/96/0523.

MATERIAL AND METHODS

Lysozyme (food grade) was from Pro.Med.Cs company, Prague, CZ. Dextran (mol. weight approx. 5.10^5) and Sephadex G-100 from Pharmacia, Uppsala and iminodiacetic acid from Koch-Light Suffolk.

Protein concentration was determined according to Hartree (1972). Lysozyme activity was determined according to Prockop and Davidson (1964) based on nephelometric determination of the lysis of *Micrococcus luteus* under standard conditions. 1 unit of lysozyme activity is the amount of the enzyme causing a decrease of optical density 0.001 at 546 nm.

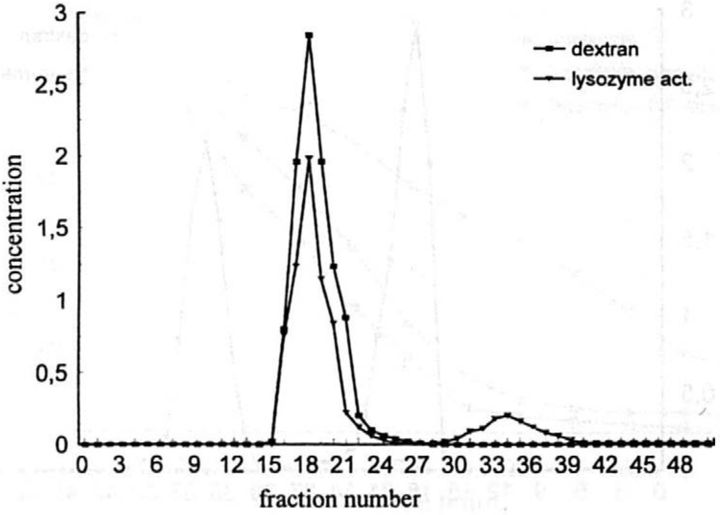
Dextran concentrations were measured by the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1956).

Iminodiacetic acid is covalently bound to dextran by the modification of original Poraths method (Hubert, Porath, 1980). Dextran (50 g) was dissolved in 2M Na_2CO_3 (500 ml) and epichlorohydrin (1.0 ml) was added. Reaction mixture was stirred for 6 hours at 50 °C and dialysed against three changes of 2M Na_2CO_3. Iminodiacetic acid (5 g) was then added to the dialysed reaction mixture and reaction continued for another 6 hours. Second dialysis was carried out against distilled water and dialysed product was lyophilised. This IDA-dextran was used without further purification.

Dextran or IDA-dextran were oxidised with periodate and hen egg lysozyme was covalently bound to activated polysaccharide according to Sanderson and Wilson (1971). The only difference in the binding protocol was the use of Sephadex G-50 for product separation instead of filtration. The product was then reduced using natrium borohydride and separated on Sephadex G-50 again.

RESULTS

A sample of the product (50 mg) was chromatographed on Sephadex G-50 and the column fractions were analysed for carbohydrate, protein, and lysozyme activity. Most of the enzyme activity was eluted at the void volume of the column, associated with dextran (see Fig. 1 for dextran-lysozyme conjugate) similarly for both conjugates. A control run, in which appropriate amounts of dextran and lysozyme were mixed and subjected to Sephadex G-50 chromatography on the same column, showed that the mixture is sepa-



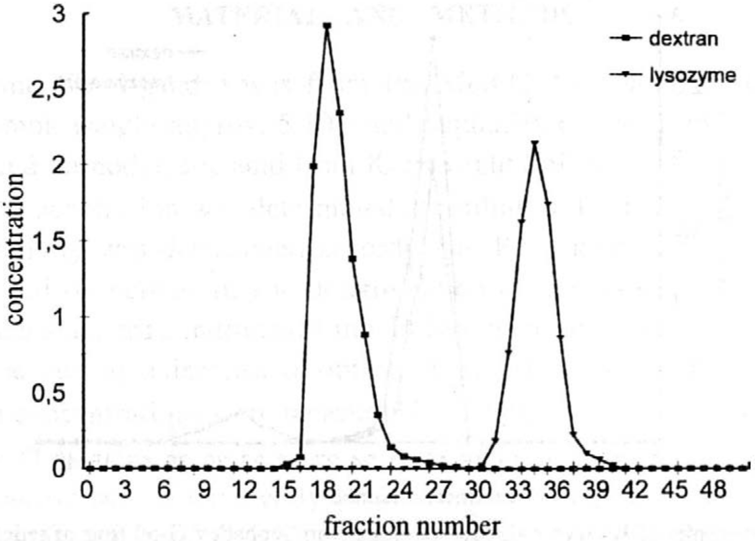
1. Chromatography of lysozyme-dextran conjugate on Sephadex G-50 (mg of reducing sugars per ml for dextran and enzyme units 10^{-3} for lysozyme as concentration)

rated under such conditions (Fig. 2). Thus, it was concluded that the lysozyme had been covalently attached to the dextran or IDA-dextran. Analysis showed the dextran-lysozyme conjugate contains 72% carbohydrate and 26.8% of the specific activity of the native enzyme (calculated on the protein base). Similarly, the IDA-dextran lysozyme was shown to contain 67% carbohydrate and 24.5% of the specific activity of the native enzyme.

pH activity curves for lysozyme and its dextran conjugates were determined by measurement of the decrease in turbidity of suspension of *Micrococcus luteus* (by the same method as the determination of lysozyme activity was carried out) in the phosphate buffer (0.1M) of various pH values. The

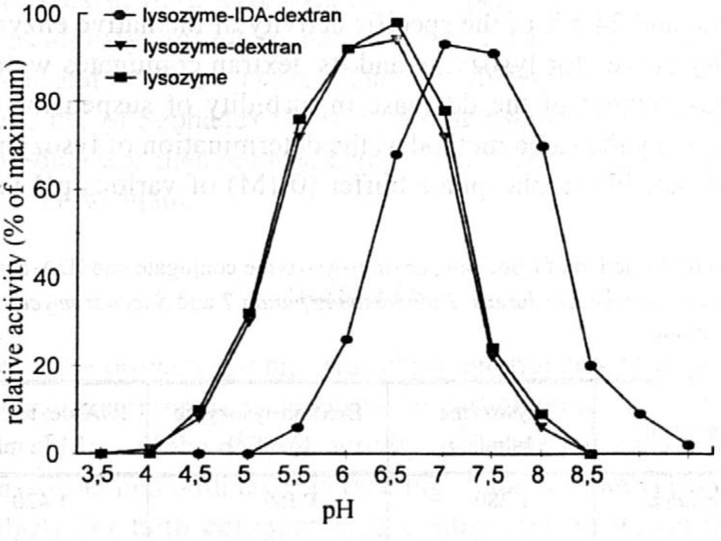
I. Comparison of the action of lysozyme, dextran-lysozyme conjugate and IDA-dextran-lysozyme conjugate on *Micrococcus lureus*, *Pseudomonas putida* 7 and *Saccharomyces cerevisiae* in standard conditions

Microorganism	Lysozyme [u.ml^{-1}]	Dextran-lysozyme [u.ml^{-1}]	IDA-dextran-lysozyme [u.ml^{-1}]
Micrococcus luteus	1 280	1 360	1 420
Ps. putida 7	0	118	6
S. cerevisiae	0	0	98

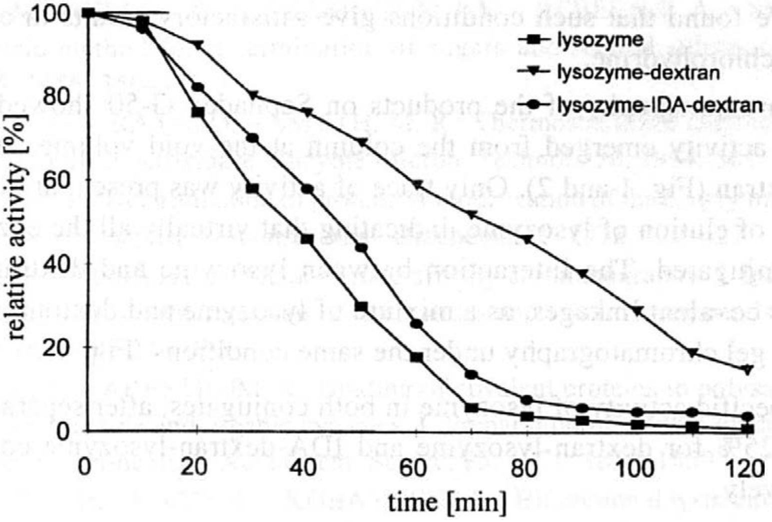


2. Chromatography of dextran and lysozyme mixture on Sephadex G-50 (dimensions the same as in Fig. 1)

pH-activity curves of lysozyme and dextran-lysozyme conjugate were closely similar, but that of IDA-dextran-lysozyme conjugate shows pH profile shifted to the alkaline region (Fig. 3).



3. pH activity curves of lysozyme, lysozyme-dextran conjugate and lysozyme-IDA-dextran conjugate



4. Heat stability of lysozyme and lysozyme conjugates at 55 °C, pH 6.3

Activity determination was carried-out by the same method as described in the previous part but using Gram-negative bacteria *Pseudomonas putida* strain 7, *Saccharomyces cerevisiae* instead of *Micrococcus luteus* as testing micro-organisms and dextran-lysozyme and IDA-dextran-lysozyme conjugates as enzymes. The activities found are summarised in Table I.

To determine heat stability the solution of lysozyme and lysozyme conjugates (approx. 0.05 mg protein/ml) in 0.06 M phosphate pH 6.3 were heated to 55° C and samples removed at intervals for activity determinations (Fig. 4).

DISCUSSION

During the initial attempts to activate soluble dextran with concentrations of epichlorohydrine similar to those used for activation of insoluble polysaccharides (Porath, 1976), rapid, irreversible precipitation of the polysaccharide took place during the activation procedure. This was considered to be a result of cross-linking of polysaccharide chains by side reaction. Kagedal and Akestrom (1971) experienced similar problems during activation of soluble dextran with cyanogen bromide, prior to coupling of compounds like insulin, and found that the insolubilization during activation could be prevented by using lower concentrations of cyanogen bromide. We

also have found that such conditions give satisfactory results in activation with epichlorohydrine.

Gel chromatography of the products on Sephadex G-50 showed that the enzyme activity emerged from the column at the void volume, associated with dextran (Fig. 1 and 2). Only trace of activity was present at the normal position of elution of lysozyme, indicating that virtually all the enzyme had been conjugated. The interaction between lysozyme and dextran clearly involves covalent linkages, as a mixture of lysozyme and dextran was separated by gel chromatography under the same conditions (Fig. 3)

The specific activity of lysozyme in both conjugates, after separation, was 27 and 25% for dextran-lysozyme and IDA-dextran-lysozyme conjugates, respectively.

A study of the effect of pH on the activity of lysozyme and dextran-lysozyme conjugate showed this to be closely related for both forms of the enzyme. On the opposite, the IDA-dextran-lysozyme conjugate has pH optimum shifted to the higher value. We suppose this to be done by the two carboxylic groups present in imino-diacetic acid (Fig. 4).

Lysozyme is thermally stabilised by both, the dextran and IDA-dextran binding.

Lysozyme was shown to be slightly active against yeasts in the presence of EDTA (Pavlowskii et al., 1976)) and against Gram-negative bacteria in the presence of polysaccharides (Nakamura et al., 1992). As shown in Table I, the IDA-dextran lysozyme conjugate (with the properties similar to EDTA) was not active against yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (approx. 6.9% of the activity against *Micrococcus luteus*), nor was dextran lysozyme conjugate active against Gram-negative bacteria *Pseudomonas putida* (8.6% of the activity against *M. luteus*). The activities determined (Table I) are too low for practical purposes, but show the way of promising modification.

References

BUSTOS, R O. – ROMO, C. R. – HEALY, M. G.: Stabilization of trypsin-like enzymes from Antarctic krill: effect of polyoils, polysaccharides and proteins. J. Chem. Technol. Biotechnol., *65*, 1996: 193–199.

DUBOIS, M. – GILLES, K. A. – HAMILTON, J. K. – REBERS, P. A. – SMITH, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., *28*, 1956: 350–356.

FAGAIN, C. O. – RAYN, O. – SMYTH, M. R.: Thermostabilized chemical derivatives of horseradish peroxidase. Enzyme Microb. Technol., *16*, 1994: 501-505.

HARTREE, E. F.: Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem., *48*, 1972: 422–427.

HUBERT, P. – PORATH, J.: Metal chelate affinity chromatography. I. Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds. J. Chromatogr., *198*, 1980: 247–255.

KAGEDAL, L. – AKESTROM, S.: Binding of covalent proteins to polysaccharides by cyanogen bromide and organic cyanates. I. Preparation of soluble glycine-, insulin-, and ampicilin-dextran. Acta Chem. Scand., *25*, 1971: 1855–1859.

NAKAMURA, H. – KATO, A. – KOBAYASHI, K.: Bifunctional lysozyme-galactomannan conjugate having excelent emulsifying properties and bactericidal effect. J. Agric. Food Chem., *40*, 1992: 735–739.

PAVLOWSKII, P. E. – CHERKASOV, I. A. – CHIKINA, N. S.: Content and some properties of Lysozyme in organs of sloughter cattle. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., *12*, 1976: 134–137.

PORATH, J.: General methods and coupling procedures. In: Methods in Enzymology. Vol 34, New York, London, Acad. Press 1976: 13–29.

PROCKOP, D. J. – DAVIDSON, W. D.: A study of urinary and serum lysozyme in patient with renal disease. New Engl. J. Med., *270*, 1964: 269–274.

SANDERSON, C. J. – WILSON, D. V.: Simple method for coupling proteins to insoluble poysaccharides. Immunology, *20*, 1971: 1061.

Received June 17, 1997

Příprava a charakterizace konjugátu dextran-lysozym

Vaječný lysozym byl kovalentně navázán na dextran a imino-diacetyldextran. Oba polysacharidy byly před vazbou aktivovány oxidací jodistanem. Po vazbě lysozymu byl konjugát stabilizován redukcí natrium borohydridem. Takto připravené rozpustné konjugáty jsme purifikovali gelovou chromatografií na Sephadexu G-100. Prokázali jsme, že se dobře oddělí jak od α nesubstituované dextranu, tak i od nenavázaného lysozymu. Získané konjugáty mají výrazně vyšší termostabilitu, ale jejich antibakte-

riální spektrum zůstává nezměněno. Výtěžek vázané enyzmové aktivity je poměrně nízký (pouze 27 %). Toto je pravděpodobně způsobeno síťěním aktivovaného polysacharidu jako bifunkčním (polyfunkčním) činidlem.

lusoym; dextran; kovalentní imobilizace; baktericidní enzymový konjugát

---

Contact address:

Ing. Alexandra P r o š k o v á, Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 7, 102 31 Praha 10, Český repubika
Phone: + 420 2 702 315, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp.anet.cz

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 329–342

INITIAL FREEZING POINT VS. COMPOSITION OF FRUITS*

Zbyněk MAYER, Milan HOUŠKA

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract: It was tried to correlate the initial freezing point of fruits with their dry matter composition by using a quite simple linear relationship between the initial freezing point on the one hand and the molality of soluble solids on the other. Such relation $\Delta T = K_f m_s$ was originally derived on the basis of Clausius-Clapeyron equation and Raoult's law for the freezing point depression of dilute aqueous solutions of non-electrolytes. It turned out that such a simple relationship can be used for a rough estimation of the initial freezing point of various fruits as long as the molality value does not exceed ca. 1 mol/kg.

fruits; initial freezing point; composition; soluble solids; correlation

Freezing point is one of the fundamental thermophysical characteristics of foods. Its knowledge is of importance in freeze-concentration processes, in analyzing the freezing and thawing of various foods or in the determination of effective molecular weight of food systems. The value of the freezing point also indicates the susceptibility of the food to microbial growth; the lower the initial freezing point, the more microbiologically stable the food. Moreover, the initial freezing point is a key characteristic of the food, indispensable for COSTHERM calculations.

The COSTHERM software is a very powerful tool for the prediction of thermal properties of foods as a function of temperature (Miles et al., 1983). One of the key input parameters is the initial freezing point. This physical property should be known and input into the program, otherwise the program will use a default value. The original version of COSTHERM provided only four very approximate estimates of the initial freezing point, based on the moisture content of the food in four broad categories, namely moist, semi-moist, semi-dry and dry.

* This work was supported by a grant from the European Union, project No. ERB CIPA CT 93-0240.

Our project (Hledá se spolupráce s průmyslem, 1995; An international joint research project..., 1996; Nesvadba, 1997) should enhance the quality of the COSTHERM program and enable the user to evaluate the thermal properties with higher precision. For this reason, we collected the initial freezing point and composition data of different foods from literature sources (Houška, Mayer, 1996). The subsequent step was the general correlation between the freezing point on the one hand and the corresponding composition on the other hand with the final objective to enable the prediction of the initial freezing point of foods. The results were already submitted for publication (Miles et al., to be published).

The original compilation of initial freezing points (Houška, Mayer, 1996) was made mostly from review papers and monographs (Čubik, Maslov, 1965; Woolrich, Bartelett, 1965; Heldman, 1975; Lewis, 1987; Heldman, Lund, 1992) and involved various food commodities, e.g. fruits and vegetables, meat and meat products, milk and dairy products, fish and sea products, eggs etc. Now, we have completed the freezing point data compilation from prime literature sources as well. In the present paper, we will concentrate especially on fruits.

Historical and theoretical background

Original data on the initial freezing point of fruits can be found in a number of papers (Smith, 1931; Rjutov, Veselova, 1939; Short, Bartlett, 1944; Staph, Woolrich, 1951; Fikiin, Fikiin, 1995). They were generally experimentally determined together with specific heat content and/or heat capacity in connection with the research on the food behaviour in the solid-liquid phase transition region. The literature data concerning the initial freezing points are usually cited together with moisture contents of the respective foods (Shafiur Rahman, 1995). The prime efforts to express somehow the dependence of freezing points on other factors (e.g. composition) were therefore such as to represent them as a function of water (or dry matter) content. Thus, Fikiin et al. (1970) and Fikiin, Fikiin (1995) established a linear relationship and quadratic parabolic relationship between the cryoscopic temperature (initial freezing point) and dry matter content (or carbohydrates content) of fruit juices and of grapes, respectively. Similarly, Chang and Tao (1981) suggested a para-

bolic dependence of the freezing point of fruits and vegetables upon their moisture content. However, the regression dependence proposed by them is inconsistent with their own data (Chang, Tao, 1981).

Guegov (1980) found a linear correlation between the cryoscopic temperature and the soluble solids content of fruits and vegetables. The cryoscopic points were measured for a great number of samples by thermal analysis, the corresponding soluble solids content (x_i) of each sample was determined by refractometry. There was a linear relationship between cryoscopic temperature (t_c) and x_i which was described by $t_c = 0.36 - 0.175\ x_i$ for x_i in the range $3.5 \div 27\%$.

Gane (1948) studied the freeze-concentration of several fruit juices and published data on their freezing points and specific gravities in dependence upon total solids concentration. When the concentration/freezing point data are plotted, there results a series of straight lines if concentrations are expressed as total soluble solids weight per 100 g water. The juices, in fact, behave as if they were solutions of non-dissociating solutes with a molecular weight of about 180.

Riedel (1949) investigated refraction indices and freezing points of a number of fruit juices at various concentrations and compared them with corresponding data for aqueous solutions of glucose and saccharose. The freezing curves (the freezing point vs. dry matter content dependence) of fruit juices lay between those of glucose and sucrose solutions, more closely to glucose solution curve in accordance with prevailing monosaccharide over disaccharide contents in the fruit juices investigated.

Chandrasekaran and King (1971) presented a method for predicting solid-liquid phase equilibria in multicomponent aqueous sugar solutions through the use of ideal-solution concepts. The method is illustrated in terms of the limiting thermodynamic equilibrium freezing behaviour of fruit juices and predictions are compared with experimental data. The dissolved solid contents of most natural fruit juices lie between 5 and 15% by weight. The dissolved solids are largely mixtures of common sugars – two monosaccharides (D-fructose and D-glucose) and one disaccharide, namely sucrose. The percentages of these three sugars vary widely from one type of juice to another and even from one variety to another of the same juice. Since soluble carbohydrates make up between 89 and 98% wt. of the total dissolved solids,

the juices were treated, to a first approximation, as quaternary systems of the three major sugars and water. The predictions of initial freezing point vs. total dissolved solids content for typical apple juice and orange juice make-up were compared with reported experimental data for apple and orange juice.

Chen and Nagy (1987) investigated thoroughly the prediction and correlation of freezing point depression of aqueous solutions by means of extending the thermodynamic theory of an ideal solution to characterize real solutions. The freezing point depression is one of so-called colligative properties which depend on the number but not the nature of particles in a system. Several formulations of freezing point laws are available in the literature; all have been derived on the basis of the Clausius-Clapeyron equation which follows from the second law of thermodynamics (Brdička et al., 1972). The approximate form of the Clausius-Clapeyron equation is as follows:

$$\Delta T = \frac{-R\, T_1 \, . \, T_0}{\Delta H} \ln a_W \qquad [1]$$

where: $T = T_0 - T_1$ – freezing point depression

T_0 – freezing point of pure solvent

T_1 – freezing point of solution

R – constant of the ideal gas law

ΔH – average molar heat of fusion between T_0 and T_1

a_W – water activity

For a small value of the freezing point depression (FPD), the following approximate equation can be obtained:

$$\Delta T = \frac{-R\, T_0^2}{\Delta\, H} \ln a_W = -\frac{K}{M_W} \ln a_W \qquad [2]$$

where: K = 1000 K_f (K_f is the cryoscopic constant of water which equals 1.86 °K.kg/mol)

M_W – molecular weight of water

This simplified equation [2] was used as the basis for developing models for both ideal and non-ideal systems (Chen, Nagy, 1987).

According to Raoult's law, water activity a_W is related to the mole fraction of water in solutions. For an ideal solution, i.e. a very dilute concentration, Raoult's law of water activity may be written as:

$$a_W = \frac{1 - X_S}{1 - X_S + EX_S} \quad [3]$$

where: X_S – solute concentration in weight fraction

E – ratio of the molecular weight of water (M_W) to the molecular weight of solute (M_S)

By substituting equation [3] for a_W in equation [2], the corresponding FPD equation becomes:

$$\Delta T = -\frac{K}{M_W} \ln \left[\frac{1 - X_S}{1 - X_S + EX_S} \right] \quad [4]$$

For dilute aqueous solutions with a_W approaching unity, this equation can be further simplified by substituting the first two terms of the Taylor series development for the logarithmic function (Rektorys, 1973) and rearranging the right-hand side of the equation:

$$\Delta T = \frac{K X_S}{(1 - X_S) M_S} \quad [5]$$

Chen (1988) studied the initial freezing point of concentrated orange juices as a function of soluble solids concentration, i.e. the so-called equilibrium freezing curve. The total soluble solids in orange juice are mainly sugars and organic acids. The measured freezing point depression (FPD) data were generally greater than those predicted from the ideal FPD equation based on the Raoult's law. The deviations from the ideality were attributed to the water-binding property of solute molecules and modified Raoult's law was used:

$$\Delta T = \frac{K_0 X_S}{(1 - X_S - b X_S) M_S} \quad [6]$$

where: $\Delta T = T_0 - T_l$ – the FPD

T_0 – freezing point of pure water

T_l – freezing point of orange juice

X_S – mass fraction of solutes

M_S – effective molecular weight of all constituent solutes

K_0 = 1860 is the van't Hoff's constant and *b* is mass of bound water per unit mass of solids (Schwartzberg, 1976).

The amounts of bound water *b* for three sorts of concentrated orange juices were in the range 0.15 to 0.40 kg/kg solids.

The hydration theory was further developed by Chen (1989) and used for adequate explanation of deviations of colligative properties in sucrose solutions from those predicted by the ideal solution laws. It is the hydration of solute or molecular association by hydrogen bonding between hydroxyl groups and water which is mainly responsible for these deviations (Chen, 1987).

