

CZECH ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Czech Journal of
FOOD SCIENCES

Potravinářské vědy

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

5

VOLUME 17
October 1999
ISSN 1212-1800

Czech Journal of Food Sciences

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

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

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

EDITORIAL BOARD – REDAKČNÍ RADA

J. VELÍŠEK (Praha, Czech Republic) – Chairman

M. BRAUNOVÁ (Editor-in-Chief)

W. BALTES (Berlin, Germany)

R. BATTAGLIA (Zurich, Switzerland)

L. BENEŠOVÁ (Praha, Czech Republic)

D. ČURDA (Praha, Czech Republic)

J. DAVÍDEK (Praha, Czech Republic)

J. DRBOHLAV (Praha, Czech Republic)

S. GROSOVÁ (Praha, Czech Republic)

M. HOLASOVÁ (Praha, Czech Republic)

J. HOUŠOVÁ (Praha, Czech Republic)

I. INGR (Brno, Czech Republic)

M. KOVÁČ (Bratislava, Slovak Republic)

H. KOZLOWSKA (Olsztyn, Poland)

R. LÁSZTITY (Budapest, Hungary)

W. PFANNHAUSER (Graz, Austria)

J. POKORNÝ (Praha, Czech Republic)

A. PRÍBELA (Bratislava, Slovak Republic)

M. RYCHTERA (Praha, Czech Republic)

Z. ŠIMŮNEK (Praha, Czech Republic)

M. TAKÁCSOVÁ (Bratislava, Slovak Republic)

B. TUREK (Praha, Czech Republic)

Aim and scope: The journal publishes original scientific papers, preliminary reports, short communications and reviews. Paper are published in English, Czech, or in Slovak.

Periodicity: The journal is published six times a year. Volume 17 appearing in 1999.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, Editor-in-Chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: + 420 2 22 52 04 11, fax: + 420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@uzpi.cz. Both the dates of the reception of the manuscript and of the acceptance by the editorial board for publishing will be indicated in the printed contribution.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address. Subscription price for 1999 is 92 USD (Europe) and 97 USD (overseas).

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce, předběžná a krátká sdělení a odborná review. Práce jsou publikovány v angličtině, češtině nebo ve slovenštině.

Periodicita: Časopis vychází šestkrát ročně. Ročník 17 vychází v roce 1999.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou kopiích je třeba zaslat na adresu redakce: RNDr. Marcela Braunová, vedoucí redaktor-ka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/22 52 04 11, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@uzpi.cz. V uveřejněném příspěvku se uvádí jak datum doručení rukopisu do redakce, tak i jeho přijetí redakční radou k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány na celý rok na adrese: Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1999 je 372 Kč.

Actual information are available at URL address: <http://www.uzpi.cz>

Aktuální informace najdete na URL adrese: <http://www.uzpi.cz>

Enzymatic Hydrolysis of Protein Wastes from Carp (*Cyprinus carpio*) Processing and the Separation of Hydrophobic Peptides*

ALEXANDRA PROŠKOVÁ, JIŘÍ KUČERA and FRANTIŠEK VÁCHA

Food Research Institute Prague, Prague; Research Institute of Fishing and Hydrobiology of the South-Bohemian University, Faculty of Agriculture, České Budejovice, Czech Republic

Abstract

PROŠKOVÁ A., KUČERA J., VÁCHA F. (1999): Enzymatic hydrolysis of protein wastes from carp (*Cyprinus carpio*) processing and the separation of hydrophobic peptides. Czech J. Food Sci., 17: 161–165.

Fish meat of carp (*Cyprinus carpio*), eel (*Anguilla vulgaris*), trout (*Salmo gairdneri*), pike (*Esox lucius*), tench (*Tinca vulgaris*), white bream (*Blicca bjoerkna*), perch (*Perca fluviatilis*), *Scardinius erythrophthalmus*, and *Leuciscus rutilus*, was hydrolyzed with the use of proteolytic enzymes. Carp meat hydrolyzate was studied in greater detail. The yield of the process was optimized with the aim to get low-molecular-weight products. The peptides obtained in this way were tested for ACE (Angiotensin Converting Enzyme) inhibitory activity. Finally the ACE inhibiting peptides were separated by chromatography on high basic anion exchanger and by hydrophobic chromatography on phenyl-Superose (Pharmacia Biotech.). Histidine containing peptides, known as an efficient remedy for gastric ulcer treatment, were separated by IMAC (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography) on IDA-Cu agarose (Imino-Di-Acetyl – substituted agarose saturated with cupric ion). The separation of ACE inhibiting peptides by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-Superose was successful and the highly active peptides were obtained. IMAC on cupric ions does not separate the His-peptides, but separates all low-molecular weight peptides on the account of terminal amino groups. The method developed is believed to be useful for the laboratory scale preparation of ACE inhibiting peptides.

Key words: freshwater; fish; waste processing; enzymatic hydrolysis; ACE inhibition; peptides; hydrophobic interaction chromatography

Fish are a food with high nutritional value. Fish meat contains proteins with almost ideal amino acid composition and fat that contains a high concentration of favorable ω -3-polyunsaturated fatty acids (BLACKMORE *et al.* 1995) and many other beneficial components (e.g., MATILA *et al.* 1995; KARAKOLTSIDIS *et al.* 1995).

Large quantities of fish are processed industrially each year and the unutilized parts, the frame with rests of meat, viscera, etc., are unpleasant wastes which are easily destroyed by microorganisms. The unpleasant smell and ugly view are also the "by-products" of fish processing factories.

Protein hydrolyzates were proved to contain bioactive peptides (IMOTO *et al.* 1981) angiotensin-converting-enzyme inhibitors with hypotensive effect, or histidine containing peptides efficient in stomach ulcer treatment. Histidine containing peptides also show other activities, like their positive influence on the heart rhythm (GILL *et al.* 1990). Insulin-stimulating peptides were separated from

tryptic hydrolyzate of bovine serumalbumin by hydrophobic chromatography (UENO *et al.* 1985). The IMAC (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography) is an efficient way for separation of histidine containing peptides (HEMDAN *et al.* 1989).

We have, therefore, started a project concentrated on the hydrolysis of fish processing wastes and utilization of these by-products for the preparation of bioactive peptides.

MATERIAL AND METHODS

All fish were obtained from the Research Institute of Fishing and Hydrobiology of the South-Bohemian University, Faculty of Agriculture in České Budějovice.

Alcalase NOVO 2,4 L, type FG, serine alkaline protease, were products of of NOVO Nordisk, Copenhagen, Denmark.

Sorbents Phenyl-Superose and Superose 12 were products of Pharmacia Biotech Uppsala, Sweden, Imino-dia-

*The work was supported by the National Agency for Agricultural Research (NAZV) of the Czech Republic, grant No. EP7310.

cetyl agarose was the product of SIGMA. HEMA-BIO 1000Q was quarternized anion exchanger, product of Tessek Ltd. Prague, Czech Republic.

ACE inhibitors activity was determined according to the method of MATSUI *et al.* (1992) and calculated as the amount of material needed for 50% inhibition (IC_{50}).

The protein concentration was determined according to HARTREE (1972).

IMAC (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography) was carried out according to the method of HEMDAN *et al.* (1989).