Besides, an alternative semi-empirical FPD equation was used by Chen et al. (1990):

$$\Delta T = \frac{K X_S \,(1 + C X_S)}{(1 - X_S)\, M_S} \qquad [7]$$

where: C – coefficient of solute-solvent interaction

In this paper, freezing points of orange juices and model sugar-acid-water systems at various solute concentrations were investigated using models of solution theory. The observed FPD values of citrus juices were lower than those of the model system of comparable average molecular weight. The differences were characterized by a parameter which accounted for the solute-solvent interactions. Models with generalized values were presented which allowed the prediction of equilibrium freezing curves of fruit juices based on proximate sugar-acid composition.

Considering citrus juices as a multi-component system of fructose-glucose-sucrose-citric acid-water, the effective molecular weight can be calculated according to the relation:

$$M_{\mathrm{eff}} = \frac{\sum_{i}^{n} X_i}{\sum_{i}^{n} (X_i/M_i)} \qquad [8]$$

where: M_{eff} – effective molecular weight of all constituent solutes

X – mass fraction of solutes

i – denotes the i-th component

The effective molecular weights calculated in this manner on the basis of proximate composition agreed very well with those determined previously by the FPD method (Chen, 1988). These results indicated that the sugar-acid constituents can account for the effective molecular weight of citrus juices whereas the effects of other constituents, such as insoluble pectic substances, are negligible.

Probably, one of the most thorough investigations in this field was carried out by Matsuoka (1992), who measured the freezing point depression of several natural fruit and vegetable juices at various concentrations, along with the FPD values of aqueous solutions of their individual components, i.e. glucose, fructose, sucrose, citric acid, malic acid and tartaric acid, and the FPD values of model *quasi*-juices, artificially prepared from pure substances according to tabulated proximate composition. By comparing the effective molecular weights calculated on the basis of the chemical composition with those – evidently lower – evaluated from the respective freezing point depression, it was obvious that the afore-mentioned organic acids must have dissociated and thus contributed to greater FPD. As for the three sugars and their mixture, the predicted and actual effective molecular weights agreed within max. 3% at concentrations up to 10% wt.

Miles et al. (to be published) developed a universal relationship which takes into account the effect of all constituents, including organic acids, mineral substances and their possible dissociation, as well as the effect of bound water upon the freezing point of diverse foods.

Experimental

It follows from the foregoing explication that the major part of efforts to correlate the initial freezing point with chemical composition concerned, hitherto, fruit or vegetable juices rather than fruits as such. We decided therefore to try it by using the ever simplest relation [5], in slightly modified form [9], according to which the freezing point depression in dilute solutions of non-electrolytes is proportional to molecular concentration of the solute expressed as so-called molality m_S, i.e. the number of moles per 1 kg of solvent:

$$\Delta T = -T_1 = K_f \frac{1000\,X_S}{(1 - X_S)\,M_S} = K_f\, m_S \qquad [9]$$

bearing in mind that for water as solvent $T_0 = 0$.

If we regard a fruit consisting just of water and soluble solids as a sort of *quasi* solution we are able to estimate its freezing point provided we know the composition of the solute and the molecular weights of individual components which are, for the most part, monosaccharides, disaccharides and organic acids. The proximate composition data can be found in appropriate food composition tables; we used mostly those by Skurichin and Volgarev (1987) and by Souci et al. (1989).

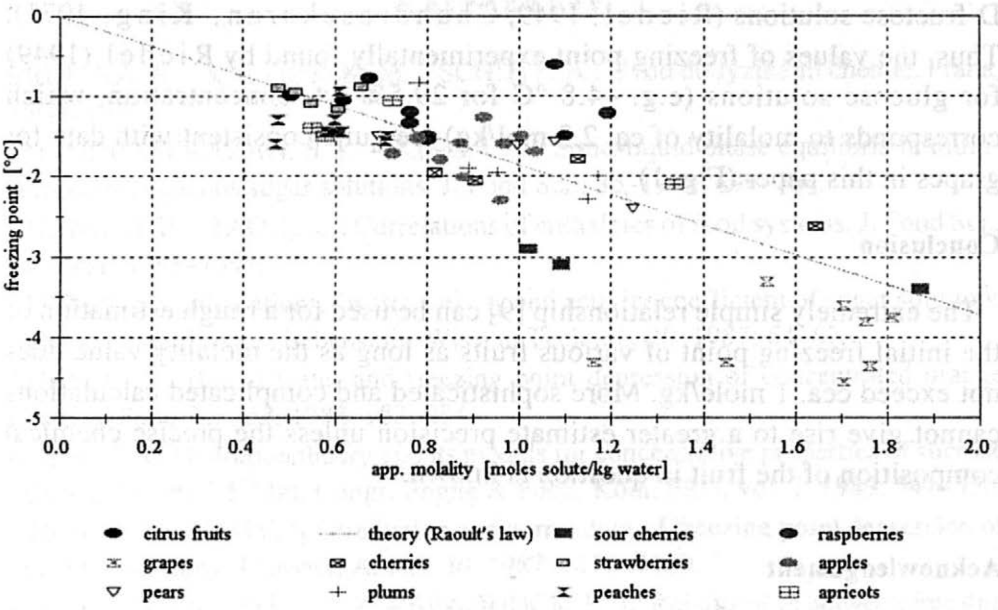
As for the initial freezing points, these data were excerpted mostly from prime literature (Rjutov, Veselova, 1939; Short, Bartlett, 1944; Staph, Woolrich, 1951; Fikiin, Fikiin, 1995) and partly completed from the most recent compilation by Singh (1995).

Thus, the procedure was as follows: the initial freezing points T_I as well as the corresponding soluble solids contents X_S were retrieved from the lite-rature and the effective molecular weights were calculated according to equation [8] by using the proximate composition data found in food composition tables.

RESULTS AND DISCUSSION

The figure (Fig. 1) represents the plot of literature values of the initial freezing point against appropriate values of the apparent molality calculated just as explained in the preceding paragraph by using the tabulated composition data. In this first approach only monosaccharides (glucose, fructose and sorbose), disaccharide (sucrose) and organic acids (citric, malic, tartaric and oxalic) were taken into account as soluble solids. The slope of the straight line equals the value of the cryoscopic constant K_f of water, namely 1.86.

It is obvious that the experimental points lie for the most part in satisfactory proximity of the theoretical straight line, which is quite remarkable when we realize that a whole fruit is faraway from the concept of a dilute aqueous solution just for which the simple relationship [9] is fully valid. As for the scatter of individual points around the straight line, we must consider that just one proximate composition was used for each sort of fruit although, in fact, the actual composition may considerably differ in individual cases in dependence on fruit variety (Schobinger, 1978), maturity stage (Gurney, 1937; Sawyer, 1963) or even on the location in one and the



1. Initial freezing point of fruits as a function of apparent molality

same fruit; it was found that e.g. in apples, pears or oranges, the sugar content increases in the direction from peduncle to calyx and in the equatorial plane from centre to surface (Ulrich, 1956).

In the light of these facts it can be stated that the agreement between theory and reality is fairly good, especially at lower apparent molalities below 1.0 mol/kg, i.e. up to 15–20% wt. of soluble solids for the major part of fruit sorts. At higher concentrations above this value of about 1.0 mol/kg, the deviations from the straight line are somewhere greater, such as in the cases of sour cherries or grapes. As for sour cherries, it is perhaps the quite high content of organic acids which, in addition, might have dissociated to some extent, which is responsible for the somewhat higher value of the freezing point depression. Regarding the data for grapes, it is clear that the molal concentration is too high insomuch that the simple relationship [9] is no more fully valid. A similar downward departure from the Raoult's law is quite frequent for sugar solutions (Chirife et al., 1980). Grapes as such consist for the most part of monosaccharides which represent about 90% wt. of their dry matter content. In this regard it is no wonder that the data for grapes lie rather on the equilibrium freezing curves of D-glucose and

D-fructose solutions (Riedel, 1949; Chandrasekaran, King, 1971). Thus, the values of freezing point experimentally found by Riedel (1949) for glucose solutions (e.g. –4.8 °C for 29.5% wt. concentration, which corresponds to molality of ca. 2.3 mol/kg) are quite consistent with data for grapes in this paper (Fig. 1).

Conclusion

The extremely simple relationship [9] can be used for a rough estimation of the initial freezing point of various fruits as long as the molality value does not exceed cca. 1 mole/kg. More sophisticated and complicated calculations cannot give rise to a greater estimate precision unless the precise chemical composition of the fruit in question is known.

Acknowledgement

Dr. Chris Miles and Dr. Mike Morley (University of Bristol, England), Prof. Angel Fikiin and Dr. Kostadin Fikiin (Technical University, Sofia, Bulgaria) and Dr. Paul Nesvadba (The Robert Gordon University, Aberdeen, Scotland) are thanked for the encouragement and valuable discussions.

Symbols

W	water activity	[–]
b	mass of bound water per unit mass of solids	[kg/kg]
C	coefficient of solute-solvent interaction	[–]
E	ratio M_W / M_S	[–]
ΔH	average molar heat of fusion between T_0 and T_1	[J/mole]
K_f	cryoscopic constant of water	[°K.kg/mole]
m_S	molality	[mole/kg]
M_{eff}	effective molecular weight of all constituent solutes	[kg/mole]
M_S	molecular weight of solute	[kg/mole]
M_W	molecular weight of water	[kg/mole]
R	constant of the ideal gas law	[J/mole/°K]
T_0	freezing point of pure solvent (water)	[°C]
T_1	freezing point of solution (fruit)	[°C]
X_S	mass fraction of solutes	[kg/kg]

R e f e r e n c e s

BRDIČKA, R. – KALOUSEK, M. – SCHÜTZ, A.: Úvod do fyzikální chemie. Praha, SNTL 1972.

CHANDRASEKARAN, S. K. – KING, C. J.: Solid-liquid phase equilibria in multicomponent aqueous sugar solutions. J. Food Sci., *36*, 1971: 699–704.

CHANG, H. P. – TAO, L. C.: Correlations of enthalpies of food systems. J. Food Sci., *46*, 1981: 1493–1497.

CHEN, C. S.: Calculation of water activity and activity coefficient of sugar solutions and some liquid foods. Lebensmit.-Wiss. u. Technol., *20*, 1987: 64–67.

CHEN, C. S.: Bound water and freezing point depression of concentrated orange juices. J. Food Sci., *53*, 1988: 983–984.

CHEN, C. S.: Hydration theory and its models for concentrative properties of sucrose solution. In: Proc. 5th Int. Congr. Engng & Food, Köln, FRG, vol. 1. 1989: 541–550.

CHEN, C. S. – NAGY, S.: Prediction and correlation of freezing point depression of aqueous solutions. Transact. ASAE, *30*, 1987: 1176–1180.

CHEN, C. S. – NGUYEN, T. K. – BRADDOCK, R. J.: Relationship between freezing point depression and solute composition of fruit juice systems. J. Food Sci., *55*, 1990: 566–567, 569.

CHIRIFE, J. – FERRO FONTAN, C. – BENMERGUI, E. A.: The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. IV. a_w prediction in aqueous non electrolyte solutions. J. Food Technol., *15*, 1980: 59–70.

ČUBIK, I. A. – MASLOV, A. M.: Spravočnik po teplofizičeskim konstantam piščevych produktov i polufabrikatov. Moskva, Piščeprom 1965.

FIKIIN, A. G. – FIKIIN, K. A.: Modelling of thermal properties and behaviour of foods during production, storage and distribution. Scientific report No. 6. Initial freezing temperature of various foods with special reference to fruit juices and concentrates and to grapes. Sofia, Bulgaria, EU Proj. ERB CIPA CT 93 0240, 1995.

FIKIIN, A. G. – FIKIINA, I. K. – KUZMANOVA, E. P.: Funkcionalna zavisimost meždu krioskopičnata temperatura i koncentracijata na plodovi sokove i koncentrati. Nauč. trudove, VICHVP Plovdiv, *17*, (2), 1970: 29–32.

GANE, R.: Concentration by freezing of fruit juices, vinegars and ciders. Food Manufact., *23*, 1948: 282–287.

GUEGOV, J.: General correlation between the cryoscopic temperature and the soluble solids content of fruits and vegetables. J. Food Technol., *15*, 1980: 607–612.

GURNEY, E. H.: Composition of some fruits and fruit waste. Queensland Agr. J., *47*, 1937: 403–405.

HELDMAN, D. R.: Food process engineering. Westport, Conn., USA, AVI Publ. Comp., Inc. 1975.

HELDMAN, D. R. – LUND, D. B.: Handbook of Food Engineering. New York, Marcel Dekker, Inc. 1992.

HOUŠKA, M. – MAYER, Z.: Initial freezing point of foods. [Tech. report Nr. 7/360/96.] Prague, Food Res. Inst. 1996.

LEWIS, M. J.: Physical properties of foods and food processing systems. Chichester, England, Ellis Horwood Ltd. 1987.

MATSUOKA, T.: Prediction of freezing point depression of fruit and vegetable juices. Bull. Res. Inst. Sys. Hortic., Fac. Agricult., Kochi Univ., *9*, 1992: 33–43.

MILES, C. A. – BEEK, G., van – VEERKAMP, C. H.: Calculation of thermophysical properties of foods. In: JOWITT, R. et al. (Ed.): Physical Properties of Foods. London and New York, Appl. Sci. Publ. 1983: 269–312.

MILES, C. A. – MAYER, Z. – MORLEY, M. J. – HOUŠKA, M.: Estimating the initial freezing point of foods (submitted for publication in Intern. J. Food Sci. Technol.).

NESVADBA, P.: Results of the EU PECO project Modelling of Thermal Properties and Behaviour of Foods during Production, Storage and Distribution. In: Conf. Workshop Modelling of Thermal Properties and Behaviour of Foods during Production, Storage and Distribution. Prague 1997.

REKTORYS, K.: Přehled užité matematiky. Praha, SNTL 1973.

RIEDEL, L.: Brechungsvermögen und Gefriertemperaturen von Fruchtsäften in Abhängigkeit von der Konzentration. Z. Lebensmit.-Unters.-Forsch., *89*, 1949: 289–299.

RJUTOV, D. G. – VESELOVA, A. M.: Temperatura zamerzanija i udelnaja teplota plodov i ovoščej. Cholodil. prom., *17*, 1939: 33–38.

SAWYER, R.: Chemical composition of some natural and processed orange juices. J. Sci. Food Agric., *14*, 1963: 302–310.

SCHOBINGER, U.: Frucht- und Gemüsesäfte. Stuttgart, Verlag E. Ulmer 1978.

SCHWARTZBERG, H. G.: Effective heat capacities for the freezing and thawing of food. J. Food Sci., *41*, 1976: 152–156. L 3871 .

SHAFIUR RAHMAN, M. D.: Food properties handbook. Boca Raton, CRC Press 1995.

SHORT, B. E. – BARTLETT, L. H.: Specific heat of foodstuffs. Austin, Univ. Texas Publ., No. 4432, 1944.

SINGH, R. P.: Food properties database. Version 2.0 for Windows. Boca Raton, CRC Press 1995.

SKURICHIN, I. M. – VOLGAREV, M. N.: Chimičeskij sostav piščevych produktov. Kniga 2. Moskva, VO Agropromizdat 1987.

SMITH, A. L.: Freezing and melting points of fruits and vegetables. Refrig. Engng., *21*, 1931: 272–273.

SOUCI, S. W. – FACHMANN, W. – KRAUT, H.: Die Zusammensetzung der Lebensmittel u. Nährwert-Tabellen 1989/90. Stuttgart, Wissenschaft. Verlags GmbH 1989.

STAPH, H. E. – WOOLRICH, W. R.: Specific and latent heats of foods in the freezing zone. Refrig. Engng., *29*, 1951: 1086–1089, 1114.

ULRICH, R.: Gradients physiques, chimiques et physiologiques des fruits. Fruits, *11*, 1956: 239–244.

WOOLRICH, W. R. – BARTELETT, D.: Handbook of refrigerating engineering. New York, USA, Van Nostrand Comp. 1965.

An international joint research project of the European Commission in the field of food and refrigeration science and technology. Bull. de l'Inst. Int. du Froid (Bull. IIR), *76*, (3), 1996: 31.

Hledá se spolupráce s průmyslem. Potrav. Vědy, *13*, 1995: 79.

Received Juny 17, 1997

Počáteční bod tuhnutí a složení ovoce

Počáteční bod tuhnutí je jednou ze základních termofyzikálních charakteristik potravin. Jeho znalost je důležitá jak pro potravinářské inženýrství, např. při řešení zmrazování a rozmrazování potravin nebo jejich uchovávání, tak i z hlediska mikrobiologické kvality. Počáteční bod tuhnutí je současně i klíčovou vstupní veličinou pro výpočet tepelných vlastností, např. pomocí programu COSTHERM.

Je zřejmé, že počáteční bod tuhnutí závisí na obsahu vody v potravině, ale nejen na něm. V úvahu je třeba vzít i složení sušiny, zejména jejích rozpustných složek. V této práci jsme se zabývali korelací mezi počátečním bodem tuhnutí T_1 různých druhů ovoce a jeho složením. Proto jsme shromáždili údaje o T_1 zejména z původní primární literatury a k tomu vyhledali v renomovaných tabulkách složení odpovídající údaje o obsahu jednotlivých komponent. K tomuto postupu nás vedla skutečnost, že autoři původních prací zabývajících se měřením T_1, nikdy přesné složení, kromě obsahu vody nebo sušiny, neuvádějí.

Pro korelaci v tomto prvním přiblížení byl použit maximálně zjednodušený vztah [9], původně odvozený pro zředěné roztoky neelektrolytů, podle kterého je snížení bodu tuhnutí, resp. vlastní bod tuhnutí v případě vody jako rozpouštědla, přímo úměrný molalitě rozpuštěné látky. Postup byl takový, že do rovnice [9] byl dosazován počáteční bod tuhnutí T_1 a k tomu příslušný obsah rozpustné sušiny X_S z původní literatury, zatímco za molekulovou hmotnost rozpuštěné látky M_S byla dosazována efektivní molekulová hmotnost M_{eff} vypočítaná podle rovnice [8] na základě tabelo-

vaného složení rozpustné sušiny pro daný druh ovoce. V úvahu byly brány pouze monosacharidy (glukóza, fruktóza a sorbit), sacharóza (disacharid) a kyseliny citronová, jablečná, vinná a šťavelová. Do grafu byly vynášeny počáteční body tuhnutí T_1 proti efektivní molalitě, což je hodnota zlomku na pravé straně rovnice [9]. V případě platnosti uvedeného vztahu by tyto body měly ležet na teoretické přímce procházející počátkem se směrnicí rovnou $K_f = 1,86$ (kryoskopická konstanta vody).

Většina experimentálních bodů opravdu leží v blízkosti této přímky, což je dosti pozoruhodné uvědomíme-li si veliký rozdíl mezi zředěnými vodnými roztoky, pro které byl vztah [9] odvozen, a kusovitým ovocem. Pokud jde o rozptyl jednotlivých bodů kolem přímky, je třeba uvážit, že pro každý druh ovoce bylo použito právě jen jedno tabelované složení, zatímco ve skutečnosti se aktuální složení může případ od případu značně lišit v závislosti na odrůdě ovoce, stupni zralosti a dokonce i na různých místech v jednom a tomtéž plodu.

Celkově je možné konstatovat, že shoda mezi teorií a skutečností je docela dobrá, zvláště pak při nižších hodnotách efektivní molality cca do 1 mol/kg, což u většiny druhů ovoce odpovídá asi 15–20 % hm. rozpustné sušiny. Při vyšších koncentracích jsou již odchylky větší a lze také zaznamenat odklon od teoretické přímky směrem k nižším bodům tuhnutí, což platí zejména pro vinné hrozny. Podobné odchylky od Raoultova zákona jsou ovšem pro vodné roztoky cukrů o obdobné koncentraci zcela běžné. Vinné hrozny obsahují z největší části monosacharidy, které tvoří okolo 90 % jejich sušiny. Je proto zcela přirozené, že experimentální body pro hrozny leží prakticky na rovnovážné křivce tuhnutí vodných roztoků glukózy a fruktózy. Experimentální údaje o bodu tuhnutí roztoků glukózy, publikované Riedlem (na příklad –4,8 °C při koncentraci 29,5 % hm., což odpovídá molalitě cca 2,3 mol/kg), jsou konzistentní s hodnotami pro vinné hrozny v této práci (obr. 1).

Závěrem lze konstatovat, že jednoduchý vztah [9] a popsaný postup je možné použít pro přibližný výpočet počátečního bodu tuhnutí různých druhů ovoce, pokud hodnota molality výrazně nepřevýší cca 1 mol/kg. Zvýšení přesnosti výpočtu nelze dosáhnout složitějšími vzorci, pokud není známo přesné složení pro daný konkrétní případ.

ovoce; počáteční bod tuhnutí; složení; rozpustná sušina; korelace

---

Contact address:

Ing. Zbyněk Mayer, CSc., Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 7, 102 31 Praha 10, Česká republika
Phone:+ 420 2 702 331, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp.anet.cz

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 343–350

DISTRIBUTION OF TOCOPHEROLS AND TOCOTRIENOLS IN THE MAIN PRODUCTS OF WHEAT AND RYE MILLING

Marie HOLASOVÁ

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract: Tocopherols and tocotrienols were analyzed using HPLC and vitamin E content calculated in wheat and rye and in the main end products of milling of wheat and rye, i.e. wheat germ, wheat and rye flours with different ash contents, wheat grit and bran. The samples were taken in an industrial mill. In wheat germ fraction α- and β-tocopherols were cumulated, contributing by 94.6% to the total tocol content. Tocol content was four times higher in germ than in wheat. Both the concentration of tocols and the tocopherol contributions in flours increased with increasing extraction of flours. Wheat germ, bran and high extraction flour were better sources of vitamin E than grain and low extraction flours. The concentration of tocols was three times higher in rye bran than in rye grain, with α-tocotrienol contribution increased. Vitamin E activity of rye flours were lower than that of grain.

tocopherols; tocotrienols; vitamin E; wheat; rye; milling products

Tocopherols (T) and tocotrienols (T3) are naturally occurring vitamin E active tocols. They are important antioxidants and radical scavengers participating in prevention of chronic and cardiovascular diseases, cancer and strokes (Packer, Fuchs, 1993). The biological activities and antioxidant influence of the individual isomers differ (Serbinova et al., 1991; Linji et al., 1993; Qureshi et al., 1991).

Cereal grains are good sources of vitamin E. Vitamin E contents in wheat, rye and oats range from 14.7 to 17.1 mg/kg. For barley average content 23.7 mg/kg was found (Holasová et al., 1995). Tocopherol and tocotrienol contents of different fractions of kernel differ from each other. Analysis of hand dissected oats fractions indicated that the germ was the location for most of α- and γ-tocopherols. Tocotrienols were concentrated in the endosperm (Peterson, 1995). In wheat kernel fractions α- and β-tocopherols were almost exclusively in the germ, α-tocotrienol was mostly in bran and β-tocotrienol was equally distributed between the bran and the

endosperm (Morrison et al., 1982). In similar experiments with barley kernel Peterson found a high concentration of α-tocopherol and significant quantities of β-tocotrienol in the germ, whereas barley hulls and endosperm had substantial concentrations of tocotrienols (Peterson, 1994).

In the process of milling bran and germ are removed yielding starchy endosperm. The sequence of milling, sifting and aspiration processes is used resulting in a number of millstreams of varying composition. Final flours of defined ash content are obtained using blending of millstreams. The objective of this study was to examine distribution and enrichment of tocopherols and tocotrienols in the main products of wheat and rye milling obtained in an industrial mill.

MATERIAL AND METHODS

Samples of wheat and wheat milling products and rye and rye milling products were collected during the milling process in the industrial mill Odkolek, Prague. The collection was repeated, samples were combined and two combined samples were analyzed. The samples represent the most common end products of milling technology used in the Czech Republic, i.e. wheat germ, wheat flours T 4000, T 1000, T 530, T 450, wheat grit T 450 and wheat bran. In milling of rye flours T 1700 and T 930 and rye bran were obtained. The numbers designating flours show the approximate contents of ash in % multiplied by 10^3. Standards of α-, β-, γ- and δ-tocopherols and tocotrienols were purchased from Merck.

The grain, germ and bran samples were homogenized by milling, flour samples were analyzed directly. Room temperature saponification and diethyl ether extraction were applied for tocol isolation (Piironen et al., 1984). Evaporated samples were dissolved in n-hexane and analyzed by HPLC. The liquid chomatograph HP 1090 and fluorescence detector HP 1046 A together with 7μm Separon SGX column (250 x 3.3 mm) were used. Mobile phase consisted of n-hexane and 2-propanol (99 : 1, v/v). Fluorescence detector was set at 290 nm excitation and 330 nm emission wavelength. The tocopherol and tocotrienol contents were calculated from peak areas using standard curves of appropriate tocols (Holasová et al., 1995).

The vitamin E content expressed in mg of α-tocopherol equivalents (α-TE) was calculated according to Mc Laughlin and Weihrauch (1979).

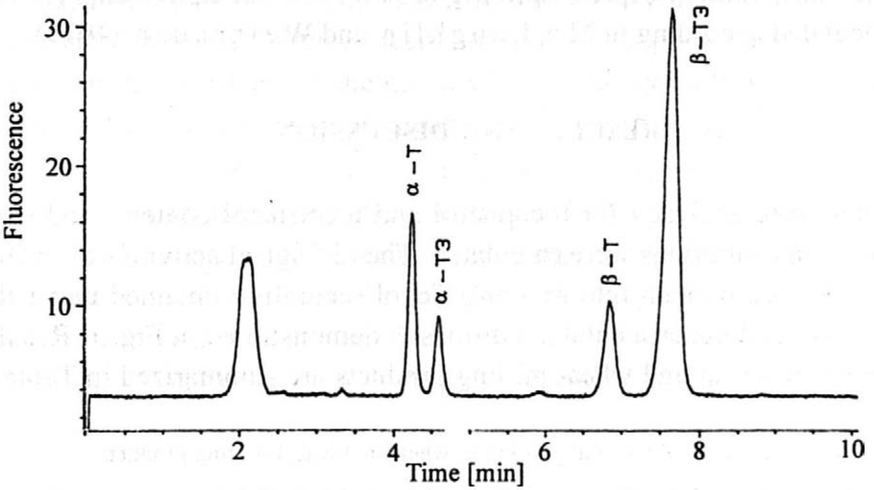
RESULTS AND DISCUSSION

Samples were analyzed for tocopherol and tocotrienol contents and their vitamin E concentrations were calculated. The biological activities of individual isomers were taken into account. Tocol separation obtained under the above mentioned experimental conditions is demonstrated in Fig. 1. Results of analysis of wheat and wheat milling products are summarized in Table I.

I. Tocopherol and tocotrienol contents[mg/kg] in wheat and wheat milling products

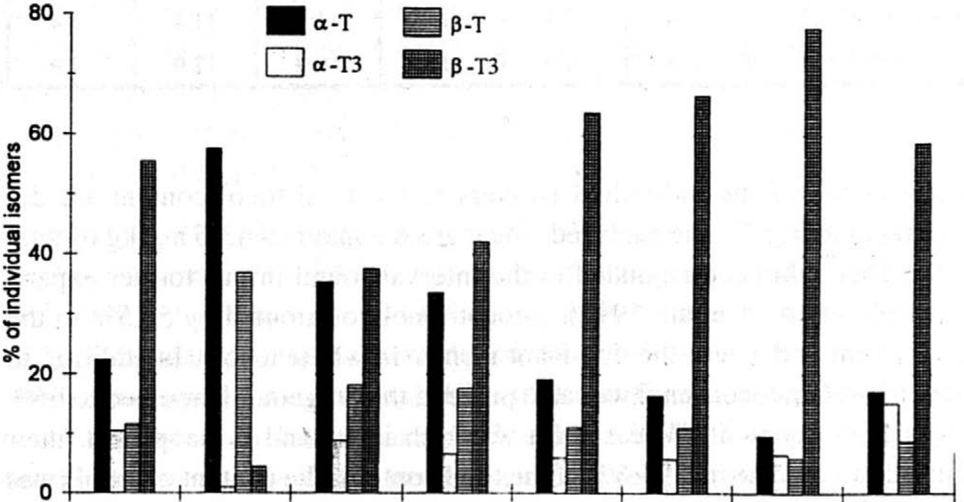
Sample	Tocols	α-T	α-T3	β-T	β-T3	Vitamin E
Wheat grain	43.6	9.8	4.5	5.1	24.2	14.4
Wheat germ	181.4	104.0	1.6	67.0	8.2	132.2
Wheat bran	75.5	12.9	11.4	6.6	44.2	21.2
Wheat flour T 4000	104.4	37.0	9.3	18.9	39.2	49.3
Wheat flour T 1000	38.1	12.8	2.5	6.7	16.1	16.8
Wheat flour T 530	19.9	3.8	1.2	2.2	12.7	5.7
Wheat flour T 450	17.4	2.8	1.0	1.9	11.4	4.4
Wheat grit T 450	15.4	1.5	1.0	0.9	12.0	2.8

Contributions of the individual isomers to the total tocol content are demonstrated in Fig. 2. The analysed wheat grain contained 43.6 mg/kg of total tocols. This value corresponded to the interval found in our former experiments (Holasová et al., 1995). β-tocotrienol contributed by 55.5% to the total content and it was the dominant isomer in wheat tocols. In addition to β-tocotrienol, α-tocotrienol was also present, they together amounted to 66% of total tocol content. Wheat germ was rich in α- and β-tocopherol, their contribution represented 94.6% of the total content.The content of tocols was four times higher in germ than in wheat. The concentration of tocols in wheat bran was approximately double when compared with grain. The distribution of individual isomers in bran was, however, comparable with that of



1. Separation of tocols in wheat grain by HPLC with fluorescence detection

grain.The contents of tocols in various flour sorts and tocopherol proportions in the total tocol contents increased with the increasing extraction of the flours. Whereas in the flour T 450 tocopherol content amounted only to 15.6%, in high extraction flour T 4000 it reached 53.5%. Vitamin E content that takes into account the biological activities of the individual isomers was



2. Contribution of tocopherols and tocotrienols to the tocol content in wheat and wheat milling products

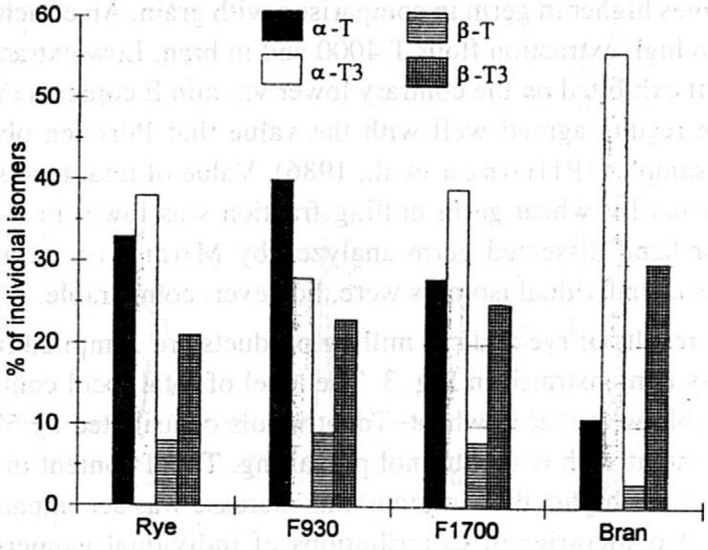
nearly ten times higher in germ in comparison with grain. An enrichment was found also in high extraction flour T 4000 and in bran. Low extraction flour types and grit exhibited on the contrary lower vitamin E contents than that in grain. These results agreed well with the value that Piironen observed in wheat flour samples (Piironen et al., 1986). Value of total tocols found in our experiments for wheat germ milling fraction was lower in comparison with that for hand dissected germ analyzed by Morrison et al. (1982), contributions of individual isomers were, however, comparable.

Analytical results of rye and rye milling products are compiled in Table II and grafically demonstrated in Fig. 3. The level of total tocol content in rye was comparable with that in wheat. Tocotrienols contributed by 59% to the total tocol content with α-tocotrienol prevailing. Tocol content in bran was almost three times higher than in grain, this increase was accompanied by an enrichment of α-tocotrienol. Contributions of individual isomers in flour were similar to that in the grain. In flour T 930 a slightly higher proportion of α-tocopherol was found. Vitamin E activity of rye bran is somewhat higher than of rye grain, in flours a decrease in vitamin E contents equalling to 58–71% was found.

II. Tocopherol and tocotrienol contents [mg/kg] in rye and rye milling products

Sample	Tocols	α-T	α-T3	β-T	β-T3	Vitamin E
Rye grain	39.2	12.9	14.9	3.2	8.2	19.1
Rye bran	118.4	12.8	66.8	3.3	35.5	35.9
Rye flour T 1700	36.3	10.3	14.1	2.8	9.1	16.1
Rye flour T 930	24.7	9.9	6.9	2.2	5.7	13.1

The results indicate that tocopherols are cumulated in the germ fraction during the course of processing of wheat. The resulting flours are rich in tocotrienols. Contributions of tocopherols to the total tocol contents in flours increase with the increasing extraction of flours. Both total tocol contents and vitamin E contents in wheat germ and in bran are substantially higher than in wheat grain. They are significantly lower in flours with the exception of high extraction sort. Similarly in rye milling, bran with enhanced tocols



3. Contribution of tocopherols and tocotrienols to the tocol content in rye and rye milling products

and vitamin E contents are obtained. Rye flours are also enriched with tocotrienols. Vitamin E concentrations are lower in flours than in rye grain.

The results confirm differentiation of tocopherol and tocotrienol concentrations within grain kernel and are in good agreement with published data (Morrison et al., 1982; Piironen et al., 1986). The experiments provide data on tocopherol, tocotrienol and vitamin E concentrations in most common Czech end products of wheat and rye milling.

References

HOLASOVÁ, M. – VELÍŠEK, J. – DAVÍDEK, J.: Tocopherol and tocotrienol contents in cereal grains. Potrav. Vědy, *13*, 1995: 409–417.

LINJI, W. – NEWMAN, R. K. – NEWMAN, C. W. – JACKSON, L. L. – HOFER, P. J.: Tocotrienol and fatty acid composition of barley oil and their effects on lipid metabolism. Plant Foods Human Nutr., *43*, 1993: 9–17.

Mc LAUGHLIN, P. J. – WEIHRAUCH, J. L.: Vitamin E content of foods. J. Am. Dietet. Assoc., *75*, 1979: 647–651.

MORRISON, R. – COVENTRY, A. M. – BARNES, P. J.: The distribution of acyl lipids and tocopherols in flour millstreams. J. Sci. Food Agric., *33*, 1982: 925–933.

PACKER, L. – FUCHS, J.: Vitamin E in health and disease. New York, Marcel Dekker 1993.

PETERSON, D. M.: Barley tocols: effect of milling, malting and mashing. Cereal Chem., *71*, 1994: 42–44.

PETERSON, D. M.: Oat tocols: concentration and stability in oat products and distribution within the kernel. Cereal Chem., *72*, 1995: 21–24.

PIIRONEN, V. – VARO, P. – SYVAOJA, E. L. – SALMINEN, K. – KOIVISTOINEN, P.: High performance liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols and its application to diets and plasma of Finnish man. Int. J. Vit. Res., *53*, 1984: 35–40.

PIIRONEN, V. – SYVAOJA, E. L. – VARO, P. – SALMINEN, K. – KOIVISTOINEN, P.: Tocopherols and tocotrienols in cereal products from Finland. Cereal. Chem., *63*, 1986: 78–81.

QURESHI, A. A. – CHAUDHARY, V. – WEBER, F. E. – CHICOYE, E. – QURESHI, N.: Effects of brewer s grain and other cereals on lipid metabolism in chickens. Nutr. Res., *11*, 1991: 159–168.

SERBINOVA, E. – KAGAN, V. – HAN, B. – PACKER, L.: Free radical recycling and intermembrane mobility in the antioxidant properties of α-tocopherol and α-tocotrienol. Free Radical Biol. Med., *10*, 1991: 263–275.

Received June 25, 1997

Distribuce tokoferolů a tokotrienolů v hlavních produktech mletí pšenice a žita

Tokoferoly a tokotrienoly patří mezi přirozené tokoly, které vykazují aktivitu vitaminu E. Biologická aktivita a antioxidační efekt jednotlivých izomerů se liší. Obiloviny jsou dobrým zdrojem vitaminu E, zastoupení jednotlivých izomerů v obilném zrnu je však nerovnoměrné.

V procesu mletí se získává mícháním jednotlivých pasáží řada mouk o různém obsahu popele a dále separované klíčky a otruby. Předmětem práce bylo určit distribuci tokoferolů a tokotrienolů v hlavních produktech mletí pšenice a žita získaných při mletí v průmyslovém mlýně.

V rámci experimentální práce byl stanoven obsah tokoferolů a tokotrienolů a vypočítán obsah vitaminu E v pšenici a v nejběžnějších produktech mletí pšenice – pšeničných klíčcích, pšeničných otrubách, pšeničné krupici T 450 a v pšeničných moukách T 4000, T 1000, T 530 a T 450. Dále byly analyzovány vzorky žita, žitných

otrub a žitných mouk T 1700 a T 930. Výsledky jsou sumarizovány v tab. I a II a procentuální zastoupení individuálních izomerů je znázorněno na obr. 1 a 2.

Z výsledků je patrné, že ve frakci pšeničných klíčků jsou kumulovány α- a β-tokoferoly, jejich obsah představuje 94,6 % celkových tokolů. Obsah tokolů je v klíčcích přibližně čtyřikrát vyšší než v pšenici. Celkový obsah tokolů i podíl tokoferolů sledovaný u pšeničných mouk vzrůstá se zvyšujícím se stupněm vymletí mouk. Pšeničné klíčky, pšeničné otruby i vysoce vymletá mouka T 4000 jsou lepším zdrojem vitaminu E než zrno a nízko vymleté mouky. Žitné otruby mají obsah tokolů třikrát vyšší než žito a jsou ve srovnání se zrnem obohaceny o α-tokotrienol. Žitné mouky obsahují méně vitaminu E než žito a žitné otruby.

tokoferoly; tokotrienoly; vitamin E; pšenice; žito; mlýnské produkty

---

Contact address:

Ing. Marie Holasová, Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 7, 102 31 Praha 10, Česká republika
Phone: + 420 2 702 331, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp.anet.cz

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 351–362

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF THE PROTEOLYTIC ENZYMES OF CARP HEPATOPANCREAS*

Milena KMÍNKOVÁ, Zdeněk MOUČKA, Jiří KUČERA

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract: Proteolytic enzymes (trypsin, chymotrypsin, aminopeptidase and carboxypeptidase A and B) were separated from carp hepatopancreas, purified and partially characterized. Aminopeptidase was separated from other enzymes by gel chromatography on Sephadex G-100 (this enzym is an object of our next study). Chymotrypsin and trypsin were separated to two active components (chymotrypsin I and II and trypsin I and II) by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. Trypsin I and chymotrypsin I were not adsorbed on this sorbent in contrast with trypsin II and chymotrypsin II, which were eluted from the column with NaCl gradient. Isoelectric points, optimum temperature and pH were determined for chymotrypsin I and II, trypsin I and II and carboxypeptidase A and B. The carp enzymes had similar properties to those of other water animals.

carp; proteolytic enzymes; purification of proteases; characterisation of proteases; trypsin; chymotrypsin; carboxypeptidase A; carboxypeptidase B

Plenty of enzymes are produced commercialy for their application in food industry, food and fodder analysis, fodder processing and for their further application in biochemistry and biotechnology (A n o n, 1984). The bovine or pork viscera is frequently used as source of enzymes. Very little attention was paid to the viscera of other domestic animals. The least used viscera are that of fish and some other water animals. It is pitty because fish, oyster or molluscs enzymes have very interesting properties. Usually such enzymes have higher specific activity, their activity start at lower temperature etc. (e.g. R a m a k r i ṣ h n a, 1987; R a a e, W a l t h e r, 1989)

In the present paper separation, purification and properties of hepatopancreatic proteases of carp hepatopancreas are reported with the aim to utilize wastes of fish processing.

---

* The work was supported by the Grant Agency of Czech Republic, Grant No. 509/95/06045.

MATERIAL AND METHODS

Material

Carp viscera were taken off from fish in the factory of Rybářství, Lahovice near Prague, ČR.

Sephadex G-100 was product of Pharmacia, Uppsala, Sweden, DEAE-cellulose 200 and CM-cellulose were products of Iontosorb, Ústí n. Labem, ČR.

All other reagents were products of Lachema, Brno, ČR, quality "Reagent grade".

Scaninng spectrophotometer Philips, model PU 8730 was used for the determination of all enzyme activities. Amicon ultrafiltration system, model 202 served for desalting and concentrating the samples. FPLC, Pharmacia, Uppsala, model LCC 500 was used for chromatographic experiments. Isoelectric focusing was carried-out on the Multiphor II equipment, Pharmacia, Uppsala.

Extraction procedure

Hepatopancreas was separated from other tissues, homogenized, and storred at –30 °C before use. After thawing (20 hrs at +6 °C) 1 000 g of hepatopancreas was stirred at 4 °C for 2 h with 1 500 ml of 10mM Tris-HCl buffer pH 7.9 containing 10mM $CaCl_2$. Homogenate was centrifuged (2 000 g, 60 min) and the sediment was reextracted with 550 ml of the same buffer for 1 h at 4 °C and centrifuged again. Both supernatants were mixed and used for further work.

The extract was clarified by the acidification. The pH of collected supernatants was adjusted to pH 5.0 using 2M sodium acetate and acidified supernatant was then stirred for 30 min in ice bath. The precipitate was separated by centrifugation and clear supernatant was readjusted to pH 7.9. Zymogenes were then activated for 14 h at 25 °C.

Clear solution after enzyme activation was precipitated with solid ammonium sulphate to 80% of saturation at 4 °C. Precipitate was separated by centrifugation and dissolved in small amout of starting buffer (10mM Tris-HCl pH 7.9 containing 10mM $CaCl_2$) and desalted by diafiltration (membrane PM 10).

Assay of enzymatic activity

N-benzoyl-L-tyrosine ethylester was used as substrate for chymotrypsin (Rick, 1974) and hippuryl-L-phenylalanine and hippuryl-L-arginine for carboxypeptidase A and carboxypeptidase B, respectively (Appel, 1974).

Trypsin activity was determined with the aid of Bio-La-Test set produced by Lachema Brno, ČR using N-α-tosyl-L-arginine-4-nitroanilide as substrate.

Isoelectric focusing

Isoelectric focusing was carried out on vertical polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis with 1M phosphoric acid as anodic and 1M NaOH as catodic buffers. Electrophoresis was carried out at current 8 mA and potential 15 V. The proteins were stained using Coomassie Blue G-250 after fixation with salicylic and trichloroacetic acids. The pH gradient in polyacrylamide gel was determined by sectioning of the gel (0.5cm pieces), extracting with distilled water and determined pH of the extract.

Gel chromatography

Clear extract was applied on the Sephadex G-100 column (2.6 x 30 cm, flow rate 18 ml/h) in 10mM Tris-HCl buffer pH 7.9. Leucine-aminopeptidase is the only enzyme in this group which have molecular weight higher than 100 kDa and it is eluted from Sephadex G-100 column in the void volume. Other fractions were collected and concentrated by ultrafiltration (membrane PM 10).

DEAE-cellulose chromatography

Concentrate from the previous operation was applied on the DEAE-cellulose column (2 x 10 cm), equilibrated with 10mM Tris-HCl pH 7.9 buffer, containing 10mM calcium chloride, flow rate was 60 ml/h. Bound enzymes were eluted stepwise with 0.14, 0.3 and 1M NaCl in the above buffer. Unbound and bound fractions were pooled, concentrated and dialysed by ultrafiltration against 10mM Tris-HCl buffer pH 6.0, containing 10mM calcium chloride.

The first fraction was concentrated and applied to a CM-cellulose column.

CM-celullose chromatography

The pH of fractions from DEAE-celullose column was adjusted to 6.0 and the sample was applied to the 2 x 8 cm CM-celullose column, equilibrated with 10mM Tris-HCl pH 6.0 buffer, containing 10mM calcium chloride. Adsorbed fractions were eluted with 1M NaCl in starting buffer after washing-out the unadsorbed proteins.

The pH optimum

It was determined by this way: the reaction was started by addition of the enzyme sample to the synthetic substrate dissolved in the buffer of various pH.

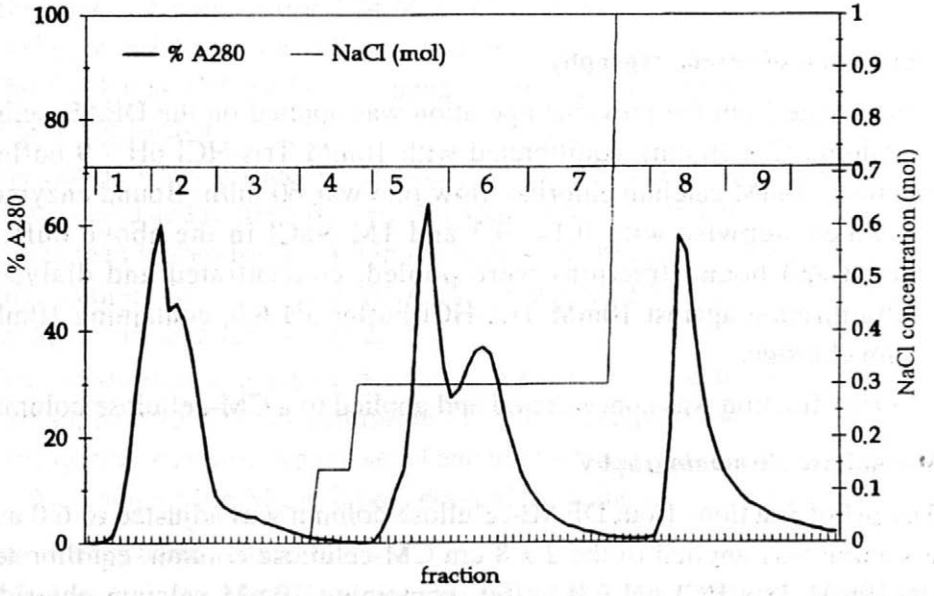
The temperature dependence of enzyme activity

It was detemined by two ways:

1. The reaction was started by the addition of enzyme sample to the substrate dissolved in buffer at different temperatures. The change of the reaction rate per min was measured for the time unit and for temperature 30 °C in 10 min.
2. The enzyme alone was heated for 10 min at selected temteratures and the activity was estimated as usually.