Hydrophobic interaction chromatography was carried out principally according to the method of BELEW *et al.* (1985) in which the concentration of ammonium sulfate was optimized.

All chromatographic experiments were carried out with the use of FPLC equipment, model LCC 500, Pharmacia, Uppsala.

Amino acid composition of fish meat was determined with the use of amino acid analyzer, model AAA T 339 (Mikrotechna, Prague, Czech Republic).

RESULTS AND DISCUSSION

Amino acid composition of meat of selected fresh-water fish species was determined by standard method using amino acid analyzer model AAA T 339 (Mikrotechna, Pra-

gue, Czech Republic). The amino acid composition of such meat is summarized in Table 1. Histidine content is high in pike, perch and carp. The hydrophobic amino acids, which are present in ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme) peptide inhibitors, were found at higher concentrations in the meat of trout, carp, and perch. Sulfur-containing amino acids are present namely in perch and carp. The fish most frequently used in the Czech Republic is carp. This fish is, according to the amino acid composition, convenient for the hydrolysis to bioactive peptides as well as to peptides appropriate for further plastein synthesis with the addition of other amino acids or related compounds. We have, therefore, studied the hydrolysis of carp muscle in greater detail.

For any enzymatic hydrolysis two protocols are possible. In the first case, a larger amount of enzyme is applied at an appropriate concentration and the reaction proceeds for a shorter time. The energy expenses are shortened, but the enzyme consumption is higher. This protocol are useful namely if the enzyme is cheap and the most important expenses is the energy consumption. The second possible protocol is the use of a low dose of enzyme with the appropriate prolongation of the reaction time. In the process with the more expensive enzyme this protocol should be applied. We have tested both methods. The method A used the lower dose of enzyme (0.3% of the weight of meat) and the reaction was carried out at 50 °C

Table 1. Amino acid content of different fish meat [g/100 g DM]

Amino acid	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	Eel (<i>Anguilla vulgaris</i>)	Trout (<i>Salmo gairdneri</i>)	Pike (<i>Esox lucius</i>)	Tench (<i>Tinca vulgaris</i>)	<i>Scardinius erythro- phthalmus</i>	Perch (<i>Perca fluvialis</i>)	<i>Leuciscus rutilus</i>
Aspartic acid	6.08	5.11	5.79	6.89	5.58	5.24	8.55	6.63
Threonine	2.82	2.63	2.87	3.2	2.59	2.26	3.74	2.38
Serine	2.09	2.05	2.19	2.48	2.39	2.16	2.9	2.09
Glutamic acid	6.85	6.58	6.14	9.31	6.92	6.76	10.73	8.54
Proline	1.93	1.77	2.58	2.66	2.11	1.76	1.83	1.57
Glycine	2.66	3.03	1.94	3.18	3.04	3.08	4.16	2.48
Alanine	3.28	3.18	2.28	4.43	3.59	3.75	5.61	3.31
Valine	2.97	2.58	2.67	3.3	2.63	2.85	4.06	2.36
Methionine	2.12	1.73	1.67	2.52	1.9	2.13	3.15	2.46
Isoleucine	2.75	2.32	2.46	3.14	2.3	2.8	3.93	4.09
Leucine	4.44	3.83	4.11	5.15	4.16	4.95	7.34	4.41
Tyrosine	2.25	2.2	2.1	3.54	2.8	3.93	4.62	2.32
Phenylalanine	2.21	2.24	1.62	3.2	2.49	2.79	4.07	3.52
Histidine	2.37	2.33	2.43	2.63	2.06	1.97	2.57	2.53
Lysine	5.15	4.76	4.53	6.63	5.3	4.99	7.7	6.24
Arginine	4.46	4.16	3.82	4.49	3.77	3.11	8.48	4.23
Cysteine	0.71	0.6	0.58	0.7	0.7	0.7	0.84	0.82
Sum	55.14	51.1	49.78	67.45	54.33	55.23	84.22	59.98
Protein in DM base [%]	77.3	60.9	69.2	84.5	78.9	78.9	90.2	83.4

at pH 9.0 for 17 hours. In the method B the enzyme dose of 2% of the weight of meat was applied at the same temperature and pH and the reaction proceeded for 1 hour. The optimum time was taken from the work of MATSUI *et al.* (1993), after verification with shortened tests (lower number of experiments). The degree of hydrolysis was determined according to the amount of peptides soluble in 0.3M trichloroacetic acid. The optimum time for the method A was 15 hours, for the method B 50 minutes. Both methods give the same degree of polymerization, which need not be the same peptide composition. In the following work we have used the method B, as the enzyme used – Alcalase, is relatively cheap and produced in large quantities.

We have hydrolyzed the meat of carp, the viscera of carp, and the meat of perch (*Perca fluviatilis*) and white bream (*Blicca bjoerkna*). All the hydrolyzates were tested for ACE inhibitory activity without any purification. The results are summarized in Table 2. Data obtained by MATSUI *et al.* (1993) and inhibition activity of common antihypertensive remedy Captopril are included for comparison. Inhibitor activities are given as IC_{50} (mg protein per ml). The value means the amount of protein (in mg) necessary for 50% inhibition of the enzyme.

Table 2. ACE inhibitory activity of crude hydrolyzates of fish meat

Hydrolyzate of	Hydrolysis method	IC_{50} [mg protein/ml]
Carp meat	A	4.08
Carp meat	B	Nd
Carp viscera	B	0.81
Perch meat	B	0.91
Cejnek malý meat	B	Nd
Sardines according to MATSUI <i>et al.</i> (1993) (ID: 118)	–	0.61
Capropril	–	5.25×10^{-6}

Nd – value cannot be determined

The results shown in Table 2 indicate the IC_{50} value comparable with the hydrolyzate of sardines described elsewhere and are remarkably lower compared with the Captopril. It means that the hydrolyzate can be used as supporting aids in hypertension without any risk of overdosing. The hydrolyzate can be then used as food additives for functional food.

Hydrophobic chromatography of peptides obtained from fish meat by enzymatic hydrolysis

ACE inhibiting peptides are known to contain a large amount of hydrophobic amino acids. As such, these peptides can be easily separated with the use of hydrophobic interaction chromatography. The pH used in hydrophobic interaction chromatography is usually near the neutrality. The adsorption is promoted by high ionic strength,

for which the ammonium or potassium sulfate is used most commonly. Desorption is achieved first by the decreasing ionic strength and secondly by the elution with water solution of isopropanol up to 30% concentration or ethylene glycol up to concentration of 60%. We have applied the protocol of BELEW *et al.* (1985) with the optimization of ammonium sulfate concentration.

The column of Phenyl Superose was equilibrated with 0.05M phosphate pH 7.0 containing, after optimization of sorption/elution pattern, 1.7M ammonium sulfate. The concentration of ammonium sulfate in the sample was adjusted to the same value by addition of solid ammonium sulfate. The sample was then injected into the column. After washing the column with starting buffer the hydrophobic peptides were eluted with the same buffer without ammonium sulfate. The elution with more effective eluents, like isopropanol or ethylene glycol, was not necessary. The typical course of chromatography is shown in Fig. 1 and the IC_{50} of active fractions obtained from the

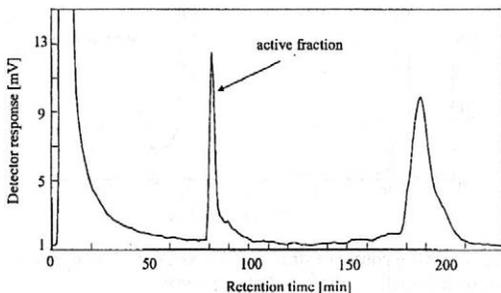


Fig. 1. Typical course of hydrophobic interaction chromatography of enzymatic hydrolyzate of carp viscera

chromatography of different hydrolyzates are summarized in Table 3. The inhibition activity for ACE increased by hydrophobic chromatography remarkably as illustrated with the lower IC_{50} value shown in Table 3.

Table 3. ACE inhibition activity of hydrolyzates purified by hydrophobic interaction chromatography

Hydrolyzate of	Hydrolysis method	IC_{50} [mg protein/ml]
Carp meat	A	0.08
Carp meat	B	0.3
Carp viscera	B	0.02
Perch meat	B	0.03
Cejnek malý meat	B	0.05

Strong anion exchanger chromatography of fish meat hydrolyzate

Some literature data show the highly acidic peptides to be also efficient ACE inhibitors (e.g., MATSUI *et al.* 1993). As the hydrophobic peptides usually are very bitter, the

acidic peptides have the advantage of pleasant taste. We have, therefore, separated the acidic peptides with the use of chromatography on highly basic anion exchanger – HEMA-BIO 1000 Q containing quarternized amino groups. The column was first equilibrated with 30mM Tris-HCl buffer pH 8.5. Then the sample of hydrolyzate in the same buffer was applied and the column was washed with the starting buffer. After elution of all the undesorbed protein, the column was eluted with the linear gradient of sodium chloride concentration (0 to 0.4M) in the same buffer. Typical course of the chromatography is shown in Fig. 2. The inhibition constant of the active fraction was one order in magnitude lower compared with that of the hydrophobic peptides, but still utilizable for preparation of functionalized food. The IC_{50} was 1.5 $\mu\text{g/ml}$.

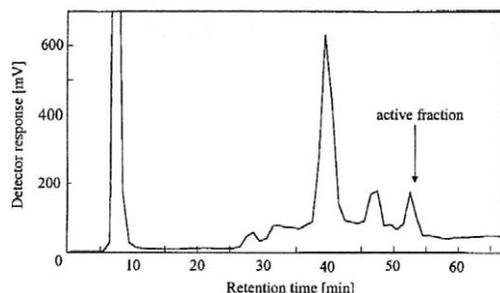


Fig. 2. Typical course of strong anion exchanger chromatography of enzymatic hydrolyzate of carp meat

Application of IMAC for histidine-containing peptides from enzymatic hydrolyzate of carp meat

Histidine-containing peptides are frequently used as supporting material for the stomach ulcer treatment. For these peptides the IMAC and IDA-Cu sorbent is the optimum way of separation. The neutral pH is used for adsorption and elution is usually achieved with decreasing pH (HUBERT & PORATH 1980). IDA-agarose column was first saturated with copper ions and then equilibrated with 50mM phosphate pH 7.5 containing 0.5M NaCl. After equilibration the sample of carp meat hydrolyzate in the starting buffer was applied and the column was washed with the same buffer. Finally, the adsorbed peptides were eluted with 50mM Tris-HCl buffer pH 3.0. Peptides obtained in this way were analyzed for the content of histidine using amino acids analyzer. No differences in relative content of histidine were detected between peptides separated by IMAC and the starting peptides. The reason is supposed to be the fact that the terminal amino group in peptides is as active as the histidine in such low molecular weight peptides. No enrichment with histidine can be achieved in this way.

Molecular weight distribution of enzymatic hydrolyzate of carp meat

The hydrolysis of carp meat using Alcalase enzyme leads to active ACE inhibitors namely after enrichment by means of hydrophobic interaction chromatography. The practical application is connected with the maximum molecular weight of peptides to be transported from digestive tract to blood stream. Therefore we have finally determined the molecular weight distribution of hydrolyzate of carp meat by gel permeation chromatography (Table 4). The higher molecular weight fraction is detected at the value approximately 9800. This agrees with usual molecular weight of polypeptides obtained by medium range hydrolysis. This fraction is not active. The ACE inhibition activity is connected with peaks at molecular weight approximately equal to 1100 and 770 Da, which signify the oligopeptides containing six to nine amino acids residues. The relative concentration of individual peaks shows that the low-molecular-weight parts account to 58% of total, which signifies the deep hydrolysis. The active part of hydrolyzate is 35% of total weight according to this determination.

Table 4. Molecular weight distribution in hydrolyzate according to gel permeation chromatography.

Component	Elution volume	Molecular weight
Cytochrom c	13.23	12 400
Vitamine B ₁₂	16.78	1 355
Cytidine	18.06	243
Carp meat hydrolyzate	13.68	9 827
	16.49	1 117
	16.97	768
	18.38	259
	19.78	87

Conclusion

The enzymatic hydrolyzate of carp meat and viscera, as well as perch and white bream (*Blicca bjoerkna*) meat shows the relatively high formation of peptides with ACE inhibitory activity. The separation of such peptide inhibitors with the application of hydrophobic interaction chromatography gives the product of practical applicability for preparation of functionalized food supporting the treatment of hypertension without any risk of overdosing. The IC_{50} of inhibitory peptides is high enough for functionalized food and low enough not to be dangerous in higher dose.

The separation of highly acidic peptides from the same hydrolyzate leads to active fraction with lower IC_{50} compared with hydrophobic peptides, but without any bitter taste. That fact could be of advantage for practical use.

IMAC does not separate the histidine rich peptides, probably for the reason of high relative concentrations of

terminal primary amino groups in such small peptides, which is at least as effective for adsorption on IMAC sorbents as the histidine-containing peptides.

The prepared hydrolyzates proved to be applicable in functionalized food and increase the utilization of some underutilized fish products in this way.

References

- BELEW M., PETERSON E. A., PORATH J. (1985): A high capacity hydrophobic adsorbent for human serum albumin. *Anal. Biochem.*, **151**: 438–441.
- BLACKMORE V. L., MECKLING GILL K. A. (1995): Fish oil and oleic acid-rich oil feeding alter nucleoside uptake in human erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, **6**: 438–444.
- GILL J. S., YIANGOU Y., WEBB D. J., MELEAGROS L., BENJAMIN N., CHRYSANTHOU B. J., COCKCROFT J. R., CAUSON R. C., CAMM A. J., BLOOM S. R. (1990): Peptide histidine valine: its haemodynamic action and pharmacokinetics in man differ from those of vasoactive intestinal peptide and peptide histidine methionine. *Clin. Sci. (Colch)*, **78**: 487–492.
- HARTREE F. (1972): Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**: 422–427.
- HEMDAN E. S., ZHAO Y. J., SULKOWSKI E., PORATH J. (1989): Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 1811–1815.
- HUBERT P., PORATH J. (1980): Metal chelate affinity chromatography. I. Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds. *J. Chromatogr.*, **198**: 247–255.
- IMOTO T., OKAZAKI K. (1981): A simple peptide fractionation by hydrophobic chromatography with a prepacked reverse-phase column. *J. Biochem. (Tokyo)*, **89**: 437–441.
- KARAKOLTSIDIS P. A., ZOTOS A., CONSTANTINIDES S. M. (1995): Composition of the commercially important Mediterranean finfish, crustaceans, and molluscs. *J. Food Compos. Anal.*, **8**: 258–273.
- MATSUIT., MATSUFUJI H., OSAJIMA Y. (1992): Colorimetric measurement of angiotensin I – converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 517–518.
- MATSUI T., MATSUFUJI H., SEKI E. N. M., OSAJIMA K., OSAJIMA Y. (1993): Inhibition of angiotensin I – converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**: 922–925.
- MATTILA P., PIIRONEN V., UUSI RAUVA E., KOIVISTOINEN P. (1995): Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol contents in fish products. *J. Food Compos. Anal.*, **8**: 232–243.
- UENO A., HONG Y. M., ARAKAKI N., TAKEDA Y. (1985): Insulin stimulating peptide from a tryptic digest of bovine serum albumin: purification and characterization. *J. Biochem. (Tokyo)*, **98**: 269–278.