RESULTS

The leucineaminopeptidase was separated first from other enzymes on the column Sephadex G-100 and its separation and properties will be described elsewhere. After the separation on the DEAE-cellulose column (Fig. 1) we



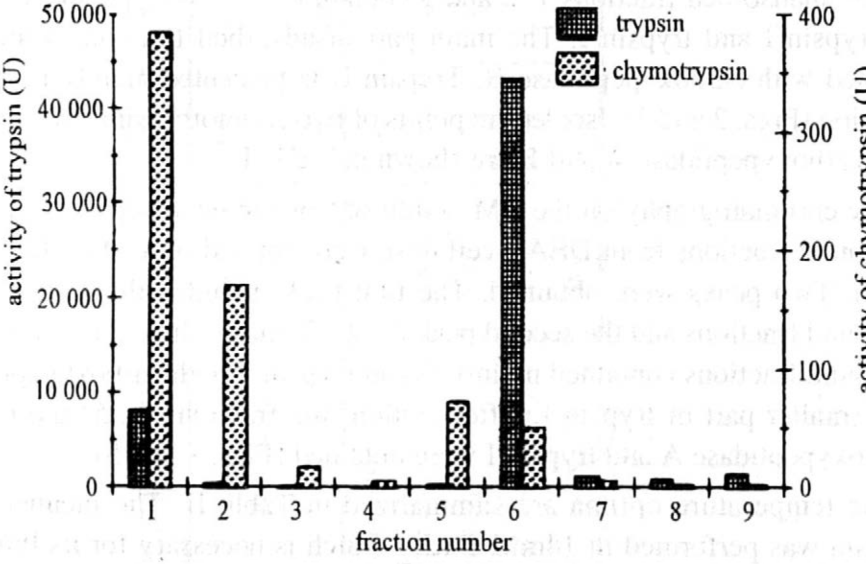
1. Chromatography of the extract of carp hepatopancreas free of Leu-aminopeptidase on DEAE-cellulose at pH 7.9 (numbers 1–9 show pooled fractions)

I. Enzyme activities in unbound and bound fractions obtained by DEAE-cellulose chromatography

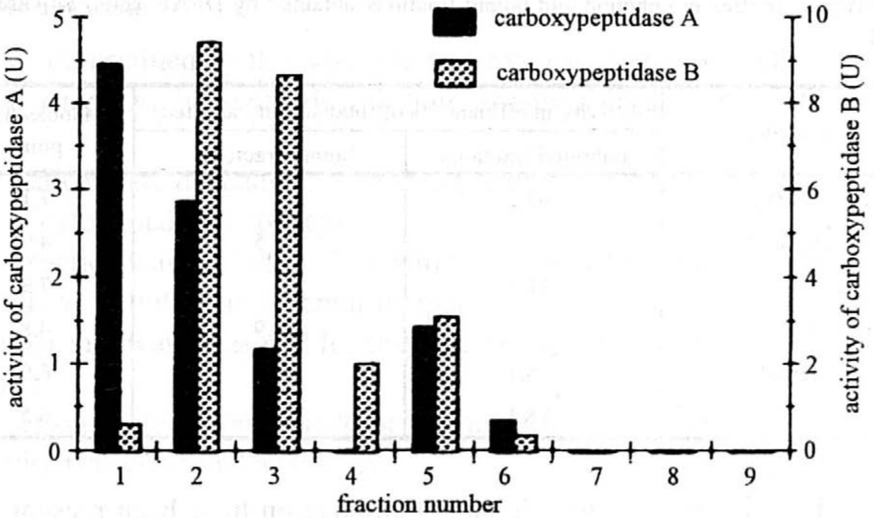
Enzyme	Activity in effluent (% of total activity applied)		Isoelectric point
	unbound fractions	bound fractions	
Chymotrypsin I	63.5	–	7.1
Chymotrypsin II	–	8.5	4.9
Trypsin I	11.8	–	7.9
Trypsin II	–	54.9	4.8
Carboxypeptidase A	79.1	6.1	6.9
Carboxypeptidase B	88.1	8.1	6.5

found that two types of trypsin and chymotrypsin have been present. This assumption was confirmed by the different isoelectric points of enzymes, which hydrolysed the same synthetic substrates (Table I).

Trypsin and chymotrypsin were designated I and II, respectively, according to the binding of these enzymes to DEAE-cellulose. Chymotrypsin is mainly unadsorbed on DEAE-cellulose while trypsin is mainly adsorbed. We suppose that two types of peptidades carboxypeptidase A and carboxy-



2. Trypsin and chymotrypsin activity in pooled fractions obtained from DEAE-cellulose column (pH 7.9)



3. Carboxypeptidase A and B activity in pooled fractions obtained from DEAE-cellulose column (pH 7.9)

peptidase B are presented. The occurrence of these enzymes in crude extract is relatively low. The loss of them during separation is high too. We have analyzed, therefore, the main fraction only.

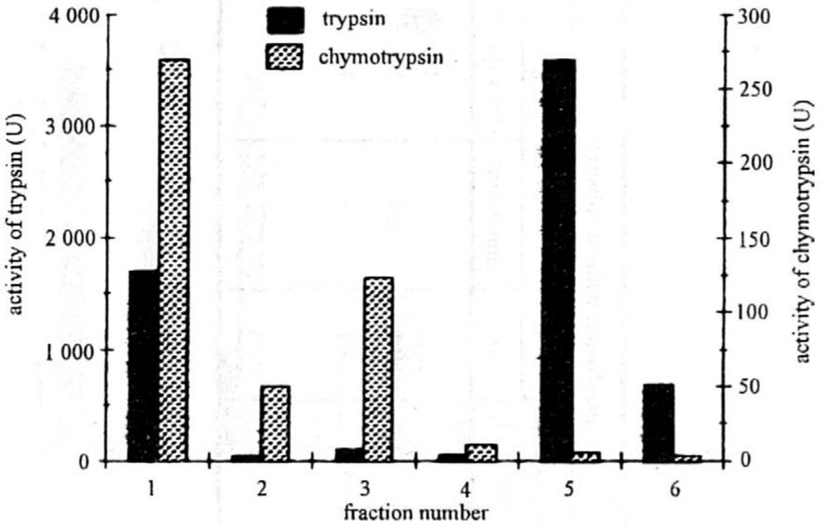
The unadsorbed fractions 1, 2 and 3 contain both carboxypeptidases, chymotrypsin I and trypsin I. The main part of adsorbed fractions 4 and 5 is formed with carboxypeptidase B. Trypsin II is presented mainly in the 6th fraction (Figs. 2 and 3). Isoelectric points of two chymotrypsins, two trypsins and carboxypeptidase A and B are shown in Table I.

The chromatography on the CM-cellulose was the next step of separation. Unbound fractions from DEAE-cellulose were applied on CM-cellulose column. Two peaks were obtained. The first peak included the 1., 2., and 3. unbound fractions and the second peak the 4., 5. and 6. eluated fractions. The unbound fractions contained mainly chymotrypsin I, both carboxypeptidases and smaller part of trypsin I. After elution (the fractions 4., 5. and 6.), the carboxypeptidase A and trypsin I were obtained (Figs. 4 and 5).

The temperature optima are summarized in Table II. The incubation of trypsin was performed in 14mM $CaCl_2$, which is necessary for its function. Other enzymes, including chymotrypsin, did not need the calcium ions for optimum activity. Trypsin I kept its activity after heating up to 60 °C for

II. The temperature optima of selected proteolytic enzymes of carp hepatopancreas

Enzyme	Incubation with substrate				Incubation without substrate			
	temperature optima [°C]	conditions			temperature optima [°C]	conditions		
		pH	time [min]	$CaCl_2$ [mM]		pH	time [min]	$CaCl_2$ [mM]
Chymotrypsin I	34–35	8.2	3	–				
Trypsin I	58–60	8.2	10	14	54–56	8.1	10	14
Trypsin II	55–56	8.2	10	14	55	8.1	10	14
Carboxypeptidase A	48–49	7.7	2	–				
Carboxypeptidase B	48–49	7.7	2	–				



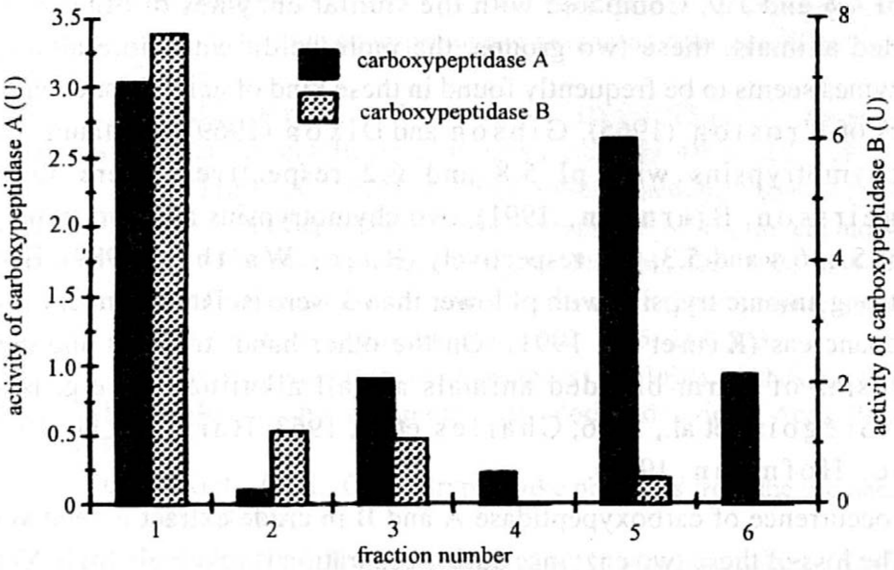
4. Trypsin and chymotrypsin activity in pooled fractions obtained from CM-cellulose column (pH 6.0)

10 min, trypsin II up to 56 °C. The activity maximum for chymotrypsin I was 34–35 °C only. Both carboxypeptidases had the same optimum 48–49 °C for the 2 min incubation. Temperature optimum of trypsin, incubated without substrate in the same conditions,was somewhat lower 54–55 °C for trypsin I and 55 °C for trypsin II, respectivelly.

III. The optimum pH of selected proteolytic enzymes of carp hepatopancreas

Enzyme	pH optimum	Conditions of the reaction			Substrate
		temperature [°C]	time [min]	$CaCl_2$ [$mM.l^{-1}$]	
Chymotrypsin I	8.0–8.3	25	3	0	BTEE
Trypsin I	8.0–8.2	30	10	14	TAN
Trypsin II	8.1–8.5	30	10	14	TAN
Carboxypeptidase A	7.6–7.9	25	2	0	H-L-Phe
Carboxypeptidase B	7.6–7.9	24	2	0	H-L-Arg

BTEE – N–benzyl-L-tyrosine ethylester
TAN – N-tosyl-L-arginine p–nitroanilide
H-L-Phe – hippuryl-L-phenylalanine
H-L-Arg – hippuryl-L-arginine



5. Carboxypeptidase A and B activity in pooled fractions obtained from DEAE-cellulose column (pH 6.0)

The pH optimum of chymotrypsin I and trypsin I was 8.0–8.3, 8.0–8.2, respectively. Higher pH optimum was obtained for trypsin II – 8.1–8.5. Both carboxypeptidases give the same value of pH optimum 7.6–7.9 (Table III).

Kinetic constants were calculated from substrate concentration and starting reaction rate using the least square method (Table IV).

IV. Kinetic constants of chymotrypsin I and trypsin II of carp hepatopancreas

Enzyme	K_m [mM]	V_{max} [mM.min^{-1}]	Conditions of the reaction		
			pH	temperature [°C]	substrate concentration [mM.l^{-1}]
Chymotrypsin I	0.96	0.35	8.2	25	0.03–2.14
Trypsin II	0.12	1.6	8.2	30	0.02–2.50

DISCUSSION

Carp chymotrypsin was separated to two isozymes, acidic (pI 4.9) and almost neutral (pI 7.1) one. Similarly trypsin was separated to two isozymes

with pI 4.8 and 7.9. Compared with the similar enzymes of other cold-blooded animals, these two groups, the more acidic and more alkaline isoenzymes seems to be frequently found in these kind of animal for example in work of Croston (1965), Gibson and Dixon (1969). In Atlantic cod two chymotrypsins with pI 5.8 and 6.2 respectively were found (Assgeirsson, Bjarnson, 1991), two chymotrypsins and two trypsins with pI 5.6, 6.4 and 5.3, 6.0, respectively (Raae, Walther, 1989). Even four strong anionic trypsins with pI lower than 3 were isolated from crayfish hepatopancreas (Kim et al., 1991). On the other hand, trypsins and chymotrypsins of warm-blooded animals are all alkaline (see e.g. Briteux-Grégoire et al., 1966; Charles et al., 1963; Harris et al., 1969; Koide, Hofmann, 1969).

The occurrence of carboxypeptidase A and B in crude extract is relatively low. The loss of these two enzymes during separation is relatively high. Very low levels of these enzymes were also found in the carp hepatopancreas (Cohen et al., 1981). Carboxypeptidase A activity was almost competely lost during the ion-exchange chromatography on DEAE-celulose.

Surprisingly both trypsins, but not chymotrypsin I (chymotrypsin II was not studied in this case), have relatively high temperature optimum, similar to some microbial serine proteases (Pétra, 1970; Folk, 1970). The pH optima, on the other hand, are similar to appropriate enzymes of warm-blooded animal.

References

ANON: Methods of enzymatic food analysis, instruction for the analysis of food-stuffs, chemicals, cosmetics and pharmaceuticals, paper, tobacco, water, animal feed, fertilizers, biological samples and other sample materials. Boehringer Mannheim, 1984: 80–84.

APPEL, W.: Carboxypeptidasen. In: BERGMAYER, H .U. – GAWEHN, K.: Methoden der enzymatischen Analyse. B. I. Weinheim, Verlag Chemie 1974: 1023–1037.

ASGEIRSSON, B. – BJARNSON, J. B.: Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol., *99B*, 1991: 327–335.

BRITEUX-GRÉGOIRE, S. – SCHYNS, R. – FLORKIN, M.: Structure des peptides libérés au cours de l'activation du trypsinogéne de mouton. Biochim. Biophys. Acta, *127*, 1966: 277–279.

CHARLES, M. – ROVERY, M. – GUIDONI, A. – DESNUELLE, P.: Sur le Trypsinogéne et la Trypsine de Porc. Biochim. Biophys. Acta, *69*, 1963: 115–129.

COHEN, T. – GERTLER, A. – BIRK Y.: Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*) – I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. Comp. Biochem. Physiol., *69B*, 1981: 639–646.

CROSTON, C. B.: Endopeptidases of *Salmon caeca.* Chromatographic separation and some properties. Arch. Biochem. Biophys., *112*, 1965: 218–223.

FOLK, J. E.: Carboxypeptidase B (porcine pancreas). In: PERLMANN, G. E. – LORAND, L. (Eds.): Methods in Enzymology. New York and London, Acad. Press, *19*, 1970: 504–508.

GIBSON, D. – DIXON, G. H.: Chymotrypsin-like proteases from the see anemone. Nature, *222*, 1969: 753–756.

HARRIS, C. I. – HOFMANN, T.: Proceedings of the biochemical society. Studies on equine trypsinogen and trypsin. Biochim. J., *114*, 1969: 82.

HUMMEL, B. C. W.: A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Can. J. Biochem. Physiol., *37*, 1959: 1393–1399.

KIM, H. R. – MEYERS, S. P. – GODBER, J. S.: Purification and characterisation of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish (*Procambarus clarkii*). Comp. Biochem. Physiol., *103B*, 1991: 391–398.

KOIDE, A. – KATAOKA, T. – MATSUOKA, Y.: Purification and properties of ovine cationic chymotrypsin. J. Biochem. (Tokyo), *65*, 1969: 475–477.

PÉTRA, P. H.: Bovine procarboxypeptidase and carboxypeptidase A. In: PERLMANN, G. E. – LORAND, L. (Eds.): Methods in Enzymology. New York and London, Acad. Press 19, 1970: 460–503.

RAAE, A. J. – WALTHER, B. T.: Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus morhua L.*). Comp. Biochem. Physiol., *93B*, 1989: 317–324.

RAMAKRISHNA, M. – HULTIN, H. O. – ATALLAH, M. T.: A comparison of dogfish and bovine chymotrypsins in relation to protein hydrolysis. J. Food. Sci., *52*, 1987: 1198–1202.

RAO, K. N. – LOMBARDI, B.: Substrate solubilization for the Mummel-chymotrypsin assay. Anal. Biochem., *65*, 1975: 548–551.

RICK, W.: Messung mit N-Benzoyl-L-Tyrosinathylester als Substrat. In: BERGMAYER, H. U. – GAWEHN, K.: Methoden der enzymatischen Analyse. B. I. Weinheim, Verlag Chemie 1974: 1048–1051.

Receive July 17, 1997

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 351–362

Izolace a charakterizace proteolytických enzymů v hepatopankreatu kapra

Proteolytické enzymy (trypsin, chymotrypsin, aminopeptidasa a karboxypeptidasa A a B) byly izolovány z hepatopankreatu kapra homogenací v 10mM Tris-HCl pufru pH 7,9 v přítomnosti 10mM $CaCl_2$ a čiřením v kyselém prostředí. Gelovou chromatografií na Sephadexu G-100 byla oddělena aminopeptidasa (tento enzym bude předmětem samostatné práce). Ostatní proteasy byly dále děleny na DEAE-celulose. Byly získány izoenzymy: chymotrypsin I a II, trypsin I a II. Chymotrypsin I a trypsin I nejsou na sloupci DEAE-celulosy sorbovány, chymotrypsin II a trypsin II jsou eluovány gradientem iontové síly. Izoelektrickou fokusací byly zjištěny tyto izoelektrické body pro chymotrypsin I 7,1; chymotrypsin II 4,9; trypsin I 7,9; trypsin II 4,8; karboxypeptidasa A 6,9 a karboxypeptidasa B 8,1. Optimální pH bylo pro chymotrypsin I 8,0–8,3, pro trypsin I 8,0–8,2, pro trypsin II 8,1–8,5, pro karboxypeptidasu A 7,6 –7,9 pro karboxypeptidasu B 7,6–7,9. Optimální teploty (°C) byly pro chymotrypsin I 34–35, pro trypsin I 58–60, pro trypsin II 55–56, karboxypeptidasu A 48–49 a pro karboxypeptidasu B 48–49. Vlastnosti chymotrypsinu II nemohly být stanoveny pro velmi nízký obsah tohoto enzymu v extraktu. Z podobného důvodu byly stanoveny kinetické parametry pouze u chymotrypsinu I (K_m = 0,96, V_m = 0,35) a trypsinu II (K_m = 0,12, V_m = 1).

kapr; proteolytické enzymy; purifikace proteas; charakterizace proteas; trypsin; chymotrypsin; karboxypeptidasa A; karboxypeptidasa B

Contact address:

Ing. Milena K m í n k o v á, Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 7, 102 31 Praha 10, Česká republika
Phone: + 420 2 702 331, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp.anet.cz

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 363–374

AFLATOXINS IN FEED, THE POSSIBILITIES OF FEED DETOXIFICATION AND ITS INFLUENCE ON NUTRITIVE VALUE*

Ivan BOHAČENKO, Zdeněk VESELÝ, Petr HOMOLKA[1]

Food Research Institute Prague, Prague; [1]*Research Institute of Animal Production, Prague-Uhříněves, Czech Republic*

Abstract: Detoxification of corn semolina, which was intentionally contaminated with aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2, by extrusion process and by the addition of an aqueous solution of NH_3 under varied temperature and exposure, was examined. The results make it possible to recommend to practical workers a simple and inexpensive method of detoxification by the addition to the feed of 2% NH_3, a consequent storage for 1 week at 20 °C in a closed space (e.g. PE bags) and the final aeration and drying. This way enables to decrease the content of all types of aflatoxins by 85 to 95%, which is comparable with detoxification carried out by extrusion with the addition of 1% NH_3. Chemical analyses and *in vivo* experiments with cannulated cows show that the feed treated in this way does not lose nutritive value; in fact, degradability of nitrogen and intestinal digestibility of nitrogen and dry matter not digested in the rumen are increased.

feed; aflatoxins; decontamination; extrusion; ammonia; nutritive value

Aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 and M_2 belong to the most followed-up aflatoxins. The aflatoxins of the B and G types are direct metabolites of moulds, primarily of those of the genus *Aspergillus*, and can occur in a number of raw materials, food and feed, namely in nuts and grain. As the occurrence of the most toxic aflatoxin B_1 generally surpasses other kinds, its content in feed is approved within the following limits (Min. of Agric., 1995):

A general limit is 20 µg/kg, in extracted grouts except for peanut 30 µg/kg, in peanut grouts 70 µg/kg; in feed intended for cattle and sheep 50 µg/kg, for lactating cattle, sheep and goats 10 µg/kg, for young poultry 2 µg/kg, for trout 0.5 µg/kg and for other fish 5 µg/kg.

It is obvious that if the content of aflatoxin B_1 in feed raw materials only slightly exceeds the above-mentioned limits, it is possible to substitute the

* The study was supported by grant No. 0117 from the National Agency of Agricultural Research.

process of decontamination e.g. by mixing the contaminated raw material with other, non-contaminated material, or to use this for other groups of animals, as frequently practised. Of course, a general principle must be taken in consideration: prevention, i. e. a strict adherence to the technologies inhibiting an infection by, and the reproduction of, toxigenic microorganisms, is the most efficient way how to minimize the danger of any contamination with aflatoxins.

In the degradation of aflatoxins, it must be pointed out that they are rather resistant to high temperatures and chemical procedures currently used in feed production technologies. Research and the practical application of its results have been existing for several decades, as shown by a number of reviews (e.g. Samarjeewa et al., 1990; Šimková, Príbela, 1994; Basappa, Shantha, 1996). On the basis of these reviews, detoxification methods can be classified as physical, chemical, physicochemical and microbiological ones, or are their combinations.

Physical methods are primarily those utilizing the effect of high temperatures between 100 and 250 °C, microwave heating (Pluyer et al., 1987; Farag et al., 1996), ionizing radiation (Van Dyck, 1982; Hooshmand, Klopfstein, 1995) and extrusion (Grehaigne et al., 1983). Aflatoxins are also unstable to light and UV radiation (Ruprich, 1992).

Out of the chemical methods, the use of a number of compounds with oxidative or hydrolytic effects was described (Mercado et al., 1991; Tabata et al., 1994), when the lactone cycle of aflatoxins is disintegrated and the resultant compounds are substantially less toxic.

Physico-chemical methods are those utilizing the adsorption of aflatoxins to activated carbon, bentonites, zeolites and various synthetic ion exchangers (Ramos et al., 1996; Galvano et al., 1996).

In recent years attempts have been made to detoxify aflatoxins microbiologically, e.g. by help of *Flavobacterium aurantiacum* (Line et al., 1994).

Most of the methods listed are not considered as promising for practical feed production because very expensive technologies are involved, or the decontamination procedure is so drastical that it significantly limits the consequent use of the feed. The ammoniation, when aflatoxin B_1 is converted into

aflatoxin D_1, which is 130 times less toxic, is considered as the only method of practical importance (Park, 1993a; Cong Ying Weng et al., 1994).

For practical use two procedures are recommended, i.e. ammoniation at high temperatures and pressures, or ammoniation at an ambient temperature and pressure (Park, 1993b). In the first case the addition of ammonia amounts to 0.2–2%, temperature 80–120 °C, pressure 0.24–0.34 MPa, and the reaction time 20–60 minutes. In the second case, the content of ammonia is increased to 1–5%, and the reaction time takes 14–21 days. In both alternatives detoxification effect equals 90–95% of the original content of aflatoxin B_1.

The aim of our experiments was to propose a fast and sufficiently effective detoxification of aflatoxins, which can be easily used in the local agricultural practice, and to follow the changes in nutritive values of such decontaminated raw materials intended for feed production.

MATERIALS AND METHODS

The analyses to determine the content of aflatoxins were carried out based on the method of immunoaffinity extraction of aflatoxins and their consequent determination by HPLC method with fluorescent detection following derivatisation (Veselý, Bohačenko, 1995).

The artificially contaminated samples were prepared from commercially produced maize grits without any content of aflatoxins. In a 5litre glass jar, 1 kg of grits was mixed with 30 ml chloroform containing the experimental dose of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2; the chloroform solution was added gradually while the grits were stirred continually. After the chloroform solution was added, the glass jar was closed and the content was further mixed for additional 30 min. Later on, chloroform was evaporated in a fume hood.

The treatment of the contaminated maize grits with ammonia was carried out similarly, i.e. by gradual admixture of the respective amount of the 25% aqueous ammonia solution to the grits treated while stirring the grits continually.

The influence of extrusion on the content of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in contaminated maize grits, both untreated and containing 1% ammonia, was tested by help of a laboratory-type one-worm extruder Brabender DCE 330 under the following conditions: moisture content, 15%; tempera-

ture 200–208 °C; treatment in the heated sector of the extruder 20 s; drying at 60 °C 1 hr. The results of the decontamination of three samples differing in the level of aflatoxin contamination are shown in Table I.