Received for publication August 25, 1999

Accepted for publication September 14, 1999

Souhrn

PROŠKOVÁ A., KUČERA J., VÁCHA F. (1999): Enzymová hydrolyza bílkovinných odpadů ze zpracování kapra (*Cyprinus carpio*). *Czech J. Food Sci.*, **17**: 161–165.

Maso z ryb – kapr (*Cyprinus carpio*), úhoř (*Anguilla vulgaris*), pstruh (*Salmo gairdneri*), štika (*Esox lucius*), lín (*Tinga vulgaris*), okoun (*Perca fluviatilis*), perlm (Scardinius erythrophthalmus) a plotice (*Leuciscus rutilus*) – bylo hydrolyzováno za použití proteolytických enzymů. Detailněji bylo studováno maso kapra. Proces byl optimalizován s cílem dostat produkty o nízké molekulové hmotnosti. Takto získané peptidy byly testovány s hlediska ACE (Angiotensin Converting Enzyme) inhibiční aktivity. Nakonec byly peptidy s ACE inhibiční aktivitou separovány chromatografií na silném anionu a hydrofobní chromatografií na fenyl-Superose (Pharmacia Biotech). Peptidy obsahující histidin známé jako prostředek používaný na žaludeční vředy byly separovány pomocí IMAC (Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography) na IDA-Cu agarose (Imino-Di-Acetyl substituovaná agarosa satureovaná měďnatými ionty). Separace ACE inhibujících peptidů hydrofobní chromatografií na fenyl-Superose byla úspěšná a byly získány velmi aktivní peptidy. Pomocí IMAC s měďnatými ionty nebyly odděleny histidinové peptidy, ale byly získány všechny nízkomolekulární peptidy sorbované na základě koncových aminoskupin. Touto vyvinutou metodou je možné získávat peptidy s ACE inhibiční aktivitou v laboratorním měřítku.

Klíčová slova: rybí odpad; zpracování odpadu; enzymatická hydrolyza; ACE inhibice; peptidy; hydrofobní chromatografie

Corresponding author:

Ing. ALEXANDRA PROŠKOVÁ, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: A.Proskova@vupp.cz

Niacin Determination in Meat and Offals by HPLC and its Comparison with Microbiological Assay

MARIE HOLASOVÁ and EVA MAŠKOVÁ

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

HOLASOVÁ M., MAŠKOVÁ E. (1999): Niacin determination in meat and offals by HPLC and its comparison with microbiological assay. *Czech J. Food Sci.*, 17: 166–170.

A simple high performance liquid chromatography method for the determination of available niacin in meat and offals is described. Acidic and subsequently enzymatic hydrolysis is applied to liberate niacin. The interfering accompanying substances are removed by passing the hydrolysate through a Silica-cart C18. Ion-pairing reversed phase liquid chromatography using a Separon SGX C18 column and mobile phase consisting of 200 ml methanol, 800 ml acetate buffer pH 3.9 and 5×10^{-3} mol tetrabutylammonium bromide is used to separate the vitamin. Niacin is detected by a diode array detector operating at 261 nm. The detection limit is 0.5 mg of niacin in 100 g sample. The mean recovery is 98.6% and the coefficient of variation 10.0%. The method was applied in the analysis of pork, beef and chicken meat, pork kidney and liver, and liver pâté. The results were consistent with the data obtained by microbiological assay, being 9% less on the average.

Key words: determination; HPLC; meat; offals; niacin; nicotinic acid

Niacin belongs to the vitamin B group. It is the generic descriptor for two vitamers, nicotinic acid and nicotinamide, which are systematically named as pyridine-3-carboxylic acid and pyridine-3-carboxamide. All plant and animal tissues require niacin in the form of nicotinamide nucleotide coenzymes for normal metabolism, and the vitamin is therefore present in foods of both plant and animal origin. In plant foods it predominates as a chemically bound nicotinic acid, in animal foods in the form of nicotinamide. Yeast, meat and offals are the major natural sources of niacin. The roasted coffee beans also belong to the main sources of niacin, owing to the formation of nicotinic acid due to the thermal decomposition of alkaloid trigonelline (BALL 1994).

The microbiological assay utilising a strain of *Lactobacillus plantarum* is conventionally used for the determination of niacin. This method is contained in both ČSN 56 0051 and AOAC standard methods (SULLIVAN & CARPENTER 1993). AOAC standard methods also include a colorimetric method using cyanogen bromide which yields a coloured pyridinium derivative that can be quantified spectrophotometrically (SULLIVAN & CARPENTER 1993). Both methods have certain disadvantages. The microbiological assay is very time-consuming and its results can be influenced by sample components stimulating or suppressing microbial growth. The disadvantage of the colorimetric method consists in the toxicity of cyanogen bromide. In addition, the reaction is not specific to

niacin, as cyanogen bromide reacts with all substituted pyridines (VIDAL-VALVERDE & RECHE 1991). Capillary electrophoresis (WARD & TRENNERY 1997; DIAZ-POLLAN & VIDAL-VALVERDE 1998) and ATR-FTIR spectroscopy (WOJCIECHOWSKI *et al.* 1998) were also used for niacin determination in foods.

Much attention has been paid to the application of HPLC for the determination of niacin in foods within several recent years. Generally, the procedure involves acidic, enzymatic, or alkaline hydrolysis, the separation of interfering substances, and the HPLC determination of nicotinic acid. CHASE *et al.* (1993) used only acidic hydrolysis in the analysis of fortified foods. To determine available niacin in foods, it is necessary to include both acidic and enzymatic hydrolysis (WARD & TRENNERY 1997; VIDAL-VALVERDE & RECHE 1991). TYLER & GENZALE (1990) applied alkaline hydrolysis for the determination of total niacin in beef, semolina and cottage cheese.

Due to the non-specific detection of nicotinic acid at the wavelength ranging from 250 to 265 nm, the separation of interfering substances is the prerequisite for the determination of the natural content of niacin. Vidal-Valverde successfully applied Dowex 1-X8 acetate resin. The CN cartridge failed to remove interfering substances and the use of a C18 cartridge did not yield sufficient recovery (VIDAL-VALVERDE & RECHE 1991). However, the C18 cartridge proved useful in purification after alkaline hydrolysis following the adjustment to pH 7 (TYLER & GEN-

ZYALE 1990). VAN NIEKERK *et al.* (1984) solved the purification of samples by the application of the column switching technique.

A suitable selection of chromatographic conditions is of basic importance for the determination of nicotinic acid, due to the possible presence of interfering substances. Ion-exchange chromatography could be applied in fortified foods (CHASE *et al.* 1993), ion-pairing in reversed-phase systems proved useful for the determination of the natural content of niacin (VIDAL-VALVERDE & RECHE 1991; TYLER & GENZALE 1990; OETLES & HISIL 1993).

The object of this study was to propose a simple and reliable HPLC method with suitable sample isolation and purification for the determination of niacin in meat, offals and products from these. The results were compared with the data obtained by the microbiological assay.

MATERIAL AND METHODS

Equipment and Chemicals

- Apparatus: a liquid chromatograph HP1090 with a diode array detector (Hewlett-Packard) set at the wavelength of nicotinic acid maximum, i.e., 261 nm was used. A column 250 by 4 mm packed with Separone SGX C18 (5 μ m) (Tessek), was used for separation.
- Clean-up cartridges: cartridges Silica-cart SGX C18 (60 μ m), column height 10 mm (Tessek), were used.
- Mobile phase: 5×10^{-3} mol tetrabutylammonium bromide (Fluka) in 1 litre of a 2 : 8 mixture of methanol and acetate buffer pH 3.9 (1×10^{-2} mol/l).
- Nicotinic acid (Sigma): stock solution 1g/l was further diluted to 100 μ g/ml.
- Takadiastase enzyme suspension: 10 g of takadiastase was filled with distilled water to 100 ml.

Sample Extraction

A sufficient amount of a homogenised sample (1–10 g containing 50–1000 μ g of niacin) was hydrolysed with 30 ml of sulphuric acid (0.5 mol/l) in an autoclave at 121°C for 60 min. After cooling, pH of samples was adjusted to 4.5 with 2M sodium acetate, and 5 ml of a freshly prepared suspension of takadiastase was added to each sample. The samples were then incubated at 37°C for 15 hrs. Once cooled, the samples were filled to 100 ml with acetate buffer of pH 3.9 (1×10^{-2} mol/l) and filtered. Along with the samples, the standard solution of nicotinic acid containing 100 or 1000 μ g of niacin was treated identically.

Extract Purification

Three cartridges Silica-cart C18 assembled to a series were consecutively washed with 2 ml of each methanol, water and acetate buffer pH 3.9. Subsequently, 10 ml of the filtrate was passed through the connected cartridges; the first 8 ml were discarded, the last 2 ml were collected as a sample for the determination of nicotinic acid. The

filtrates of the standard solution of nicotinic acid were treated in the same way.

Determination of Nicotinic Acid

The purified filtrates obtained were analysed by HPLC on a column Separone SGX C18, with spectrophotometric detection at 261 nm. The flow rate of the mobile phase was 0.8 ml/min, the volume of sampling loop was 20 μ l.

Microbiological Assay

The ČSN 56 0051 method (ČSN 1987) was used. Here niacin is released from the food matrix by acidic hydrolysis. The amount of acids produced by *Lactobacillus plantarum* strain ATCC 8014 after incubation is determined by titration. The Vitamin nicotinic acid assay broth (Merck) was used for determination.

RESULTS AND DISCUSSION

Samples of pork, beef and chicken meat, pork kidney and liver, and liver pâté, used for the analyses, were purchased in a retail network.

The chromatographic conditions of the determination were optimised using a nicotinic acid standard. Due to the polar character of nicotinic acid, the application of the normal phase chromatographic systems would produce long retention time values. Alternatively, the low affinity to the stationary phase in reversed phase chromatographic systems results in the elution of nicotinic acid with the solvent front. Ion-pairing reversed phase chromatography makes it possible to modify retention time in order to eliminate the interference of accompanying substances as much as possible. Whereas the use of heptane sulfonic acid as counterions proved practical for the determination of nicotinamide (TAKATSUKI *et al.* 1987), tetrabutylammonium bromide (TBAB) suitably modifies the elution parameters of nicotinic acid. It was verified during the optimisation of the composition of the mobile phase that the retention time increases with the decrease of methanol concentration and with the rising concentration of TBAB in the mobile phase. The influence of TBAB concentration in the mobile phase on retention time is shown in Table 1. Other factors substantially influencing retention parameters are pH of mobile phase and column temperature. VIDAL-VALVERDE & RECHE (1991) even give individual optimum combinations of column tempe-

Table 1. Influence of TBAB concentration in mobile phase on retention time of nicotinic acid

TBAB concentration [mol $\times 10^{-3}$ /l]	Retention time [min]
1	7.4
2	7.7
3	8.3
5	9.5

Table 2. Influence of pH of mobile phase on retention and response of nicotinic acid

pH of mobile phase	Retention time [min]	Relative response
3.9	9.5	1.00
4.3	9.7	0.98
5.0	11.1	0.92
5.6	11.9	0.80

temperature and sample pH for the determination of niacin in various samples. Under the experimental conditions of our analyses, we found that the pH value of the mobile phase significantly influenced detector response, as documented by Table 2, in addition to retention time and peak shape. When working without a thermostatted column, the influence of temperature would probably manifest in moderate shifts of retention time values. Considering the interference of accompanying substances and the peak shape, the mobile phase containing 5×10^{-3} mole tetrabutylammonium bromide in 1 litre of the 2 : 8 mixture of methanol and acetate buffer pH 3.9 (1×10^{-2} mol/l) proved optimal. Under these conditions, the linear response of the detector with the concentration range of nicotinic acid $c = 2\text{--}20 \mu\text{g/ml}$ of injected solution was verified, corresponding to the equation: response = $29.3c + 0.33$. The detection threshold equals 5 ng of nicotinic acid. The detection threshold is characterized by ratio of peak high and baseline noise equal to 5. Considering the dependence of results obtained on chromatographic conditions, a sample of the nicotinic acid standard was regularly included into the analyses of real samples.

A direct extraction by methanol can be used for the extraction of niacin from food matrix. In this case a parallel determination of nicotinic acid and nicotinamide is carried out, being more demanding as to sample purification. Alkaline hydrolysis is utilised in the determination of total niacin. Free or available niacin is determined after acidic or enzymatic hydrolysis (BALL 1994). There is certain variation in the literature data as for the condi-

Table 3. Influence of treatment conditions on nicotinamide hydrolysis

Hydrolysis		Residual nicotinamide [%]
time [min]	temperature [°C]	
15	115	53
30	121	21
45	121	9
60	121	0

tions of acidic hydrolysis. The AOAC procedure for the microbiological assay includes hydrolysis with 0.5M H_2SO_4 at 121°C for 30 min, the ČSN procedure recommends the same conditions for 60 min. The liberation of bound forms with diluted HCl under autoclaving at 121°C for 15 min (VIDAL-VALVERDE & RECHE 1991), eventually with the addition of 6 ml H_2SO_4 (1 + 1) at 121°C for 45 min (CHASE *et al.* 1993) was described. In our experiments hydrolysis with 0.5M H_2SO_4 was tested. It was found that a standard preparation of nicotinamide, hydrolysed with 0.5M H_2SO_4 at 121°C for 30 min, still contained 21% of the starting amount. A 60-min hydrolysis was needed for the total release of nicotinic acid. The influence of conditions on the hydrolysis of nicotinamide is shown in Table 3.