The detoxification of the samples of contaminated maize grits by the treatment with 2% NH_3 was carried out in closed PE bags kept either in the laboratory at ambient temperature ca. 20 °C, or in a climatised box at 50 and 80 °C. The exposure lasted either 24 or 168 hrs. After that time ammonia was evaporated in two steps, first in a fume hood at ambient temperature for 12 hrs, and then in the drying oven for 1 hr at 60 °C. The results are summarised in Table II.

To determine the changes in the nutritive value of the maize grout under the conditions simulating the detoxification proper of aflatoxins by the addition of NH_3, the following alternative samples were prepared:

untreated grout,

grout with 2% NH_3 kept at 20 °C for 1 week,

grout with 2% NH_3 heated to 50 °C for 24 hrs,

grout with 2% NH_3 heated to 80 °C for 1 week.

When choosing these alternatives, we supposed that alternatives 2 and 3 were sufficient for effective detoxification, and alternative 4 represented a treatment at extreme parameters. All samples were then analysed at the Research Institute of Feed Industry in Pečky to provide basic feed evaluation (Table III) and then in the Food Research Institute Prague for their contents of amino acids (Table IV).

To examine the influence of the feed treatment with ammonia on its nutritive value under normal and increased temperatures, experiments on cannulated cows were also carried out at the Research Institute of Animal Production, Department of Nutrition Physiology at Prague-Uhříněves.

In alternative 1 (untreated grout) and 4 (representing maximum temperature and time exposure, see above), degradability of nitrogen compounds and of dry matter was determined. This determination was done by the method *in sacco* (Vencl, Šimák, 1986) on a dry cow (black pied cattle) and fitted with a large rumen cannula. Feed samples, contained in bags made of polyester tissue, were incubated in the rumen for 2, 4, 8, 16, 24 and 48 hrs. The calculation of effective degradability (Orskov, McDonald, 1980) was

done by help of the computer program DEGPIC compiled by Komprda and Pospíšil – Table V.

The determination of intestinal digestibility of nitrogen and dry matter undegraded in the rumen was done by help of the "mobile bag" method (Frydrych, 1992). Dry cows (black pied cattle) were used as experimental animals. Two of them, fitted with a large rumen cannula (inner diam. 12 cm) served for the preparation of undegraded residues of feeds and other two, with a simple T cannula in the proximal part of the duodenum, were used for the determination of intestinal digestibility of nitrogen and dry matter undegraded in the rumen.

All the four above-mentioned alternatives of ammonia-treated maize grout were tested. The intestinal digestibility of nitrogen and dry matter was calculated by help of the formula

$$(A - B) / A * 100$$

where: A – amount of nutrient entering the gut

B – amount of nutrient residues after the passage through the gut

The digestibility value of nitrogen was obtained after the determination of its reduction in the dry matter of feed contained in respective bags, when the mean and other basic statistical parameters were calculated (Table VI).

RESULT AND DISCUSSION

The detoxification of maize grits artificially contaminated with aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 carried out by extrusion processing proved that the extrusion alone did not cause the desirable decrease of these compounds (Table I). In samples with low content of aflatoxins the decrease amounted to 25 to 42%, in samples with higher level of contamination to 0 to 33%. It is also possible to state that extrusion eliminates the B type aflatoxins less than those of the G type. The above-mentioned table also shows that a more substantial decontamination was reached through extrusion with the addition of 1% NH_3, when the residual content of aflatoxins in the products treated in this way practically did not exceed the limits approved for the sensitive species of domestic animals. In the B type aflatoxins the decrease of the starting content reached 85 to 89%, in the G type 93 to 98%.

I. Effect of extrusion process on the content of aflatoxins in contaminated maize grits

Sample No.	Content of aflatoxins [g.kg^{-1}]											
	B_1			B_2			G_1			G_2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	10.1	7.5	1.2	11.2	8.2	1.5	10.3	6.7	0.7	8.9	5.2	0.2
2	20.1	19.9	3.6	22.6	19.5	3.4	20.5	17.3	1.5	15.2	12.5	0.4
3	40.2	40.2	5.2	45.2	42.2	5.1	41.2	34.6	1.6	31.6	21.7	0.4

1 = prior to extrusion; 2 = after extrusion; 3 = after extrusion with 1% NH_3

As to the aflatoxin detoxification caused by the effect of the aqueous ammonia solution under various temperatures and exposure times, it is obvious from Table II that it is possible to achieve very good results under these conditions, in line with the published data, and that this decontamination effect increases with rising temperatures and longer exposures. From the practical viewpoint, the most important result may be seen in the fact that the addition of 2% NH_3 to maize grits at 20 °C and 7 days exposure can lower the starting content of B aflatoxins by 86 to 88% and G aflatoxins by 95 to 98%, i.e. to the same level which is reached when the extrusion and ammonia processing are used, and much higher investments and operational costs are required.

II. Effect of temperature and duration of exposure on the content of aflatoxins in contaminated maize grits when 2% NH_3 is added (heated to 80 °C for 1 week)

Temperature [°C]	Exposure [hrs]	Content of aflatoxins [µg.kg^{-1}]			
		G_1	B_1	G_2	B_2
Untreated		20.5	20.1	15.8	22.6
20	24	3.3	8.7	2.4	10.1
50		1.3	1.5	0	0.2
80		0.8	0	0	0.1
20	168	1.1	2.9	0.3	2.8
50		0	0	0	0
80		0	0	0	0

As the treatment of feed with alkaline substances under higher temperatures may cause unwanted changes in their nutritive value either by the decomposition of some compounds or by the mutual interactions of the proteinaceous and saccharide components, this aspect was also followed up in the suggested detoxification by direct treatment with ammonia. The results of the analyses shown in Table III indicated the possibility of the fixation of ammonia in feed, manifesting by the cc. 25% increase of the content of nitrogenous compounds, i.e. from the starting 9.2% up to 12.33 % depending on the temperature and exposure time. Analogically, the content of the digestible nitrogenous compounds increased from 7.57 to 10.06%. Other parameters of the feed treated remained practically unchanged, which is important particularly in the metabolised energy as the deciding indicator of feed usability.

During detoxification the content of some amino acids in the feed slightly changed, again depending on the temperature and exposure time used (Table IV). In practical use, where alternative 2 (20 °C for 1 week) would be

III. Nutrition values of maize grout under the conditions simulating aflatoxin detoxification with NH_3

Determination	Alternative			
	1	2	3	4
Dry matter [%]	89.41	88.68	89.46	90.15
Ash [%]	1.50	1.47	1.50	1.44
Fat [%]	5.28	4.98	4.83	5.33
N-compounds [%]	9.20	10.79	10.96	12.23
Digestible N-compounds [%]	7.57	8.93	9.05	10.06
Starch [%]	59.16	60.57	60.30	61.22
Reduced sugars after hydrolysis [%]	1.64	10.09	0.73	1.00
Acid number of fat [mg KOH/1 g]	47.10	57.71	32.04	48.74
Metabolised energy [MJ/kg]	13.32	13.63	13.52	14.08

Alternative 1: untreated grout
Alternative 2: grout with 2 % NH_3 kept at 20 °C for 1 week
Alternative 3: grout with 2 % NH_3 heated to 50 °C for 24 hrs
Alternative 4: grout with 2 % NH_3

IV. Amino acid content of maize grout under the conditions simulating aflatoxin detoxification with addition of NH_3 (g AK/100 g)

Amino acid	Alternative			
	1	2	3	4
Aspartic acid	0.60	0.65	0.56	0.62
Threonine	0.33	0.38	0.32	0.33
Serine	0.35	0.45	0.38	0.36
Glutamic acid	1.42	1.51	1.33	1.42
Proline	0.76	0.79	0.73	0.75
Glycine	0.39	0.42	0.37	0.38
Alanine	0.62	0.71	0.59	0.65
Valine	0.67	0.71	0.52	0.57
Methionine	0.39	0.24	0.21	0.24
Isoleucine	0.42	0.28	0.29	0.33
Leucine	1.10	0.99	0.91	1.01
Tyrosine	0.74	0.70	0.60	0.65
Phenylalanine	0.62	0.48	0.46	0.56
Histidine	0.30	0.30	0.29	0.21
Lysine	0.40	0.33	0.31	0.21
Arginine	0.61	0.57	0.52	0.45
Cystine	0.018	0.013	0.014	0.011
Total	9.74	9.42	8.40	8.15

Explanation: Nos. of alternatives see Table III

the most perspective procedure, the content of methionine and leucine decreased by 35%, and phenylalanine and lysine by ca. 20%.

In the *in vivo* experiments carried out on cannulated cows, the effective degradability of proteins of maize grout (alternative l) reached 68.3% and that of the grout with high temperature and exposure time load (alternative 4) 78.0%, i.e. increased by 9.7% (Table V). This increase of degradability was probably caused by nitrogen enrichment during feed treatment. This was indicated by the increased content of nitrogen after the treatment, which is easily degradable, belonging to the soluble fraction a. On the other hand, the

degradability of dry matter was lowered by 3%, i.e. from 78.5% in untreated grout to 75.5% in treated grout.

The positive influence of treatment with ammonia was also manifested in the determination of the intestinal digestibility of nitrogen and dry matter (Table VI). It was particularly significant in the digestibility of dry matter, which increased from 82.7% in untreated grout to 91.3% in grout treated with ammonia at 20 °C for 1 week, i.e. by 10.5%, or to 98.1% in grout treated with ammonia at 80 °C for 1 week, i.e. by 15.7%. The increase of the digestibility of nitrogen was markedly lower, i.e. by ca. 3% in all treatment procedures. .

In conclusion it is possible to say that the detoxification of feed contaminated with an increased amount of aflatoxins can be carried out with a suffi-

V. Degradability of nitrogen and dry matter of the treated maize grout determined by *in sacco* method

Incubation [hrs]	Degradability of nitrogen [%]			Degradability of dry matter [%]		
	Alt 1	Alt 4	diff.	Alt 1	Alt 4	diff.
2	33.2	54.6	21.3	34.7	38.1	3.4
4	31.4	47.8	16.4	34.0	33.7	–0.3
8	30.3	51.7	21.3	48.6	43.4	–5.2
16	54.7	69.2	14.5	76.3	68.5	–7.8
24	81.7	88.9	7.2	92.9	85.4	–7.5
48	89.0	94.1	5.1	96.9	96.3	–0.6
k	0.035	0.035		0.035	0.035	
a	30.3	47.0		26.0	29.5	
b	64.6	50.9		77.0	84.3	
c	0.050	0.051		0.073	0.042	
Coefficient of determination [%]	87	87		97	96	
eD	68.3	78.0	9.7	78.5	75.5	–3.0

Nos. of alternatives see Table III
k – the rumen out rate (constant used 0.035)
a – easily degradable fraction of soluble proteins easily washable from the bags
b – fraction of unsolvable, but potentially degradable proteins
c – degradation constant (speed of fraction b)
eD – effective degradability

VI. Intestinal digestibility of nitrogen and of residual dry matter of treated maize grout determined by mobile bag method

Alter-native	Incubation in cow rumen	Passage through cow gut	Nitrogen digestibility				Dry matter digestibility			
			n	$\bar{x}$	SD	v	n	$\bar{x}$	SD	v
1	A, B	A, B	8	94.08	0.6058	0.3670	8	82.86	2.4081	5.7988
2	A	A	4	96.50	1.2400	1.5384	4	91.35	3.0700	9.4097
3	A, B	A, B	9	96.16	1.0983	1.2063	9	92.64	2.1431	4.5928
4	A, B	A, B	8	97.56	1.7100	2.9241	8	98.07	1.4800	2.1962

Nos. of alternatives see Table III.
n – No. of bags; $\bar{x}$ – mean digestibility; SD – standard deviation; v – variation coefficient

cient effect (85–95%) by the addition of 2% NH_3, its consequent storage in closed space for 1 week, aeration and drying. The achieved degree of decontamination is in keeping with the published data by the authors from other countries. This procedure does not influence the nutritive value of the feed treated, and the degradability of nitrogen and the intestinal digestibility of nitrogen and dry matter increases. For these reasons it is possible to recommend it for practical detoxification of smaller amounts of contaminated raw materials which are intended for the production of mixed feed.

References

BASAPPA, B. C. – SHANTHA, T.: Methods for detoxification of aflatoxin in foods and feeds – a crtical appraisal. J. Food Sci. Technol. – India, *33*, 1996: 95–107.

CONG YING WENG – MARTINEZ, A. J. – PARK, D. J.: Efficiacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. Food Addit. Contamin., *11*, 1994: 649–658.

DYCK, P. J., van – TOBBACK, P. – FEYS, M. – VOORDE, H. H., van de: Sensitivity of aflatoxin to ionizing radiation. Appl. Environ. Microbiol., *43*, 1982: 1317–1319.

FARAG, R. S. – RASMED, M. M. – ABO-HGEER, A. A. A.: Aflatoxin destruction by microwave heating. Int. J. Food. Sci. Nutr., *47*, 1996: 197–208.

FRYDRYCH, Z.: Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of various feeds as estimated by the mobile bag technique. Anim. feed Sci. Tech., *37*, 1992: 161–172.

HOOSMAND, H. – KLOPFSTEIN, C. F.: Effects of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybeans with different moisture contents. Plant Foods Human Nutr., *47*, 1995: 227–238.

GALVANO, F. – PIETRI, A. – FALLICO, B. – BERTUZZI, T. – SCIRE, S. – GALVANO, M. – MAGGIORE, R.: Activated carbons: *In vitro* affinity for aflatoxin B_1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. J. Food Prot., *59*, 1996: 545–550.

GREHAIGNE, B. – CHOUVEL, B. H. – PINA, M. – GRAILLE, J. – CHEFTEL, J. C.: Extrusion-cooking of aflatoxin-containing peanut meal with and without addition of ammonium hydroxide. Lebensm. Wiss. Technol., *16*, 1983: 317–322.

LINE, J. E. – BRACKETT, R. E. – WILKINSON, R. E.: Evidence for degradation of aflatoxin B_1 by *Flavobacterium auranticum*. J. Food Prot., *57*, 1994: 788–791.

MERCADO, C. J. – REAL, M. P. N. – DEL ROSARIO, R. R.: Chemical detoxification of aflatoxin-containing Copra. J. Food Sci., *56*, 1991: 733–735.

ORSKOV, E. R. – McDONALD, I.: The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. J. Agric. Sci. Camb., *92*, 1980: 499–503

PARK, D. L.: Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. Food Addit. Contamin., *11*, 1993a: 49–60.

PARK, D. L.: Controlling aflatoxin in food and feed. Food Tech., Oct 1993b: 92–96.

PLUYER, H. R. et al: Destruction of aflatoxins on peanuts by oven and microwave-roasting. J. Food Prot., *50*, 1987: 504–508.

RAMOS, A. – FINK-GREMMELS, J. – HERNANDEZ, E.: Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. J. Food. Prot., *59*, 1996: 631–34.

RUPRICH, J.: Mykotoxiny – vznik, charakteristika, účinky na člověka. In: Sem. Aktuální ekologické otázky. Praha 1992.

SAMARAJEEWA, U. – SEN, A. C. – COHEN, N. D. – WEI, C. I.: Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. J. Food Prot., *53*, 1990: 489–501.

ŠIMKOVÁ, T. – PRÍBELA, A.: Mykotoxiny v potravinách. Bull. PV–Bratislava, *33*, 1994, 45–55.

TABATA, S. – KAMIMURA, H. – IBE, A. – HASHIMOTO, H. – TAMURA, Y.: Degradation of aflatoxins by food additives. J. Food Prot., *57*, 1994: 42–47.

VENCL, B. – ŠIMÁK, P.: Hodnocení dusíkatých látek krmiv pro přežvýkavce. [Závěrečná zpráva.] Praha-Uhříněves, VÚŽV 1986: 31 s.

VESELÝ, Z. – BOHAČENKO, I.: Imunoafinitní extrakce aflatoxinů a jejich stanovení metodou HPLC v surovinách, potravinách a krmivech. Potrav. Vědy, *13*, 1995: 451–460.

Příloha k vyhlášce č. 190/1995 o výrobě a složení krmných směsí. Praha, Ministerstvo zemědělství 1995.

Received July 16, 1997

Aflatoxiny v krmivech, možnosti detoxikace a její vliv na nutriční hodnotu

Mezi nejvíce sledované aflatoxiny patří aflatoxin B_1, B_2, G_1 a G_2, M_1 a M_2, přičemž aflatoxiny skupiny B a G jsou přímými metabolity plísní, především druhu *Aspergillus*. Vzhledem k tomu, že se mohou vyskytovat nejen v řadě surovin a potravin, ale též v krmivech, zejména obilovinách a jádrovinách, bylo cílem našich pokusů jednak navrhnout rychlý a dostatečně účinný způsob detoxikace aflatoxinů, efektivně využitelný v naší zemědělské praxi, a dále sledovat změny nutriční hodnoty takto dekontaminovaných surovin určených pro krmivářské použití.

Byla ověřena detoxikace kukuřičné krupice uměle kontaminované aflatoxiny B_1, B_2, G_1 a G_2 jednak extruzním procesem a dále přídavkem vodného roztoku NH_3 za různých teplot a doby expozice. Na základě dosažených výsledků lze pro praxi doporučit jednoduchý a finančně nenáročný způsob detoxikace, prováděný přídavkem 2 % NH_3 na hmotnost krmiva, následným skladováním jeden týden při 20 °C v uzavřeném prostoru, např. v polyetylenových pytlích, a konečným odvětráním a dosušením. Tímto způsobem lze snížit původní obsah všech typů aflatoxinů cca o 85–95 %, což je srovnatelné s údaji zahraničních autorů. Chemickými rozbory a pokusy *in vivo* na kanylovaných kravách bylo prokázáno, že u takto upraveného krmiva není výrazně ovlivněna jeho nutriční hodnota a naopak dochází ke zvýšení degradovatelnosti dusíku a zvýšení intestinální stravitelnosti dusíku a sušiny, které nejsou degradovány v bachoru.

krmivo; aflatoxiny; dekontaminace; extruze; amoniakalizace; nutriční hodnota

---

Contactn address:

Dr. Ivan Bohačenko, Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 7, 102 31 Praha 10, Česká republika
Phone: + 420 2 702 331, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp.anet.cz

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 375–390

BARVA OVOCNÝCH JOGURTŮ

Colour of Fruit Yoghurts

Ludmila PROKŮPKOVÁ, Pavla NOVOTNÁ

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract: The colour parameters of standard fruit preparations for yoghurt were measured by using colorimeter CR-300. The influence of parameters of measurement (thickness of the product layer, outer light conditions and washing of the sensor window) were studied to avoid the errors in colour measurements. The colour parameters of white yoghurts with different fat content was also measured. These samples were mixed with fruit preparations coloured by different amount of colour (Carmina for red fruits, Turmeria for yellow sort of fruits). The influence of colour additive concentration on colour parameters was studied for different fruit preparations and resulting mixture yoghurt–preparation. Fat content of yoghurt used for mixing has no influence on colour parameters of mixture (fat content between 1.2–3.2%).

colour; yoghurt; fruit; colour additives; Turmeria, Carmina

Abstrakt: Při měření byly zjištěny hodnoty parametrů barvy standardně připravených polotovarů pro výrobu ovocných jogurtů s kusovým ovocem a samotných bílých jogurtů s různým obsahem tuku. Dále byly sledovány podmínky měření, které by mohly ovlivnit výsledky měření, a možnosti přídavku barviva (carmina pro červené ovoce a turmerie pro žluté druhy ovoce). Porovnání vlivu tučnosti na výslednou intenzitu barvy ovocných jogurtů naznačilo, že složení jogurtu ve sledovaném rozsahu (x_f = 1,2–3,2 %) nemá vliv na barvu finálního výrobku. Dobarvováním ovocného základu byly zjištěny závislosti koncentrace barviva na výsledné intenzitě barvy ovocného jogurtu.

barva; jogurt; ovoce; barviva; turmerie; carmina

Vizuální hodnocení je u člověka významně ovlivněno celkovým barevným vzhledem pozorovaného předmětu či jevu. Jogurty patří k produktům, které jsou většinou prodávány v neprůhledných obalech, a přesto je jejich barva pro konzumenta velmi důležitým kvalitativním znakem. Výslednou barvu

ovocných jogurtů lze upravovat několika způsoby. Jedním z nich je množství barveného ovocného polotovaru, dalším pak přídavek barviva.

Na barvu finálního výrobku mají vliv další faktory související s technologickým postupem výroby. Jde např. o obsah tuku, skladovací podmínky, teplotu (zejména u výrobků, u nichž dochází k tepelnému zpracování po přídavku barevné složky). Mimoto se významně projevuje doba, která uplyne mezi tepelným zákrokem a chlazením. V případě chlazení po naplnění do spotřebitelských obalů se uplatňuje i rychlost chlazení vzhledem k velikosti obalů a tedy otázky přestupu tepla (Helming, Kessler, 1978)

Objektivní měření barvy bylo použito jako efektivní postup pro praktické kvalitativní hodnocení barevných vlastností během výroby. Při současném měření barevných parametrů systému CIE byl zjištěn pokles světlosti L^* závislý na rostoucím obsahu ovoce. Ve všech případech (včetně přídavku meruněk) došlo k nárůstu hodnot parametru pro červenou barvu a_* se zvýšením přídavku ovoce. Naopak v případě parametru b^* pro žlutou, resp. modrou barvu došlo k nárůstu absolutních hodnot u meruněk a borůvek, u jahod hodnota parametru b^* s růstem obsahu ovoce poklesla (Ulberth et al., 1993). Kromě uvedených faktorů má na výslednou barvu ovocného jogurtu vliv i obsah tuku. Při porovnávání přídavku 35 % dobarvovaného jahodového pyré do jogurtu ze sbíraného (odstředěného) mléka, plnotučného mléka a smetany bylo zjištěno, že rostoucí obsah tuku snižuje intenzitu barvy, přičemž druh barvy (celkový vzhled a sytost) jsou ovlivněny jen slabě (Otte, 1987)

MATERIÁL A METODY

Ke sledování vlivu barvy ovocného polotovaru a použití barviv na výslednou barvu jogurtů s různým obsahem tuku bylo použito celkem pět druhů kusového ovoce od firmy ZD Libčany (tab. I) a čtyři druhy bílých jogurtů (tab. II) od různých výrobců. Ovocné polotovary byly připraveny svařením ovoce s vodou a cukrem. Vzhledem k nevýrazné barvě i chutnosti takto vyrobeného polotovaru bylo přidáno aroma a barvivo. Pro červené druhy ovoce (např. jahody, maliny) bylo v tomto případě použito přírodního barviva carmina CC-500-WS. Vlastním barvivem je karminová kyselina (Davídek et al., 1990). Ke žlutým druhům ovoce (např. meruňky, ananas) bylo přidáno

I. Vzorky ovocných polotovarů – Samples of fruit preparations

Druh ovoce[1]	Označení šarže[2]	Kód vzorku[3]
Jahoda lesní[4]	OJDJ 960930/1	J1
Jahoda lesní	OSDJ 960919/2	J2
Jahoda lesní	OSDJ 960924/3	J3
Jahoda lesní	OSDJ 960924/4	J4
Jahoda zahradní[5]	OSDJ 960912/4	JZ
Višeň[6] + vanilka[7]	OSDJ 960818/4	V
Malina[8]	OSDJ 961023/2	MA
Ananas[9]	OSDJ 961022/2	A
Meruňka[10]	OSDJ 960910/3	ME
Meruňka DIA	TS 960806/1	MD
Malina (bez barviva a aromatu[11])		MN
Ananas (bez barviva a aromatu)		AN

[1]fruit sort; [2]batch no.; [3]sample code; [4]forest strawberry; [5]garden strawberry; [6]sour cherry; [7]vanilla; [8]raspberry; [9]pineapple; [10]apricot; [11]without addition of colour and flavourings

žluté přírodní barvivo turmerie neboli kurkumin. Podle doporučení výrobce byl ovocný jogurt připravován přidáním 15 % ovoce k bílému jogurtu.

K hodnocení barvy bylo použito kolorimetru MINOLTA CR-300, který umožňuje měření za podmínek dvou světelných zdrojů (C a D65).