The UV detection at 261 nm, i. e., in the absorption maximum of nicotinic acid, is strongly non-specific. It is necessary for a successful analysis of complex food materials to remove accompanying interfering substances. The way of purification must therefore be selected carefully to be efficient enough and yield satisfactory recovery. Both these requirements were met by the use of the cartridge Dowex 1-X8 acetate resin (VIDAL-VALVERDE & RECHE 1991). However, the procedure required the evaporation of eluate and the transfer to mobile phase, prior to injection. Looking for an easier procedure, we tested the use of the cartridge Silica-cart C18. The application of a single cartridge did not result in a satisfactory removal of interfering substances, but a column assembled of three cartridges (30 mm) produced very good re-

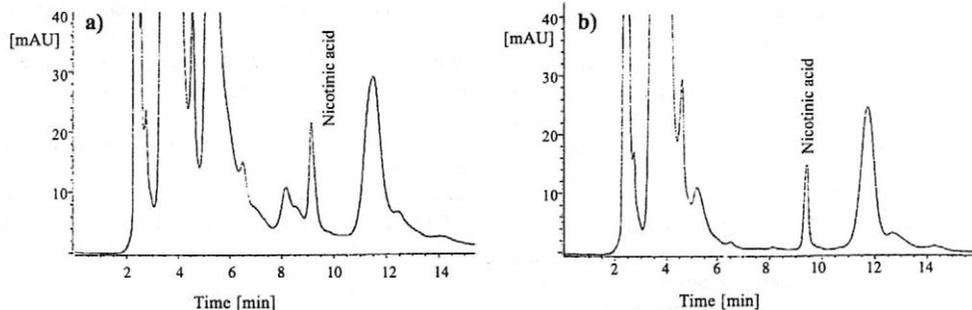


Fig. 1. Effect of purification in the analysis of pork liver: a) sample without purification step and b) sample after purification on Silica-cart C18

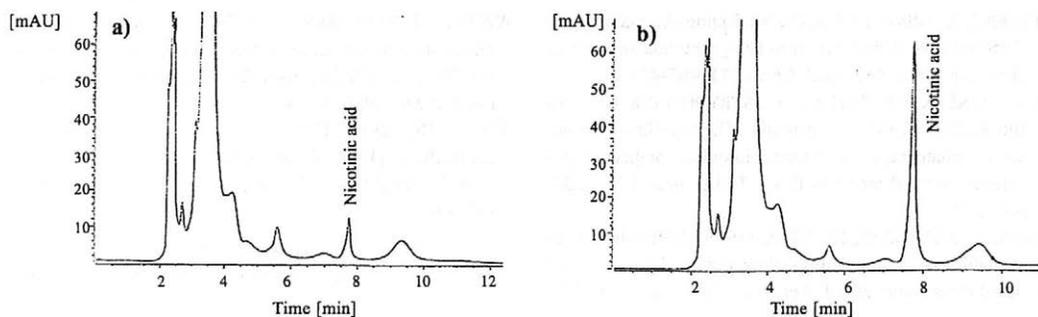


Fig. 2. Chromatogram of niacin: a) pork, b) pork with addition of nicotinic acid

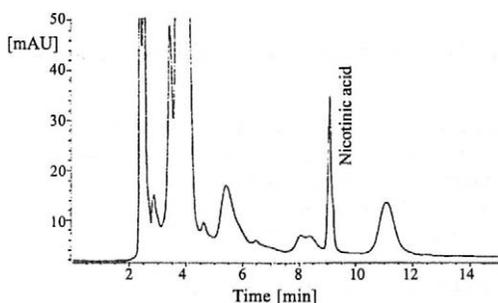


Fig. 3. Chromatogram of niacin in chicken breast

sults. Volume optimisation showed to be crucial. After the passage of more than 6 ml of filtrate through the column, the concentration of nicotinic acid in the eluate is stable, with recovery reaching 98%. In the analyses the first 8 ml of eluate were discarded and the following 2 ml were collected as a sample for injection. The increase of the discarded or collected volume causes the fall of purification effect because the captured interfering substances gradually elute from the column. An example of the purification of a pork liver sample is shown in Fig. 1.

Recovery was measured by a standard addition of 500 µg of nicotinic acid to the samples of pork liver prior to hydrolysis and amounted $98.6 \pm 1.1\%$. The reproducibility of the method was evaluated by replicate determination ($n = 5$) of niacin in samples of chicken meat with the coefficient of variation 10.0%.

Table 4. Comparison of niacin determination by HPLC and ČSN methods

Sample	Content of niacin [mg/100 g]	
	ČSN	HPLC
Pork (ham)	6.6	6.2
Beef (rump)	15.4	13.5
Chicken breast	7.7	7.0
Pork liver	5.5	5.0
Pork kidney	13.1	12.4
Liver pâté	3.2	3.9

The optimised procedure was used for the determination of niacin in pork (ham), beef (rump) and chicken (breast) meat, pork liver and kidney, and liver pâté samples. The results are displayed in Table 4, the examples of separation in Figs. 2 and 3. Except for liver pâté, all results obtained by HPLC methods were lower than those acquired by the ČSN method, averaging 9% less. A linear regression analysis comparing the HPLC (y) and ČSN (x) method gave the equation $y = 0.8462x + 0.7367$, with the correlation coefficient of 0.998. The results are well correlated with the published results comparing HPLC and AOAC methods in analysing samples of fortified cereal products and infant formulas (CHASE *et al.* 1993), where microbiological assay yielded data 11% higher than HPLC. In beef sample analyses, TYLER & GENZALE (1990) also found HPLC values lower than those obtained by microbiological method.

References

- BALL G. F. M. (1994): Water-soluble Vitamin Assays in Human Nutrition. Chapman and Hall, London: 27–35 and 246–255.
- ČSN 56 0051 (1987): Stanovení niacinu (kyseliny nikotinové). Praha, Úřad pro normalizaci a měření.
- CHASE G. W. JR., LANDEN W. O. JR., SOLIMAN A. M., EITENMILLER R. R. (1993): Liquid chromatographic analysis of niacin in fortified food products. *J. AOAC Int.*, **76**: 390–393.
- DIÁZ-POLLAN C., VIDAL-VALVERDE C. (1998): Niacin determination in legumes by capillary electrophoresis. Comparison with high performance liquid chromatography. *HRC*, **21**: 81–86.
- OETLES S., HISIL Y. (1993): High pressure liquid chromatographic analysis of water soluble vitamins in eggs. *Ital. J. Food Sci.*, **5**: 69–73.
- SULLIVAN D. M., CARPENTER D. E. (1993): Methods of Analysis for Nutritional Labelling. Arlington, AOAC Int.: 315–325.
- TAKATSUKI K., SUZUKI S., SATO M., SAKAI K., USHIZAWA I. (1987): Liquid chromatographic determination of free and added niacin and niacinamide in beef and pork. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**: 698–702.