Parametry měření

Geometrie D/0° – světelný paprsek dopadá na povrch vzorku po difúzním rozptýlení, odráží se a dopadá na měřicí prvky pod úhlem 0°.

2° standardní pozorovatel – prostorový úhel, pod kterým je zachycován odražený paprsek dopadající na filtry.

Sonda o průměru 8 mm s plastovým krytem.

Bílý standard (příslušenství kolorimetru):

zdroj	L^*	a^*	b^*
C	98,03	–0,27	2,42
D65	98,03	–0,18	2,42

II. Vzorky bílých jogurtů – Samples of white yoghurts

Jogurt[1]	Výrobce[4]	Obsah tuku[6] [%]	Kód vzorku[7]
Nízkotučný[2]	Jesenické mlékárny[5] Bruntál	2	J
Danone light	Danone Benešov	1,2	DL
Danone	Danone Benešov	3	D
Hollandia-selský[3]	Karlovy Vary	3,2	H

[1]yoghurt; [2]low-fat; [3]cottage; [4]producer; [5]Jesenické dairies; [6]fat content; [7]sample code

Měření byla hodnocena pro barevný systém CIELAB, který lze popsat jako kulový prostor. Vzájemně kolmé osy trojrozměrného prostoru charakterizují parametry achromatické (stupnice šedi od bílé po černou vyjadřuje světlost L^*) a chromatické (základní barvy). Dvojice barevných os popisuje dvě dvojice doplňkových barev: červenou ($+a^*$) – zelenou ($-a^*$) a žlutou ($+b^*$) – modrou ($-b^*$). Všechny reálné barvy jsou plně charakterizovány hodnotami těchto tří souřadnic, přičemž rostoucí absolutní hodnota znamená zvýšení intenzity sledovaného parametru.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Podmínky měření

Pro jednotlivé ovocné polotovary byly zjišťovány podmínky měření a možnosti jejich ovlivnění. Podstatnou podmínkou kvalitního měření je zajištění, aby mezi plochou sondy a povrchem vzorku nevznikla vzduchová bublina, která výrazně zkresluje výsledky měření. Podobné problémy vyvolávají kousky ovoce. Tvoří barevnou nehomogenitu, což ovlivňuje výsledky měření. Tento problém se nejvýrazněji projevil u vzorku s ananasem a malinami. Největší rozptyl hodnot měření se projevil u nebarvených polotovarů, kde se výrazně neuplatňuje přidané barvivo a kontrastní body jsou zřetelnější proti méně výraznému pozadí. Výsledky měření barevných parametrů standardně přibarveného kusového ovoce a jejich směrodatných odchylek jsou uvedeny v tab. III a IV.

Stanovení „nekonečné optické vrstvy"

Na počátku byla zjišťována nutná výška vrstvy vzorku, vzhledem k možnému ovlivnění barevných parametrů interakcí odrazu od podložky, tj. stano-

III. Hodnoty barevných parametrů standardně přibarveného kusového ovoce – The values of colour parameters of fruit lumps added colour in standard way

Druh ovoce[1]	L^*	a^*	b^*	ΔE
Ananas[2]	23,22	1,87	7,54	75,03
Meruňka[3]	20,61	6,49	7,61	77,89
Meruňka dia	21,40	4,42	7,69	76,96
Jahoda lesní[4] 1	17,32	10,16	0,10	81,42
Jahoda lesní 2	15,76	12,10	–0,40	83,24
Jahoda lesní 3	16,10	12,28	–0,04	82,92
Jahoda lesní 4	15,91	12,47	–0,03	83,14
Jahoda zahradní[5]	15,89	12,17	–0,33	83,13
Malina[6]	16,93	15,01	0,72	82,55
Višeň[7]	16,44	13,41	–0,25	82,77
Ananas nebarvený[8]	22,77	3,19	4,57	75,37
Malina nebarvená[9]	18,13	14,08	1,25	81,19

[1]fruit sort; [2]pineapple; [3]apricot; [4]forest strawberry; [5]garden strawberry; [6]sour cherry; [7]raspberry; [9] pineapple without addition of colour; [9]raspberry without addition of colour

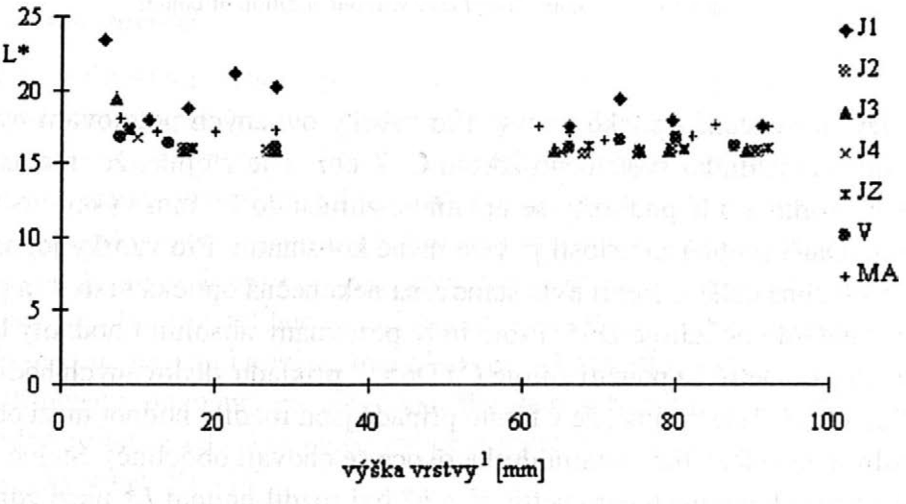
vení tzv. nekonečné optické vrstvy. Pro vzorky ovocných polotovarů bylo použito standardního světelného zdroje C. Z obr. 1 je zřejmé, že interakce odrazu vzorku a bílé podložky se uplatňuje zhruba do 25 mm výšky vrstvy vzorku. Další průběh závislosti je více méně konstantní. Pro vzorky jogurtů (a pro všechna další měření) byla stanovena nekonečná optická vrstva za použití standardního zdroje D65. Proto byly porovnány absolutní hodnoty barevných parametrů za použití zdroje C i D65. Z příkladu sledovaných hodnot světlosti (obr. 2) je zřejmé, že v tomto případě jsou rozdíly hodnot mezi oběma zdroji zanedbatelné (ostatní druhy ovoce se chovají obdobně). Stejně jako v případě barevných parametrů a^* a b^* byl rozdíl hodnot L^* mezi zdroji C a D65 maximálně 0,5 jednotky.

Výška vrstvy vzorku jogurtů nutná k objektivnímu měření byla stanovena na nejméně 15 mm.

IV. Směrodatné odchylky měření standardně přibarveného kusového ovoce – Standard deviations of measurings of fruit lumps added colour in a standard way

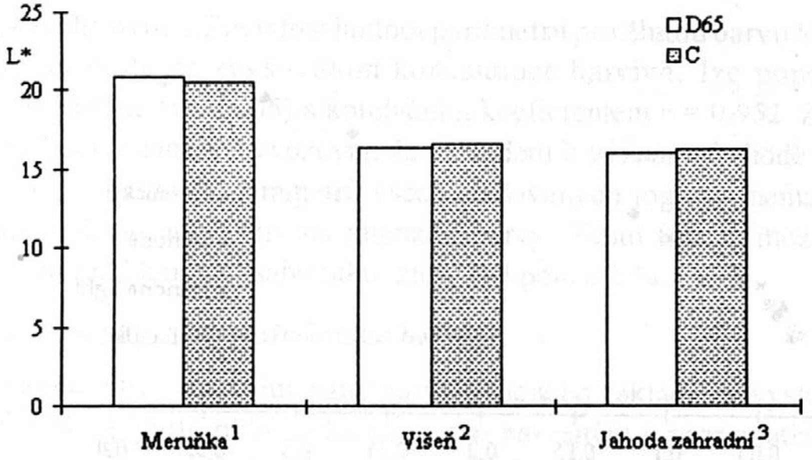
Kusové ovoce[1]	*L**	*a**	*b**	Δ *E*
Ananas[2]	1,27	0,81	0,92	1,23
Meruňka[3]	0,33	0,4	0,76	0,27
Meruňka[4] dia	0,11	0,16	0,18	0,11
Jahoda lesní[5] 1	0,20	0,46	0,31	0,13
Jahoda lesní 2	0,19	0,29	0,27	0,17
Jahoda lesní 3	0,27	0,68	0,22	0,37
Jahoda lesní 4	0,11	0,25	0,11	0,09
Jahoda zahradní[6]	0,11	0,09	0,19	0,11
Malina[7]	0,46	0,22	0,23	0,49
Višeň[8]	0,26	0,43	0,38	0,21
Ananas nebarvený[9]	1,16	0,44	0,84	1,15
Malina nebarvená[10]	0,78	1,09	1,11	0,68

[1]fruit sort; [2]pineapple; [3]apricot; [4]forest strawberry; [5]garden strawberry; [6]sour cherry; [7]raspberry; [9] pineapple without addition of colour; [9]raspberry without addition of colour



[1]layer thickness

1. Stanovení „nekonečné optické vrstvy“ pro červené druhy ovoce – Determination of “endless optical layer“ for red sorts of fruit



[1]apricot; [2]sour cherry; [3]garden raspberry

2. Porovnání hodnot světlosti pro různé zdroje – Comparison of brightness values for various sources

Průměrné hodnoty barevných parametrů bílých jogurtů jsou uvedeny v tab. V. Parametr Δ *E* (celková barevná diference) je dána vztahem

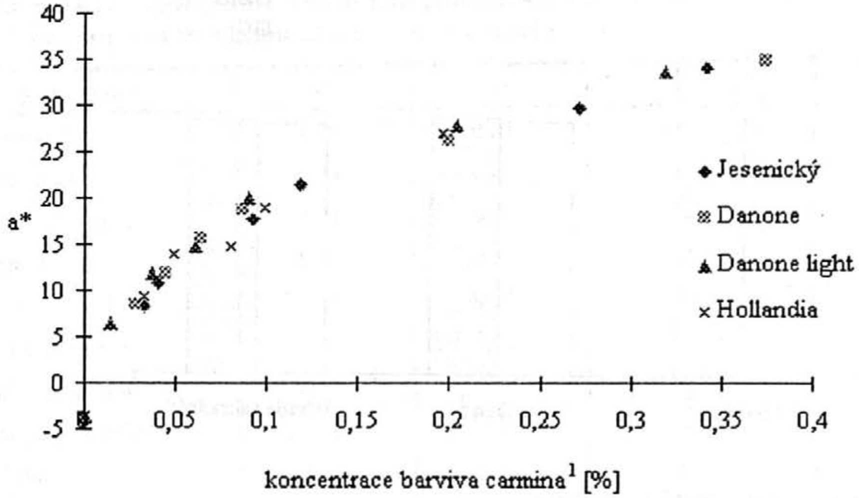
$$\Delta E = [(a_{vz} - a_{st})^2 + (b_{vz} - b_{st})^2 + (L_{vz} - L_{st})^2]^{1/2}$$

a vyjadřuje vzdálenost pravoúhlého průmětu měřeného vzorku od bílého standardu. Výsledné hodnoty naznačují, že i tato diference je pro všechny vzorky jogurtů stejná.

V. Hodnoty barevných parametrů pro bílé jogurty – The values of colour parameters for white yoghurts

Jogurt[1]	*L**	*a**	*b**	Δ *E*
Hollandia	90,63	–3,61	8,71	10,30
Danone	90,79	–3,63	8,01	9,78
Danone-light	89,86	–3,86	7,54	10,33
Jesenický	90,40	–4,08	8,19	10,34

[1]yoghurt



[1]concentration of Carmina colour

3. Závislost parametru pro červenou barvu na obsahu barviva carmina přidaného k jogurtům – Relation of the parameter for red colour to the amount of Carmina colour added to yoghurts

Vliv zastínění a čištění sondy

Dalšími možnými faktory, které by při měření mohly mít vliv na výsledky, je zastínění vzorkovnice a prostoru nad sondou nepropustnou tkaninou a také čištění sondy mezi jednotlivými měřeními. Byly sledovány všechny tři parametry (a^*, b^*, L^*) a bylo zjištěno, že ani zastínění, ani čištění sondy nemá vliv na výsledné hodnoty měřených parametrů. Za daných podmínek lze toto zjištění považovat za významné z hlediska možného použití kolorimetru v provozních podmínkách.

Barvení jogurtů

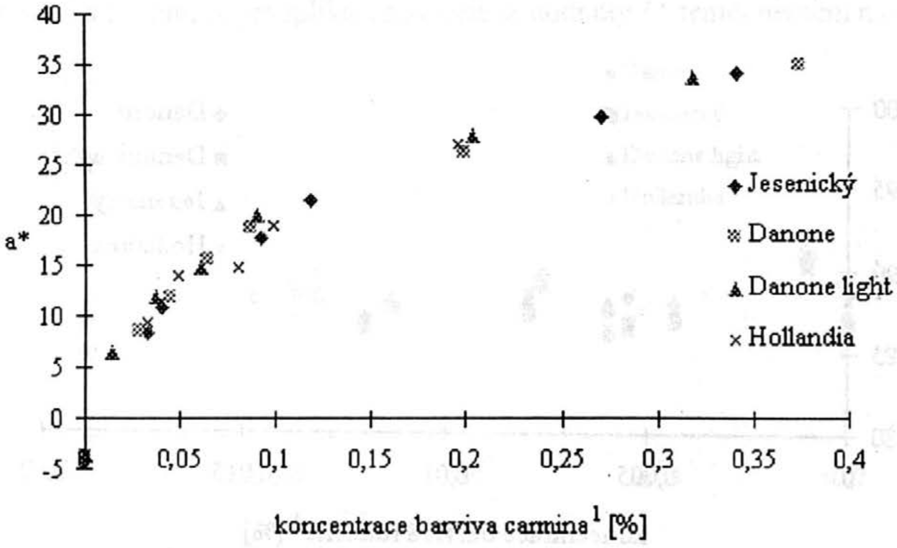
Při hodnocení vlivu přibarvování na výslednou barvu výrobku byly nejprve barveny samotné bílé jogurty. K jednotlivým jogurtům byly přidávány roztoky barviv v různých výsledných koncentracích barviva v jogurtu. U červeného barviva carmina byla nejvyšší měřená koncentrace 10krát vyšší než doporučená výrobcem ovocných polotovarů. Všechny naměřené hodnoty sledují průběh závislosti, kterou lze popsat rovnicí $y = 10{,}101 \ln (x/0{,}013)$ s korelačním koeficientem $r = 0{,}983$ (obr. 3). U žlutého barviva turmerie byla nejvyšší přidaná koncentrace třikrát vyšší než doporučená výrobcem

kusového ovoce. Závislost hodnot parametru pro žlutou barvu b^*, který pozvolna roste se zvyšováním koncentrace barviva, lze popsat vztahem $y = 6{,}5445 \ln (x/0{,}0005)$ s korelačním koeficientem $r = 0{,}952$. Z uvedených závislostí je možné vyvozovat, že vzhledem k významné shodě průběhů závislostí barevných parametrů všech sledovaných jogurtů, nemá složení jogurtu (obsah tuku) vliv na intenzitu barvy. Tento fakt je možné vysvětlit malým rozdílem v obsahu tuku, který byl pouze 2 %.

Ovocné jogurty – experimentální barvení

Měření vlivu různé intenzity barvy ovocného základu na výslednou barvu ovocného jogurtu bylo realizováno s nebarveným a nearomatizovaným základem reprezentujícím žluté (ananas) a červené (malina) ovoce. K tomuto základu bylo přidáno různé množství příslušného barviva. Takto získaný polotovar byl přidáván k jogurtům v množství 15 % z celkové hmotnosti výsledného ovocného jogurtu. Po intenzivní homogenizaci byla měřena barva.

Červené ovoce, tj. malinový základ kusového ovoce s přídavkem roztoku barviva carmina neukazuje významné systematické rozdíly mezi jednotlivými jogurty. Získanou závislost lze popsat vztahem $y = 3{,}71 + 30{,}58x$



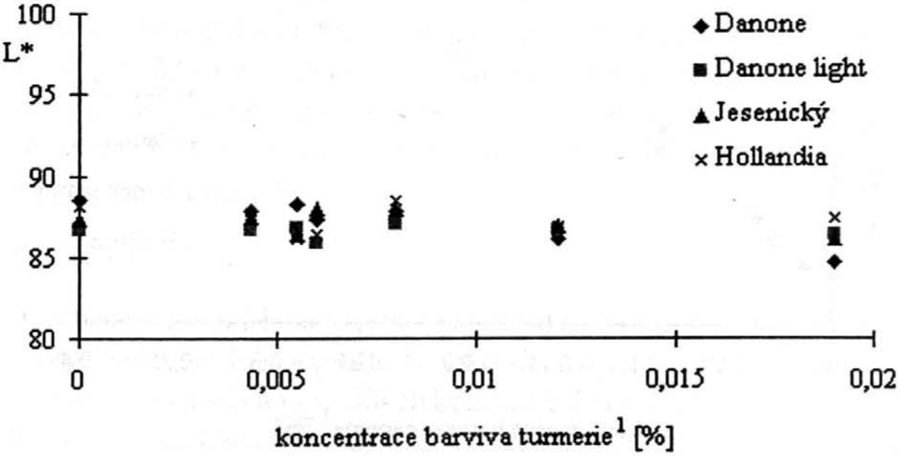
[1]concentration of Carmina colour

4. Závislost poměru a^*/b^* na přídavku barviva carmina k ovocnému základu – Relation of a^*/b^* ratio to Carmina color addition to the fruit substance

(r = 0,982). Pro lepší možnost posouzení vlivu barviva byly vypočteny hodnoty poměru a^*/b^*, který je na rozdíl od absolutních hodnot jen minimálně závislý na podmínkách měření a tedy lépe vyjadřuje sledovanou závislost. Ani zde se neprojevil vliv složení jogurtů na intenzitu barvy ovocného jogurtu. Hodnoty poměru a^*/b^* stoupají s rostoucí koncentrací barviva. Tuto závislost lze popsat vztahem $y = 0{,}89\ e^{7{,}27x}$ (r = 0,973) (vliv rozptylu hodnot při vyšších koncentracích přidaného barviva) – obr. 4.

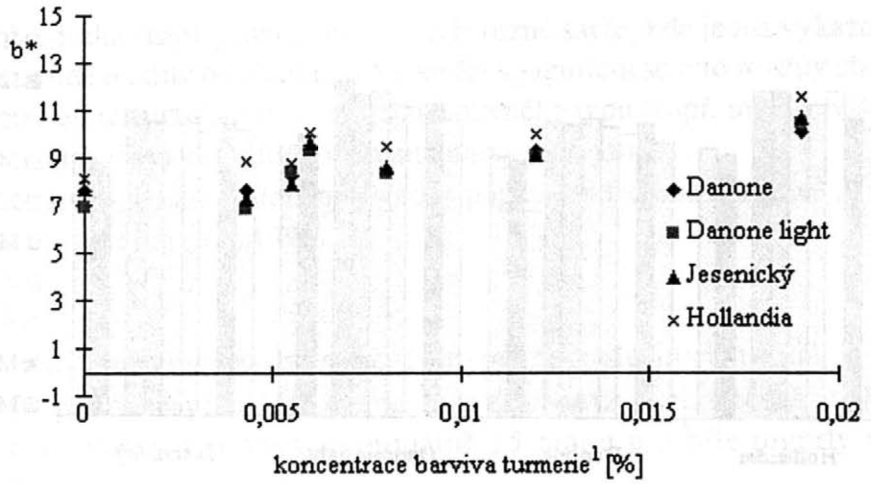
Z porovnání závislostí samotných barvených jogurtů (obr. 3) a jogurtů s různě barveným základem (obr. 4) lze navrhnout zvýšení intenzity červené barvy při zachování 15% přídavku ovoce zvýšením obsahu barviva z 0,04 % na 0,2 % vzhledem k v literatuře popsané zvýšené preferenci jogurtů s vysokým obsahem ovocné složky, tedy vyšší intenzitou barvy.

Při dávkování barviva turmerie k nebarvenému ananasovému základu se světlost téměř neměnila (obr. 5). Parametr b^* pro žlutou barvu jen velmi pomalu stoupal (obr. 6). Tuto lineární závislost je možné popsat vztahem $y = 7{,}55 + 162{,}01x$ (r = 0,888). Stejně jako přídavku červeného barviva carmina, i zde se projevila negativně na rozptylu hodnot přítomnost kousků ovoce. V případě žlutého barviva bylo měření realizováno pouze do 3,5ná-



[1]concentration of Turmerie colour

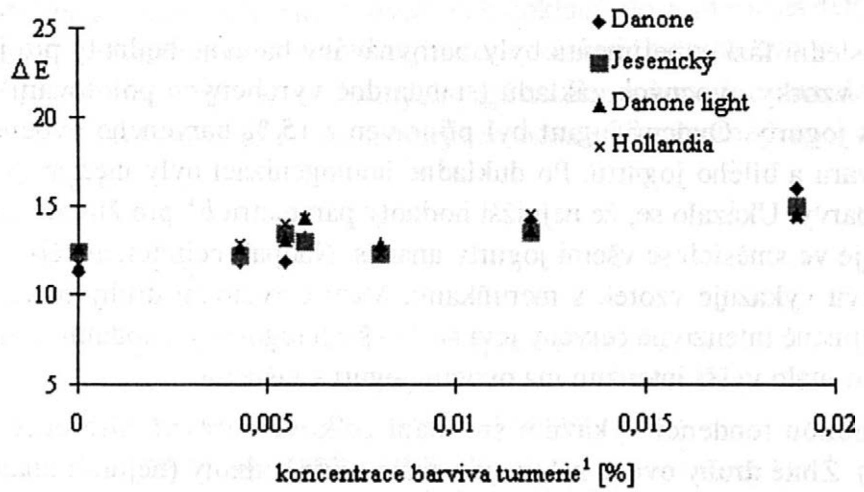
5. Závislost světlosti na přídavku barviva turmerie k ovocnému základu – Relation of brightness to Turmerie colour addition to the fruit substance



[1]concentration of Turmerie colour

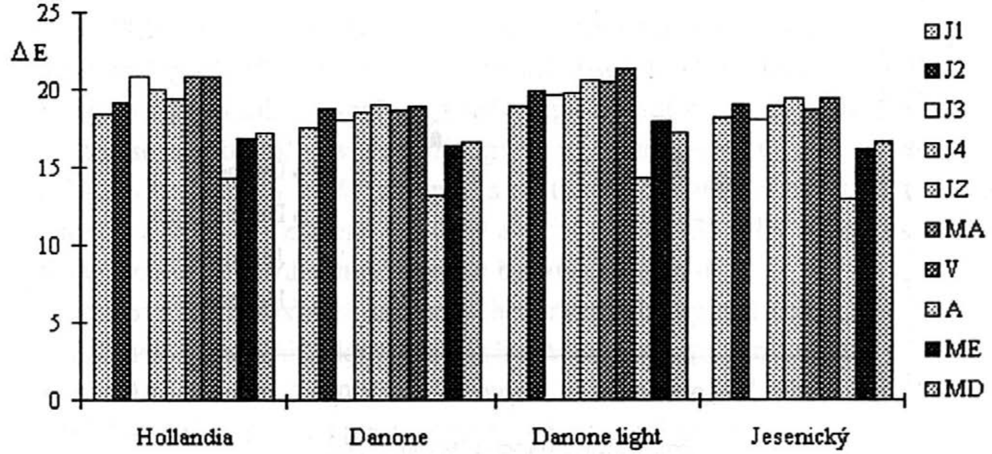
6. Závislost parametru pro žlutou barvu na přídavku barviva turmerie k ovocnému základu – Relation of the yellow colour parameter to Turmerie colour addition to the fruit substance

sobku doporučené koncentrace (cca do 0,02 %). Jde o velmi malé koncentrace, které se však projevují výraznou vizuální změnou barevné intenzity. To souvisí i s faktem, že při aplikaci turmerie se hodnoty L^* téměř nemění na rozdíl



[1]concentration of Turmerie colour

7. Závislost celkové barevné diference na přídavku barviva turmerie k ovocnému základu – Relation of total colour difference to Turmerie colour addition to the fruit substance



8. Hodnoty celkové barevné diference pro různé ovocné jogurty – The values of total colour difference for various sorts of fruit yoghurts

od přídavků barviva carmina, u něhož dochází k jejímu poklesu. Tento fakt ovlivňuje celkový vzhled barevného výrobku $y = 11{,}99 + 152{,}47x$, $r = 0{,}891$), čímž je velmi ovlivněn hodnotitel/konzument (obr. 7).