- TYLER T. A., GENZALE J. A. (1990): Liquid chromatographic determination of total niacin in beef, semolina and cottage cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**: 467–469.
- VAN NIEKERK P. J., SMIT S. C. C., STRYDOM E. S. P., ARM-BRUSTER G. (1984): Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological method for the determination of niacin in foods. *J. Agr. Food Chem.*, **32**: 304–307.
- VIDAL-VALVERDE C., RECHE A. (1991): Determination of available niacin in legumes and meat by high-performance liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.*, **39**: 116–121.
- WARD C. M., TRENERRY V. C. (1997): The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chem.*, **60**: 667–674.
- WOJCIECHOWSKI C., DUPUY N., TA C. D., HUVENNE J. P., LEGRAND P. (1998): Quantitative analysis of water soluble vitamins by ATR-FTIR spectroscopy. *Food Chem.*, **63**: 133–140.

Received for publication August 10, 1999
Accepted for publication September 27, 1999

Souhrn

HOLASOVÁ M., MAŠKOVÁ E. (1999): Stanovení niacinu v maso a vnitřnostech metodou HPLC a srovnání s mikrobiologickým stanovením. *Czech J. Food Sci.*, **17**: 166–170.

Byla vypracována jednoduchá metoda pro stanovení využitelného niacinu v maso a vnitřnostech. Pro uvolnění niacinu z potravinové matrice byla aplikována kyselá a enzymová hydrolyza. Interferující doprovodné látky byly odstraněny za užití kolon Silica.cart C18. Pro vlastní stanovení kyseliny nikotinové byla použita chromatografie na koloně Separon SGX C18 v iontově-párovém uspořádání. Mobilní fáze obsahovala 5×10^{-3} mol tetrabutylamonium bromidu v 1 l směsi methanolu a octanového pufru (pH 3,9) v poměru 2 : 8. Niacin byl detekován spektrofotometricky při 261 nm. Detekční limit metody činí 0,5 mg niacinu ve 100 g vzorku. Metoda vykazuje zpětný výtěžek 98,6 % a variační koeficient 10,0 %. Metoda byla aplikována při analýze vepřového, hovězího a kuřecího masa, vepřových ledvin a jater a játrové pašťky. Získané výsledky velmi dobře (korelační koeficient $r = 0,998$) korelují s výsledky mikrobiologického stanovení a jsou v průměru o 9 % nižší.

Klíčová slova: stanovení; HPLC; maso; vnitřnosti; niacin; kyselina nikotinová

Corresponding author:

Ing. MARIE HOLASOVÁ, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: m.holasova@vupp.cz

Purification and Immobilization of Soybean (*Glycine max*) Urease*

MILENA KMÍNKOVÁ and JIŘÍ KUČERA

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

KMÍNKOVÁ M., KUČERA J. (1999): Purification and immobilization of soybean (*Glycine max*) urease. Czech J. Food Sci., 17: 171–175.

Urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) was isolated from soybean with 58% purity as judged by gel chromatography on Superose 12HR 10/30. The purification was done using an affinity sorbent – phenylurea bound to bead cellulose. The results were compared by the commonly used chromatography on urea covalently bound to epoxy-Sepharose and other new affinity sorbent – urea covalently bound to cyanurchloride-activated bead cellulose. Resulting purified enzyme was immobilized on diethylene-triamino-substituted bead cellulose by the glutaraldehyde method. The activity yield was as high as 7.36%, specific activity 35 230 per g of immobilized enzyme (DM basis) and 2467 per mg of bound protein (DM basis). The immobilized enzyme was stable in the presence of pancreatin. This implies that the urease purified and immobilized in this way can be proposed for avoiding urea from physiological fluids.

Key words: soybean urease, purification, phenylurea affinity chromatography, immobilization

Urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) is one of the enzymes frequently used in biochemical and biomedical analysis for the determination of urea in biological fluids. The enzyme hydrolysing urea to ammonia and carbon dioxide was found in all living cells. Legumes, such as jack bean (*Canavalia ensiformis*) (MENDES *et al.* 1988; SUNG *et al.* 1989) which is serologically similar to the enzyme from soybean (POLACCO & HAVIR 1979), cyanobacteria, such as *Anabaena cylindrica* (ARGALL *et al.* 1992), bacteria, such as *Helicobacter pylori* (ICATLO *et al.* 1998) or *Lactobacillus fermentum* (KAKIMOTO *et al.* 1990), and molds, such as *Aspergillus niger* (SMITH *et al.* 1993) or *Schizosaccharomyces pombe* (LUBBERS *et al.* 1996), and many others, all produce remarkable amounts of urease.

Ureases of different species are usually separated and purified by very similar methods. The separation/purification protocol contains usually the thermal precipitation taking the advantage of the relatively high thermostability of the enzyme (ARGALL *et al.* 1992; SUNG *et al.* 1989). Anion exchange chromatography (LUBBERS *et al.* 1996) is usually used as the next step, followed by hydroxylapatite chromatography (ARGALL *et al.* 1992). Heparinoid affinity sorbent was used for affinity chromatography of urease from *Helicobacter pylori* (KAKIMOTO *et al.* 1990), but more frequently immobilized substrate is used as an affinant (MENDES *et al.* 1988). The epoxy-activated Sepharose was used for immobilization of urea and the re-

sulting affinity sorbent was used for purification of jack bean urease (MENDES *et al.* 1988).

Urease was also immobilized using many known methods. The enzyme was entrapped in crosslinked gelatin film (BOLLMEIER & MIDDLEMAN 1979) or polyvinyl-alcohol membrane (CHEN *et al.* 1994). The adsorption of urease on polystyrene granules was also used for enzyme immobilization (ERNST 1988), as well as covalent binding to glutaraldehyde activated chitosan (KRAJEWSKA *et al.* 1990) or functionalized silica (LIUBINSKII *et al.* 1982). Microencapsulation inside cellulose material (ONYEZILI 1988) and covalent binding to the inner surface of nylon tubing (RISTAU *et al.* 1985) are believed to be efficient in clinical use of immobilized urease.

The most important application of urease is in detoxification of biological fluids (ERNST 1988; RISTAU *et al.* 1985) and biochemical analysis. The immobilized urease is applicable for extracorporeal detoxification of blood serum (ONYEZILI 1988), or as a peroral remedy (RISTAU *et al.* 1985). The enzyme electrode was constructed for the potentiometric determination of urea in biological fluid using immobilized urease (GIL *et al.* 1992).

In the present work we have purified urease from soybean extract using two affinity sorbents, the urea bound to cyanurchloride activated bead cellulose and phenylurea bound to bead cellulose. Both sorbents were compared and the phenylurea sorbent was found to give better results.

*The work was supported with the grant of National Agency for Agricultural Research (NAZV) of Czech Republic, grant No. EP0960006255.

The purified soybean urease was then immobilized on glutaraldehyde-activated diethylene-triamino-bead cellulose and the immobilized enzyme was characterized. The stability of immobilized urease in the presence of pancreatin was also determined. The stability in gastro-intestinal tract can be the advantage in peroral application for blood serum detoxification.

The aim of this work was i) to develop the efficient affinity sorbent for single step purification of soybean urease based on urea derivatives, and ii) to immobilize the purified urease for possible application as remedy for lowering the urea level in blood serum in the case of renal insufficiency.

MATERIAL AND METHODS

Soybean was obtained in a local shop.

The affinity sorbents, the cyanurchloride bound urease as well as bound phenylurea, were customarily synthesized by Iontosorb comp., Ústi n. Labem, CR.

The bead-cellulose-bound diethylene-triamine (Iontosorb DETA) was the product of the same company.

Pancreatin used for testing of immobilized urease stability was the product of SIGMA Fine Chemicals with the activity guaranteed to be at least 3x U.S.P. specification (cat. No. P 1625).