Ovocné jogurty – standardní barvení

V poslední fázi experimentu byly porovnávány barevné hodnoty pro jednotlivé vzorky ovocných základů (standardně vyrobených polotovarů) ve směsi s jogurty. Ovocný jogurt byl připraven z 15 % barveného ovocného polotovaru a bílého jogurtu. Po důkladné homogenizaci byly měřeny parametry barvy. Ukázalo se, že nejnižší hodnoty parametru b^* pro žlutou barvu vykazuje ve směsích se všemi jogurty ananas. Naopak nejintenzivnější žlutou barvu vykazuje vzorek s meruňkami. Mezi červenými druhy ovoce se jako nejméně intenzivně červený jeví směs všech jogurtů s jahodami lesními 1 a jen o málo vyšší intenzitu má ovocný jogurt s višněmi.

Obdobnou tendenci vykazuje srovnání celkové barevné diference ΔE (obr. 8). Žluté druhy ovoce nabývají o málo nižší hodnoty (nejnižší ananas) než červené druhy ovoce, které mají hodnoty ΔE téměř vyrovnané. Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že barevně se všechny jogurty téhož barevného typu jeví stejně. Za těchto podmínek je intenzita barvy ovocných jogurtů standardizována. A to jak při porovnávání různých šarží téhož ovoc-

ného druhu (např. jahoda lesní – čtyři různé šarže, kde jedna vykazovala samostatně rozdíly od ostatních; ve směsi s jogurtem se tyto rozdíly stírají), tak i u ostatních druhů ovoce stejného barevného typu (např. malina, višeň), které mají stejnou výslednou intenzitu barvy jako jahody.

Podrobněji jsou měření a výsledky popsány v technické zprávě (Prokůpková, Novotná, 1997).

Závěry

Naměřené výsledky lze stručně shrnout do následujících bodů:

1. Při stanovení podmínek měření byla zjištěna tzv. nekonečná optická vrstva pro ovocný polotovar minimálně 25 mm a pro bílé jogurty nejméně 15 mm.
2. Porovnání absolutních hodnot barevných parametrů při použití zdrojů C a D65 ukázalo, že hodnoty barevných parametrů se neliší. Mimoto bylo zjištěno, že zastínění vzorku a čištění sondy nemá vliv na výsledné hodnoty stejně jako není rozdílu mezi výsledky, pokud je sonda čištěna po každém jednotlivém měření nebo po třech až pěti měření.
3. Aplikace barviv k bílým jogurtům o různém obsahu tuku neprokázaly závislost mezi intenzitou barvy a složením jogurtu.
4. Přídavky různě barvených ovocných základů do jogurtů naznačují možnost zvýšení intenzity barvy zejména u červených druhů ovoce.
5. Měření intenzity barvy ovocných jogurtů připravených ze standardně vyrobeného kusového ovoce ukazuje na dosažení jednotné barvy ovocných jogurtů.

Seznam symbolů

a^*	barevnostní souřadnice, ($+a^*$) pro červenou barvu, ($-a^*$) pro zelenou barvu	[–]
a_{st}	barevnostní souřadnice bílého standardu	[–]
a_{vz}	barevnostní souřadnice vzorku	[–]
b^*	barevnostní souřadnice, ($+b^*$) pro žlutou barvu, ($-b^*$) pro modrou barvu	[–]
b_{st}	barevnostní souřadnice bílého standardu	[–]
b_{vz}	barevnostní souřadnice vzorku	[–]
ΔE	celková barevná diference	[–]

L^*	světlost	[–]
L_{st}	světlost bílého standardu	[–]
L_{vz}	světlost vzorku	[–]
r	korelační koeficient	[–]
x_f	koncentrace tuku v jogurtu	[%]

Literatura

DAVÍDEK, J. et al.: Chemical changes during food processing. 1. ed. Amsterodam-Oxford-New York-Tokyo, Elsevier 1990: 448 s.

HELMING, G. – KESSLER, H. G.: Colour and colour changes of fruit containing sour milk products. Inst. für Milchwissenschat & Lebensmittelverfahrenstech, *33*, 1978: 82–000.

OTTE, D.: Effect of fat content on the colour of strawberry yoghurt. Molkerei Zeit. Welt der Milch, *41*, 1987: 296–000.

PROKŮPKOVÁ, L. – NOVOTNÁ, P.: Barva ovocných jogurtů. [Technická zpráva č. 7/360/97.] Praha, VÚPP 1997.

ULBERTH, F. – KNEIFEL, W. – SCHAFFER, E.: Colour intensity preferences observed with selected fruit yogurts. Milchwissenschaft, *48*, 1993: 15–000.

Došlo 17. 6. 1997

Summary

Five types of fruit preparations were used to study the colour of fruit yoghurts. The influence of colour added was studied on colour of four commercial types of yoghurts. Fruit preparations were produced from fruit, sugar and additives. Their colour and flavour are featureless. Therefore, the natural or nature-identical flavourings and colour were added. The colour Carmina CC-500 WS was used for red fruits (e.g. strawberry, raspberry). The yellow colour Turmerie was added to other fruit types (apricots, pineapple). The recommended amount 15% w/w of fruit to yoghurt was used. The colour evaluation was made by using the Minolta CR 300 colorimeter. This instrument enables the measurement for two light sources C and D65 and the system CIELAB was used for colour quantification.

We studied different parameters which potentially influence the colour. The main influencing parameter is a good contact between the surface of the sensor and substance. The bubble of air should be avoided in this place. Similar problems are caused by the presence of lumps of fruit in the substance. The strongest influence was obser-

ved with pineapple and raspberry. The results of measurements of the colour of standard coloured fruit preparations are shown in Table III, standard deviations are shown in Table IV.

The first study was devoted to confirming the minimum height of the sample "endless optical layer from which there is no influence of thickness of the sample on the measured values of colour dimensions. Fig. 1 shows that the minimum 25 mm is necessary for fruit preparations colour measurement. The thickness of the sample layer for yoghurts is 15 mm. The colour of yoghurts used in experiments is characterized in Tab. V. The total colour difference is given by equation $\Delta E = [(a_{vz} - a_{st})^2 + (b_{vz} - b_{st})^2 + + (L_{vz} - L_{st})^2]^{1/2}$.

Other possible parameters which can influence the measured colour dimensions are the light sources coming from outside of instrument and cleaning of the sensor between individual measurements of colour. We found that there is no apparent influence of light coming from ambient space around the instrument and also that the cleaning of the sensor plate is not substantial for receiving repeatable results.

The influence of colouring was studied by two different ways. Firstly we studied the influence of colour amount added directly into the white yoghurt. Secondly we coloured fruit preparations and mixed it with yoghurt and studied colour of these mixtures. For the first case of coloured yoghurts we found for the red Carmina the dependence $y = 10.101 \ln (x/0.013)$ having the correlation coefficient 0.983 (Fig. 3), which is independent of the sort of yoghurt used. For the yellow colour Turmerie we found the general equation valid for yellow colour parameter b^* the dependence $y = 6.5445 \ln (x/0.0005)$ ($r = 0.952$). The sort of yoghurt (fat content and other parameters) had practically no influence on the intensity of the colour.

The second case was studied by adding the prescribed amount of colour into the fruit preparation and the coloured substance was added into the yoghurt in the portion of 15% by weight. Received dependence for red fruit showed no influence of the fruit and yoghurt types $y = 3.71 + 30{,}58x$ ($r = 0.982$). For better evaluation of the colour influence the ratio a^*/b^* was used. This ratio an increases with an increasing content of the colour. This function can be described by relation $y = 0.89\ e^{7.27x}$ ($r = 0.973$) (Fig. 4).

Comparing the dependence of a^* of coloured yoghurts on colour content (Fig. 3) with similar dependence of yoghurt coloured by the fruit preparation (Fig. 4) we can conclude that we can increase the red intensity by increasing the colour content from 0.04 to 0.2% very dramatically.

For the yellow colour Turmerie added to not coloured pineapple fruit preparation the brightness was not changed (Fig. 5). Parameter b^* increased with increased colour amount only slowly (Fig. 6). The dependence is linear and can be described by relation $y = 7.55 + 162.01x$ ($r = 0.888$). During the application of Turmerie colour the

brightness L^* is not changed, on the other hand this parameter decreased with an increasing content of red colour carmina. By this fact the total colour difference is influenced.

The last topic of our research was to compare the colour of mixtures of yoghurts with standard coloured fruit preparations. The results showed that the lowest yellow parameter b^* was received for yoghurt with pineapple. The most intensive yellow colour was received for yoghurt with apricots. The red fruit preparations mixtures with yoghurts exhibit the various colour intesity. The lowest intensity was shown for forest strawberry nr. 1 and for sour cherries. The corresponding tendency can be observed for total colour difference ΔE (Fig. 8). Here we can see that the yellow types of fruit exhibit only a slightly lower difference than red types of fruits. We can conclude that the yoghurts with the same colour-type of fruit exhibit nearly the same colour intensity.

Kontaktní adresa:

Ing. Ludmila Prokůpková, Výzkumný ústav protravinářský Praha
Radiová 7, 102 31 Praha 10, Česká republika
Tel.: + 420 2 702 331, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp_anet.cz

Potrav. Vědy, *15*, 1997 (5) : 391–402

STANOVENÍ PEVNOSTI GELU OBNOVENÝCH TEPELNĚ OPRACOVANÝCH SUŠENÝCH VAJEČNÝCH BÍLKŮ

Determination of Gel Strength in Reconstituted Hot Roomed Dried Egg Whites

Karel KÝHOS, Jan STROHALM, Pavla NOVOTNÁ, Milan HOUŠKA, [1]*Miloš ŠTĚPÁN*

Food Research Institute Prague, Prague, [1]*Deltafoods, Hradec Králové, Czech Republic*

Abstract: The paper deals with development of a method of determining the gel strength in reconstituted hot roomed dried egg whites. A universal apparatus Instron 1140 with a penetrating shaft of cylindrical shape was used. The effects of gel temperature, deformation rate, pressure during gel cooking and cooling rate were studied. Comparison of gel strengths measured on another apparatus showed a good agreement with the results obtained in our experiment. The modulus of gel elasticity is growing with the time of tempering the egg white in powder form. The curves of various samples show a large scatter. There is a very close correlation between gel strength and its modulus of elasticity. This fact makes it possible to develop a nondestructive method of egg white strength measuring. Deformation at gel rupture was examined. This variable is not related to gel strength.

egg white; hot rooming; gel strength

Abstrakt: K měření pevnosti gelu obnovených tepelně opracovaných sušených vaječných bílků byl použit univerzální přístoj Instron 1140 s vnikacím tělískem válcového tvaru. Byl studován vliv teploty měřeného gelu, rychlosti deformace, tlaku při tepelné koagulaci a rychlosti chlazení. Porovnání pevností gelu měřených na zahraničním přístroji ukázalo dobrou shodu s námi získanými výsledky. Modul pružnosti gelu roste s dobou tepelného působení na bílek v práškovém stavu. V průběhu různých vzorků je značný rozptyl. Mezi pevností gelu a jeho modulem pružnosti existuje velmi těsná korelace. To dává možnost vyvinout nedestruktivní metodu sledování pevnosti bílků. Byla sledována deformace při prasknutí gelu, která je nezávislá na pevnosti gelu.

bílek; tepelné ošetření; pevnost gelu

Sušené vaječné bílky jsou velmi cennou přídavnou složkou potravin, protože obsahují důležité komponenty z hlediska výživy a mohou přispět i k ovlivnění konzistence konečného výrobku. Technologie jejich výroby je náročná, neboť je vzhledem k jejich termolabilnímu chování nelze dokonale pasterovat. Úchova se provádí sušením, následným tepelným ošetřením a skladováním za vysoké teploty v práškovém stavu (Cotterill et al., 1974; Mulder, Bolder, 1988; Northolt et al. 1978).

Tento proces má za následek jednak inaktivaci možné přežívající mikroflory, jednak změny technologických vlastností bílkoviny po obnovení (Kato et al., 1990). Jednou z technologických vlastností obnovených bílků je i pevnost gelu vzniklého tepelnou koagulací. Pro měření pevnosti gelu existuje řada metod. Přehled nejrůznějších metod pro měření vlastností gelů vzniklých při enzymatické koagulaci mléka uvádějí Havlíček et al. (1981). Nedestruktivní metodu pro sledování růstu tuhosti gelu mléčné sraženiny vyvinuli Celba et al. (1984). Měření pevnosti gelů vzniklých záhřevem vaječných bílků popisuje i firemní literatura (Taiyo Kagaku Co., Ltd, 1988).

U nás se výrobou sušených vaječných bílků zabývá firma Delta foods, Hradec Králové. Na základě dohody o spolupráci bylo umožněno zavést objektivní měření pevnosti gelu těchto materiálů jako modelový případ aplikace výsledků výzkumu fyzikálních metod v praxi.

Cílem této práce byl vývoj metody měření pevnosti gelu včetně mapování různých vlivů na tento parametr a ověření dosažených výsledků s výsledky zahraniční laboratoře.

MATERIÁL A METODY

Pracovní potřeby a přístroje

Skleněná kádinka o objemu 600 ml (hmotnost kádinky max. 180 g); skleněný odměrný válec do 250 ml; skleněná tyčinka s kulatými konci (délka 250 mm, průměr 8–10 mm).

Laboratorní váhy s rozsahem 0–200 g (přesnost 0,01 g) METTLER-AE 200

Olejová nebo vodní vývěva s podtlakem –0,93 barů.

Skleněný exikátor s otvorem pro odvod vzduchu, opatřený kohoutem.

Teploměr s rozsahem 0–100 °C THERM 2230-1 s čidlem PT-100.

Vodní lázeň pro teplotu 20C (min. rozměry 300 x 300 x 300 mm).

Vodní lázeň s termostatem pro teplotu 90 °C (nejlépe kovový válec o průměru min 200 mm, hloubka 400 mm), příkon termostatu MLW-4-UH s vyrobenou válcovou nádobou podle udaných rozměrů min. 2000 W.

CULEN – plastové střívko (PA materiál) průměr 32 mm (Cutisin a. s., Slavkov).

Měřicí přístroj na stanovení pevnosti materiálů: INSTRON-1140 s tenzometrickým čidlem 0–5 N, dřík o průměru 7,94 mm (rozměry na obr. 1) s vyhodnocovací jednotkou HEWLETT-PACKARD 85 B.

Silonový provaz pro podvázání umělohmotného střívka, nůžky se špičatým koncem a dlouhý ostrý kuchyňský nůž (dortový).

Charakteristika tepelně opracovaného sušeného vaječného bílku

Před sušením se bílek nepasteruje, protože pasterační teplota může být max. 56,5 °C. Také se nepoužívá okyselení a odcukření bílku.

Pracovní postup

Příprava 10% roztoku ze sušeného vaječného bílku: S přesností 0,05 g navážíme 20 g vzorku sušených bílků přímo do 600ml kádinek.

Do odměrného válce (250 ml vzhledem k přesnosti) odměříme 180 ml převařené destilované vody. Vodu převáříme, abychom odstranili zbylé uhličitany, které mohou ovlivnit koagulaci bílkovin.

Do naváženého prášku přidáme z odměřených 180 ml cca 20 ml destilované vody. Směs opatrně třeme skleněnou tyčinkou na kaši. V husté směsi nesmí zůstat nerozpuštěné kousky.

Po dokonalém rozpuštění (utření) bílkovin dolijeme zbylou vodu z odměrného válce. Skleněnou tyčinkou za stálého míchání dokonale rozpustíme utřené bílkoviny. Nalepené bílkoviny na tyčince se snažíme bezztrátově rozpustit v roztoku. Takto připravený roztok necháme stát min. 20 min.

Po vyčeření roztoku přeneseme kádinku do exikátoru a připojíme k olejové vývěvě. Podtlak vytváříme postupně. Při –0,85 až 0,93 barech začne pěna prudce stoupat. V této fázi musíme vývěvu rychle odpojit uzavřením kohoutu na exikátoru a 30 s opatrně vpouštíme do exikátoru vzduch. Při práci postupujeme opatrně. Při prudším vpuštění vzduchu se může roztok rozstříknout a znehodnotit.

Po ukončení vakuování odebereme vysráženou pěnu z hladiny nejlépe pomocí polévkové lžíce.

U vyčištěného roztoku změříme pomocí pH papírků PHAN hodnoty pH s citlivostí od 5,2–6,7 a 6,6–8,1. Dobrý roztok by měl mít pH 6,3–7,8. Je-li pH mimo tento rozsah, vzorek dále neanalyzujeme.

Plnění roztoku do plastových střívek CULEN

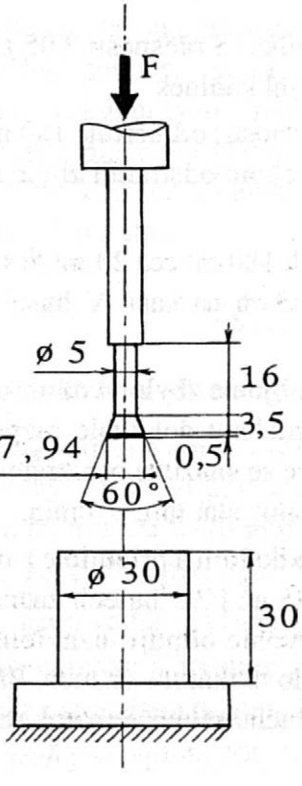
Připravíme si plastové střívko CULEN o průměru 32 mm. Spodní konec pevně podvážeme a odstřihneme na délku cca 250 mm. Do střívka vložíme na spodní konec cca 10g olověné závaží. K popisování čísel pro označení vzorku můžeme použít lihový popisovač. Do střívka nalijeme celý obsah kádinky a zavážeme jeho druhý konec. Ponecháme si přitom na provaze alespoň 10cm oko, za které střívko se vzorkem zavěsíme do vodní lázně.

Tepelná úprava roztoku vaječného bílku (koagulace)

Trubici s roztokem vložíme na 30 min do vodní lázně o teplotě 90 °C. Poté přeneseme zkoagulovaný gel vaječného bílku do vodní lázně o teplotě 20 °C a provedeme vychlazení po dobu min. 25 min. U takto připraveného vzorku můžeme měřit pevnost gelu.

Měření na přístroji INSTRON

Vzorek vyjmeme z chladící lázně. Na rovné ploše oddělíme ostrým nožem (rovný řez) horní okraj (2–3 cm). Z ostatní části vzorku nařežeme tři stejné kusy po 30 mm, na nichž provádíme vlastní měření pevnosti. Sloupneme obal a postavíme váleček na měřicí přístroj Instron pod měřicí sondu, kterou potřeme silikonovým olejem. Po spuštění měření klesá sonda dolů, tlačí na váleček, který po určité době uvnitř prask-



1. Detail použité geometrie pro měření pevnosti bílků – A detail view of the geometry used for egg

ne. V tom okamžiku sonda naměří maximální sílu působení tenzometrického čidla na vzorek. Na obrazovce se vykreslí graf závislosti působící síly *F* na *D* (*D* je poměr vzdálenosti, kterou sonda urazí ve válečku a výšky válečku – v %). Při prasknutí se na grafu objeví maximum. Z každého vzorku získáme tři měření. Všechny naměřené hodnoty se snímají, zapisují do souborů a ukládají na disketu.

Výpočet a vyhodnocení naměřených dat

Po naměření stlačovacích křivek se provedlo vyhodnocení naměřených průběhů pomocí speciálního programu CTEPE1, který provede načtení dat a nalezne maximální sílu a počáteční lineární část. V této části proloží přímku a určí její směrnici tg α. Takto se určí veličiny ze všech opakovaných měření a z vypočtených hodnot se určí průměrná hodnota a směrodatná odchylka (průměr minimálně ze tří vzorků).

Střední hodnota maximální síly byla přepočtena na pevnost gelu podle vztahu:

$$GS = \frac{F_{max}/g}{S} \qquad [1]$$

tak, aby výsledná hodnota byla v jednotkách g/cm^2. Proto je plocha průřezu dříku *S* dosazována v cm^2 (plocha činila 0,495 cm^2).

Modul pružnosti byl určen ze směrnice přímkové části závislosti *F–D* podle vztahu:

$$E_{ef} = \frac{tg\,\alpha\,.\,100}{H\,.\,d} \qquad [2]$$

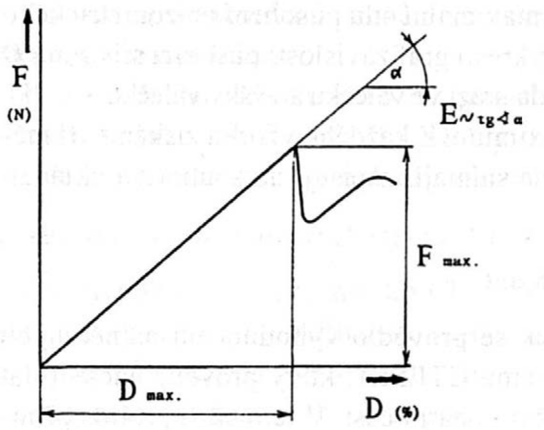
kde: *H* – počáteční výška vzorku

d – průměr penetračního dříku

VÝSLEDKY A DISKUSE

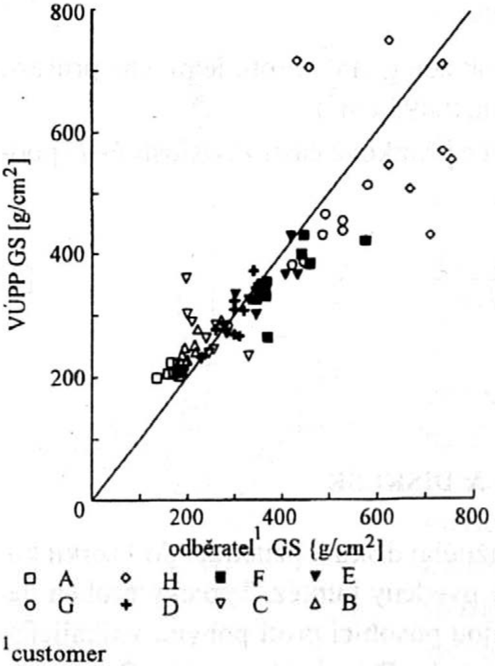
Na obr. 1 jsou uvedeny rozměry použitého dříku k penetraci do vzorku koagulovaného bílku, jeho rozměry jsou uvedeny tamtéž. Typický průběh deformační křivky, tj. závislosti mezi silou působící proti pohybu vnikajícího dříku a relativní deformací měřeného vzorku D je uveden na obr. 2.

Na obr. 3 je znázorněno srovnání pevností gelu GS naměřených na všech vzorcích na přístroji Instron (VÚPP) a na gelometru zahraniční firmy (zde

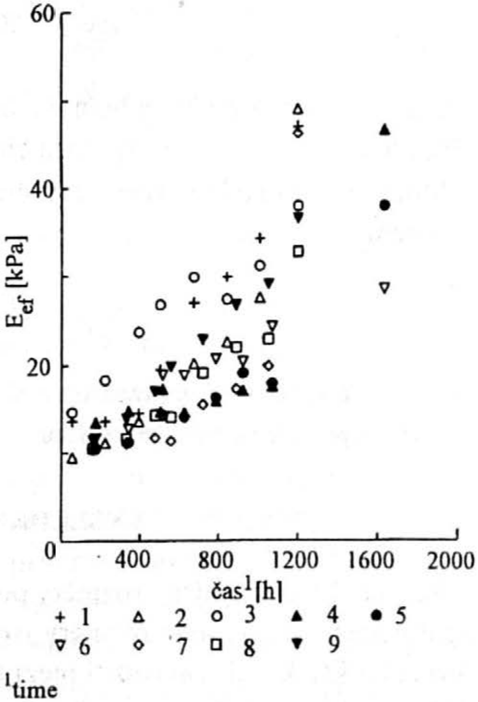


2. Typický průběh síly při penetračním měření pevnosti bílků – A typical compression curve of penetration measurings of the egg white strength

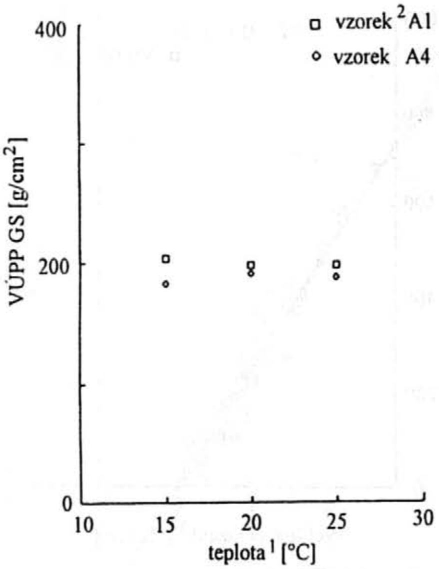
byl použit dřík o průměru 5 mm). Výsledné hodnoty se liší cca o 20 %, avšak střední hodnota všech měření leží prakticky na úhlopříčce. Poněkud větší rozptyl vykazují hodnoty pro odběr H, což může být způsobeno nehomogenitou a tedy chybou při odběru vzorků. Tato shoda dává oprávnění předpoklá-



3. Korelace VÚPP a odběratel (bílky, dřík 7,94 mm) – FRIP and customer correlation (egg whites, shaft 7.94 mm)

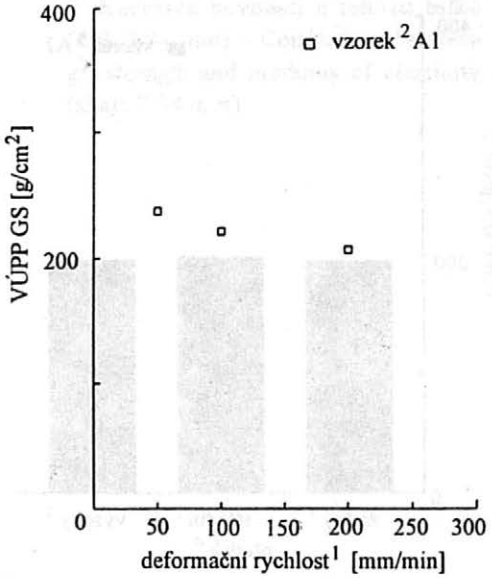


4. Časová závislost efektivního modulu pružnosti (dřík 7,94 mm) – Time curve of the efficient modulus of elasticity (shaft 7.94 mm)



[1]temperature; [2]sample

5. Vliv teploty měření (dřík 7,94 mm) – The effect of measuring temperature (shaft 7.94 mm)



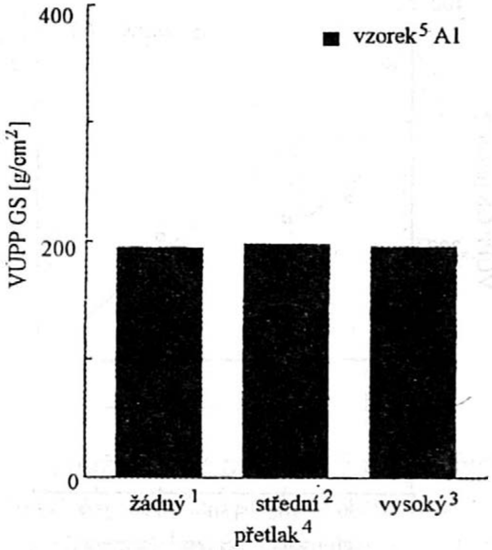
[1]deformation rate; [2]sample

6. Vliv rychlosti deformace (dřík 5 mm) – The effect of deformation rate (shaft 5 mm)

dat, že vliv průměru dříku na naměřené pevnosti gelu je v daném rozsahu ještě zanedbatelný (při dalším zvětšování průměru dříku to nelze očekávat).

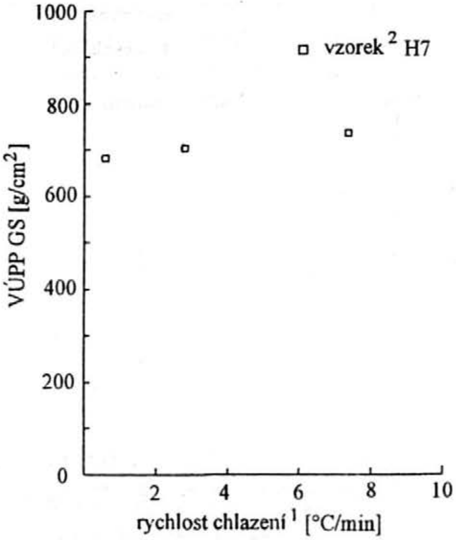
Na obr. 4 je uveden průběh efektivního modulu pružnosti gelu na čase, který v podstatě kopíruje průběhy pevnosti gelu měřené ve VÚPP. Tato shoda je potvrzena vzájemnou korelací (obr. 9). Koeficient korelace dosáhl velmi vysoké hodnoty 0,978. Modul pružnosti má proti pevnosti gelu výhodu v tom, že k jeho stanovení není nutné gel rozbít. Je třeba pouze šetrně stlačit gel cca na 10 % původní výšky. Hodnoty mezní deformace, při které dochází k praskání gelu, jsou u různě pevných gelů různé. Tyto maximální deformace při prasknutí gelu byly rovněž zaznamenávány, avšak nejsou v této práci tabelárně uvedeny. Hodnoty mezních deformací jsou jako funkce pevnosti gelu zobrazeny na obr. 10. Jde o měření provedená ve VÚPP, neboť na přístroji odběratele lze stanovit tuto veličinu jen obtížně. Z obrázku je patrné, že mezní deformace se pohybují v rozsahu cca od 25 do 45 % původní výšky vzorku a že jsou nezávislé na pevnosti gelu.

Kromě těchto výsledných parametrů jsme se zabývali různými hypotetickými vlivy na dosahovanou pevnost gelu. Na obr. 5 je uvedena závislost pev-



[1]none; [2]midle; [3]hight; [4]overpressure; [5]sample

7. Vliv tlaku při vaření (dřík 7,94 mm, teplota 20 °C) – The effect of pressure during cooking (dřík 7.94 mm, measuring temperature 20 °C)



[1]cooling rate; [2]sample

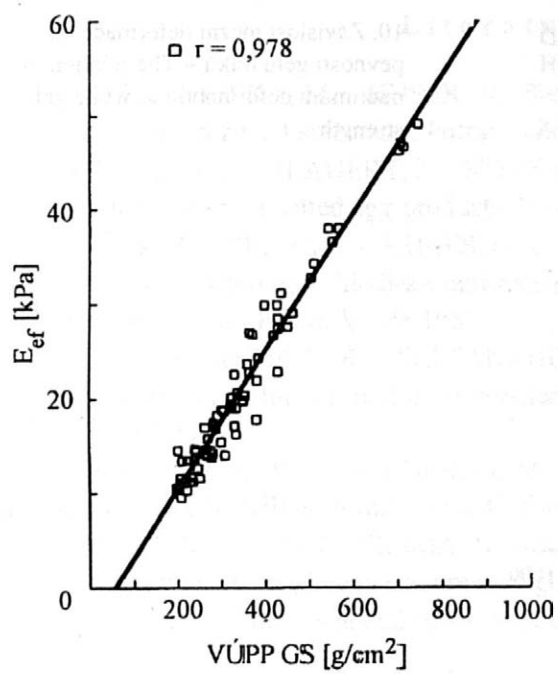
8. Vliv rychlosti chlazení na pevnost gelu (dřík 7.94 mm) – The effect of cooling rate on gel strength, FIRI, shaft 7.94 mm

nosti gelu na teplotě měření. Gely byly připraveny zcela shodně a vliv teploty měření byl prakticky zanedbatelný.

Statistickými testy s využitím standardních odchylek a kritických hodnot Studentova rozdělení bylo prokázáno, že jde v tomto rozsahu teplot o vliv zanedbatelný.

Vliv rychlosti deformace již zanedbatelný není, jak je patrné z obr. 6. Přesto při průkazu statistické významnosti jsme dospěli k závěru, že i tento vliv je na dané přesnosti nevýznamný (toto měření bylo provedeno ve VÚPP s původní velikostí dříku 5 mm).

Dalším suspektním parametrem, který jsme prověřili, byl tlak v obalu při koagulaci bílku. Koagulace byla uskutečněna jednak se zcela otevřeným obalem bez přetlaku a jednak s různě pevně podvázanými obaly (není znám přesný přetlak, proto jen kvalitativní vyjádření). Jak je patrné z obr. 7, ani tento parametr nemá na pevnost výsledného gelu žádný podstatný vliv.



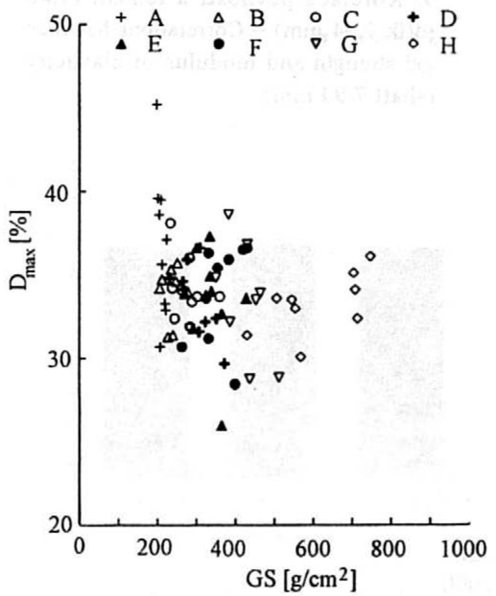
9. Korelace pevnosti a tuhosti bílků (dřík 7,94 mm) – Correlations between gel strength and modulus of elasticity (shaft 7.94 mm)

Na obr. 8 je uveden vliv posledního zkoumaného technologického parametru, a tím je rychlost chlazení gelu z koagulační teploty na teplotu 20 °C. Jde o průměrnou rychlost chlazení ve středu vzniklého gelu měřenou za podmínek jednak chlazení na vzduchu (minimální rychlost), jednak v lázni o teplotě 20 °C bez pohybu (standartní podmínky) a jednak za podmínky intenzivního sprchování vodovodní vodou o teplotě 8 °C a následné temperaci na teplotu měření 20 °C. Jak je z obrázku patrné, ani rychlost chlazení nemá ve zkoumaném rozsahu patrný podstatný vliv na naměřené pevnosti gelu.

Metodika byla použita k průběžnému měření kvality bílků v průběhu pasterace v suchém stavu.

Závěry

Byla nalezena spolehlivá metoda měření pevnosti gelu tepelně koagulovaných za suchého stavu vysokoteplotně pasterovaných obnovených vaječných bílků. Vliv teploty gelu při měření pevnosti v rozsahu 15 až 25 °C, vliv rychlosti chlazení ve zkoumaném rozsahu parametrů a vliv přetlaku při koagulaci ve střívkovém obalu jsou zanedbatelné. Vliv rychlosti deformace je mírný, avšak statisticky nevýznamný. S rostoucí rychlostí deformace naměřená pev-



10. Závislost mezní deformace na pevnosti gelu bílků – The relation of maximum deformation to white gel strength

nost gelu mírně klesá. Zdánlivý modul pružnosti gelu koreluje velmi přesně s pevností gelu.

Bylo dosaženo velmi dobré shody výsledků měření získaných na přístroji Instron s výsledky naměřenými na údajně stejných vzorcích měřidlem pevnosti gelu u zahraničního odběratele.

Seznam symbolů

d	koncový průměr dříku vnikajícího do gelu	[m]
D	relativní deformace (dráha dříku od doteku se vzorkem dělená původní výškou vzorku krát 100)	[%]
E_{ef}	zdánlivý modul pružnosti gelu	[Pa]
F	síla	[N]
g	tíhové zrychlení	[m/s^2]
GS	pevnost gelu	[g/cm^2, N/m^2]
H	původní výška vrstvy gelu	[m[
t	teplota	[°C]
α	úhel sklonu přímkové části kompresní křivky	[°]

Literatura

CELBA, J. – HOUŠKA, M. – HUŠEK, V.: Sledování průběhu koagulace mléka měřením modulu pružnosti sraženiny. Potrav. Vědy, *2*, 1984: 253–263.
COTTERILL, O. J. – GLAUERT, J. – STEINHOFF, S. E. – BALDWIN, R. E.: Hot-pack pasteurization of salted egg products. Poultry Sci., *53*, 1974: 636–645.
HAVLÍČEK, Z. – CELBA, J. – KUBEŠOVÁ, A. – HOUŠKA, M.: Reologické a texturní vlastnosti potravin z hlediska optimalizace rozhodujících výrobních procesů. [Výzkumná zpráva.] Praha, VÚPP 1981.
KATO, A. – IBRAHIM, H. R. – WATANABE, H. – HONMA, K. – KOBAYASHI, K.: Structural and gelling properties of dry-heating egg white. J. Agric. Food Chem., *38*, 1990: 32–37.
MULDER, R. W. A. W. – BOLDER, N. M.: Removal of glucose from egg white products by Lactobacillus strains. Arch. Gefluegelkunde, *52*, 1988: 251–254.
NORTHOLT, M. D. – WIEGERSMA, N. – SCHOTHORST, M. van: Pasteurization of dried egg white by high temperature storage. J. Food Technol., *13* 1978: 25–30.
Taiyo Kagaku Co. Ltd: Technical Bulletin. Method of Gel Strength, 1988.

Došlo 17. 6. 1997

Summary

This paper deals with development of a method of measuring the gel strength of the reconstituted hot roomed dried egg white. The Instron 1140 with a penetrating shaft of cylindrical shape was used (Fig. 1). The maximum force was recalculated by using the surface of the shaft to the gel strength. The elasticity modulus and maximum deformation at rupture were also determined. A typical compression curve is shown in Fig. 2. Various parameters potentially influencing the gel strength of egg white were studied. The influence of gel temperaturel during measurement on its gel strength is shown in Fig. 5. The influence of deformation rate on the gel strength is apparent from Fig. 6. Fig. 7 shows the influence of pressure during cooking of the gel on the gel strength. Fig. 8 shows the influence of the cooling rate of the gel after cooking on the gel strength. All the parameters studied had no statistically important influence on the gel strength of egg white. The substantial influence on the elasticity modulus of the gels is exerted by the time of tempering. There is a great scatter between various samples of the gel (Fig. 4). Fig. 3 shows the good correlation of the standard gel strength measured by a customer on a special instrument determined for measuring the gel strength of cooked egg white and our results. Fig. 9 shows the very good correlation between gel strength and modulus of elasti-

city. This correlation enables to develop the nondestructive method of measurement of the gel strength by using the gentle compression and evaluation of the elasticity modulus. Fig. 10 shows the maximum deformation measured at rupture of gels on the gel strength. There is no apparent correlation between those variables.

Kontaktní adresa:

Karel Kýhos, Výzkumný ústav potravinářský Praha
Radiová 7, 102 00 Praha 10, Česká republika
Tel.: + 420 2 702 331, fax: + 420 2 701 983, e-mail: vupp@vupp.anet.cz

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Profesor Stanislav G a j d ů š e k šedesátiletý

Prof. Ing. Stanislav G a j d ů š e k, DrSc. (narozen 6. října 1937 v Kroměříži) je předním mlékařským odborníkem, uznávaným nejen u nás, ale i v zahraničí. Je profesorem mlékařství na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně a tedy důstojným pokračovatelem věhlasných profesorů mlékařství na této vysoké škole Josefa Prokše a Františka Šebely.

Oboru mlékařství se jubilant upsal na celý život již tím, že se přihlásil ke studiu na Střední průmyslové škole mlékárenské v Kroměříži v roce 1952. Po maturitě v roce 1956 byl přijat ke studiu na Vysoké škole chemicko-technologické. V roce 1961 úspěšně dokončil studium na specializaci technologie mléka a tuků a získal titul inženýra chemie.

Kratší dobu působil jako učitel na mlékárenské průmyslovce v Kroměříži, poté jako technolog v Jihočeských mlékárnách a dále jako odborný asistent na Vysoké škole zemědělské v Českých Budějovicích. Brzy se však definitivně usadil v Brně a přešel na Ústav laktologie Agronomické fakulty Vysoké školy zemědělské (nynější MZLU). V roce 1969 dokončil pod vedením prof. Šebely vědeckou přípravu, obhájil kandidátskou disertaci o studiu bílkovin v mléce a získal vědeckou hodnost kandidáta věd v oboru speciální zootechnika – mlékařství. V roce 1978 obhájil habilitační práci o vlastnostech syřidel, čímž se habilitoval pro obor technologie živočišných produktů a byl jmenován a ustanoven docentem. V roce 1990 obhájil doktorskou disertaci „Složení a vlastnosti kravského mléka ve vztahu k jeho průmyslovému zpracování" a získal vědeckou hodnost doktora věd v oboru zemědělsko-lesnických věd. Vysokoškolským profesorem pro obor mlékařství byl jmenován v roce 1993.

Prof. Gajdůšek se věnuje mlékařství již úctyhodných 45 let. Za tuto dobu ovládl dokonale nejen technologii mléka jako svůj základní obor, ale i mnohé další obory s mlékařstvím těsně nebo vzdáleněji související. Je uznáván šlechtiteli i chovateli skotu, je respektován odborníky ve výživě a krmení skotu, ale i veterinárními lékaři, poněvadž zná velmi podrobně dopady výživy dojnic i jejich zdravotního stavu na složení a vlastnosti mléka. Ovládl techniku získávání, ošetřování a zpracování mléka. Rozumí mikrobům jako užitečným spolupracovníkům v technologii mléka, ale i jako nebezpečným nepřátelům pro technologii i pro lidské zdraví. Dovede přesvědčivě obhajovat pozici mléka a mléčných výrobků v lidské výživě. Pro uvedené znalosti, ale i pro jednoznačnost, výstižnost a srozumitelnost svých přednášek je velmi často zván na semináře a konference pořádané zemědělci, potravináři i humánními a veterinárními lékaři.

Prof. Gajdůšek má široký rozsah působnosti na brněnské Mendelově univerzitě. Je vedoucím Ústavu technologie potravin a členem vědecké rady Agronomické fakulty. Spolupodílel se na znovuzřízení studijního oboru Technologie potravin na Agronomické fakultě MZLU a je pověřen garancí za další rozvoj tohoto studijního oboru. Je členem Akademického senátu Agronomické fakulty, členem oborové rady postgraduálního studia Vlastnosti a zpracování zemědělských materiálů a produktů a školitelem doktorandů v tomto vědním oboru.

Bohaté jsou i jeho aktivity mimo vysokou školu. Je předsedou komise A pro hygienu a prvovýrobu mléka Národního komitétu Mezinárodní mlékařské federace (IDF), členem vědecké rady Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně, vědecké rady Fakulty EOS Vysoké vojenské školy ve Vyškově, oborové rady Ekonomika hygiena výživy Vysoké vojenské školy ve Vyškově a Poradního sboru Střední průmyslové školy mlékárenské v Kroměříži. Externě vyučuje v bakalářském studiu Výživa člověka na lékařské fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Bohatá je i publikační činnost prof. Gajdůška. Je autorem nebo spoluautorem asi 250 vědeckých a odborných prací, 16 titulů vysokoškolských skript, 4 patentů a 21 zlepšovacích návrhů. Přednesl na 150 sdělení na mezinárodních i národních kongresech, sympoziích, konferencích a seminářích. Je řešitelem 17 výzkumných úkolů a grantových projektů.

Své studenty, diplomanty a doktorandy vede k důkladnému poznání teoretických disciplin potřebných pro vlastní obor a současně je orientuje na dokonalé poznání jednotlivých úseků mlékařství v potravinářské i zemědělské praxi.

Za všechny spolupracovníky a přátele jubilanta srdečně blahopřeji váženému kolegovi Stanislavu Gajdůškovi k jeho šedesátým narozeninám a upřímně mu přeji dobré zdraví, další úspěchy, životní optimismus a hodně osobního štěstí a spokojenosti.

Prof. Ing. Ivo Ingr, 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.

Manuscript should be typed with a wide margin, double spaced on standard A4 paper. Articles on **floppy disks** are particularly welcome. Please indicate the editor programme used.

Text

Full research manuscript should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, a short review of literature (without "Introduction" subtitle), Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Legends to figures. A title page must contain the title, the complete name(s) of the author(s), the name and address of the institution where the work was done, and the telephone, fax and e-mail numbers of the corresponding author. The Abstract shall not exceed 120 words. It shall be written in full sentences and should comprise base numerical data including statistical data. As a rule, it should not give an exhaustive review of literature. In the chapter Materials and Methods, the description of experimental procedures should be sufficient to allow replication of trials. Organisms must be identified by scientific name. Abbreviations should be used if necessary. Full description of abbreviation should follow the first use of an abbreviation. The International System of Units (SI) and their abbreviations should be used. Results should be presented with clarity and precision. Discussion should interpret the results. It is possible to combine Results and Discussion in one section. References in the text to citations comprise the author's name and year of publication. If there are more than two authors, only the first one should be named in the text, followed by the phrase "et al.". References should include only publications quoted in the text. They should be listed in alphabetical order under the first author's name, citing all authors, full title of an article, abbreviation of the periodical, volume number, year, first and last page numbers.

Tables and Figures

Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes. Figures should be referred solely to the material essential for documentation and for the understandig of the text. Duplicated documentation of data in figures and tables is not acceptable. All illustrative material must be of publishing quality. Figures cannot be redrawn by the publisher. All figures should be numbered. Photographs should exhibit high contrast. Both line drawings and photographs are referred to as figures. Each figure should contain a concise, descriptive legend.

Offprints: Forty offprints of each paper are supplied free of charge to the author.

Authors have full responsibility for the contents of their papers. 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.

OBSAH - CONTENTS

Prošková A., Gottvaldová M., Kučera J.: Preparation and characterisation of a dextran-lysozyme conjugate – Příprava a charakterizace konjugátu dextran-lysozym 321

Mayer Z., Houška M.: Initial freezing point vs. composition of fruits – Počáteční bod tuhnutí a složení ovoce 329

Holasová M.: Distribution of tocopherols and tocotrienols in the main products of wheat and rye milling – Distribuce tokoferolů a tokotrienolů v hlavních produktech mletí pšenice a žita 343

Kmínková M., Moučka Z., Kučera J.: Isolation and characterisation of the proteolytic enzymes of carp hepatopancreas – Izolace a charakterizace proteolytických enzymů v hepatopankreatu kapra 351

Bohačenko I., Veselý Z., Homolka P.: Aflatoxins in feed, the possibilities of feed detoxification and its influence on nutritive value – Aflatoxiny v krmivech, možnosti detoxikace a její vliv na nutriční hodnotu 363

Prokůpková L., Novotná P.: Barva ovocných jogurtů – Colour of fruit yoghurts 375

Kýhos K., Strohalm J., Novotná P., Houška M., Štěpán M.: Stanovení pevnosti gelu obnovených tepelně opracovaných sušených vaječných bílků – Determination of gel strength in reconstituted hot roomed dried egg whites. 391

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Ingr I.: Profesor Stanislav Gajdůšek šedesátiletý 403

Vědecký časopis POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY ◆ Vydává Česká akademie zemědělských věd – Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha ◆ Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/242 579 39, fax: 02/242 539 38, e-mail: fofo@uzpi.cz ◆ Sazba: RNDr. Marcela Braunová, Nad Palatou 54, 150 00 Praha 5 ◆ Tisk: ÚZPI Praha
◆ © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997

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