Column Superose 12HR 10/30 for FPLC was a product of Pharmacia Uppsala, Sweden.

All chromatographic experiments were carried out with the use of FPLC, model LCC 550, Pharmacia Uppsala, Sweden.

Commercial urease from SIGMA Fine Chemicals was used for comparison.

All other reagents were products of Lachema Brno CR, reagent grade.

Protein concentration was determined by the method of HARTREE (1972) and urease activity by the method of POLLACCO and HAVIR (1979).

RESULTS AND DISCUSSION

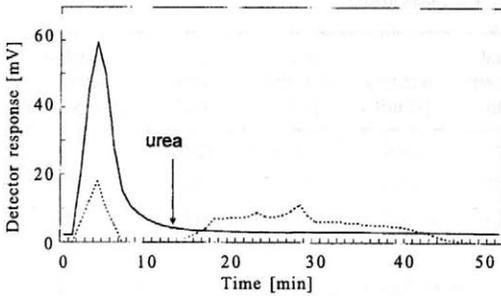
Extraction: 30 g of soybean was left in 240 ml buffer (0.1M Tris-malate pH 7.0, containing 1mMEDTA and 1mM mercaptoethanol) overnight. Then the mixture was dis-

integrated and stirred for 1 hour at room temperature. After extraction, the suspension was first filtered through nylon cloth followed by the filtration through filter paper (black label) in cold room (5°C) for removing mainly the fat present in extract. Filtrate was then centrifuged (20 minutes, 14 000 x g). 125 ml of crude extract was obtained in this way. The crude extract was then further purified by thermal precipitation (20 minutes, 50°C) and left still for another 1 hour in cold, centrifuged and filtered as before. Resulting clear solution was acidified to pH 6.0 (0.1M HCl) and left to stand for 45 minutes at 5°C. The resulting suspension was then centrifuged and pH of supernatant (120 ml) was readjusted to 7.0 with the use of sodium bicarbonate. Resulting solution was lyophilized and then stored at 5°C. 1 g of soybean gives the total activity of 83 100 U as a mean value from five experiments. Lyophilized urease had the specific activity of 885.5 U/mg protein (mean value from five experiments).

Affinity chromatography: Two different affinity sorbents were used for the purification of urease extracted from soybean. The first was urea covalently bound to bead cellulose with the aid of cyanurchloride activation. Only the most reactive chlorine of cyanurchloride was used for enzyme immobilization. The other was inactivated in the usual way. The second affinity sorbent used in this comparison was phenylurea bound directly to cellulose beads. The asymmetrically substituted urea is known as a potent urease inhibitor. Both columns were run at the same conditions. The column (1 x 2.6 cm) was equilibrated with the starting buffer (0.1M phosphate pH 7.0 containing 1mM EDTA and 1mM mercaptoethanol) and the sample (lyophilized extract of soybean urease) was then injected (700 µl, 23 000 U/ml, 26 mg protein/ml). The column was washed with the starting buffer to the low constant detector response and the adsorbed enzyme was eluted with 0.5M urea in the same buffer. The course of chromatography with the use of cyanurchloride-bound urea is shown in Fig. 1a and that with the use of phenylurea bound directly is shown in Fig. 1b. Both sorbents give good results, but as seen from the figures and results, the phenyl-urea sorbent gives the product of better quality. The results of both affinity chromatographies are summarized in Table 1.

Table 1. The comparison of affinity chromatography of soybean urease on urea bound to cyanurchloride activated bead cellulose and on phenylurea bound to bead cellulose (column 1.0 x 2.6 cm)

Purification step	Volume [ml]	Protein concentration [mg/ml]	Total protein [mg]	Activity [U/ml]	Total activity [U]	Activity yield [%]	Specific activity [U/mg protein]
Extract	0.7	26	18.2	23465	16425	100	902
CNC-urea chromatography	13	0.16	2.08	341	4435	27	2130
Extract	0.7	26	18.2	23465	16425	100	902
Phenylurea chromatography	6.4	0.16	1.024	1343	8596	52.3	8395



Solid line – protein concentration; dotted line – urease activity; both in relative units

Fig. 1a. Affinity chromatography of soybean extract on urea bound to cyanurchloride-activated bead cellulose.

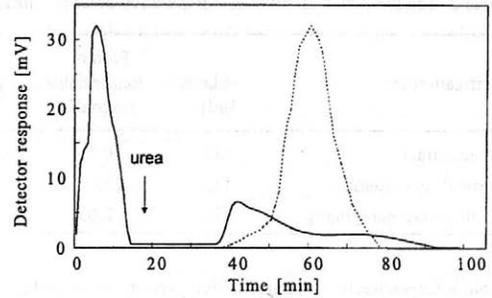


Fig. 1b. Affinity chromatography of soybean extract on phenylurea-bead cellulose sorbent

Bioaffinity sorbent containing the phenylurea bound to bead cellulose was shown to be better compared with that of urea itself bound with cyanurchloride to bead cellulose. This sorbent gives better results even in comparison with the literature data for traditional affinity sorbent – urea bound to epoxy-agarose gel (MENDES *et al.* 1988).

The purification process was then repeated with the approximately ten times larger load of crude extracts. The purity of the product prepared in this experiment was determined by the gel permeation chromatography on Superose Column 12HR 10/30. The result is shown in Fig. 2. The integration of active peak shows the enzyme to be 58% pure.

Immobilization of purified soybean urease: The support – Iontosorb DETA (5 g), was activated in 100 ml of 0.1M phosphate pH 6.5 (100 ml) by the addition of 25% glutaraldehyde (10 ml). After stirring of the mixture at 38°C (2 hours) the activated Iontosorb DETA was separated by suction and washed first with the operating buffer (200 ml) and finally with 0.1M phosphate pH 7.0. Activated support was used immediately for immobilization.

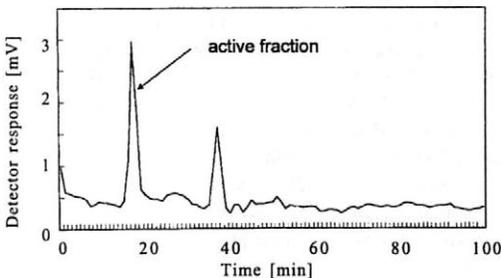


Fig. 2. Gel permeation chromatography of urease separated by the way of affinity chromatography on phenylurea-bead cellulose

0.5 g of activated support was suspended in 50 ml of 0.1M phosphate pH 7.0 and different amounts of lyophilized urease were added (0.1, 0.2, 0.4 and 0.6 g of lyophilized enzyme per 0.5 g of activated support) for the immobilization. The mixture was stirred for 4 hours at 25°C. After that time the bound enzyme was filtered off and washed with the operating buffer. The product (0.5 g) was then washed with excess volume of 0.1M NaHCO₃ pH 8.5 and then suspended in the same buffer (5.5 ml). 0.003 g of sodium borohydride was then added and pH was adjusted to 8.5 with the use of 0.1M HCl. The reduction took place at 30°C under stirring for 2 hours. The product was then washed with water and with the buffer for activity determination (0.1M Tris-malate pH 7.0 containing 1mM mercaptoethanol and 1mM EDTA).

The results obtained with different amounts of enzyme are summarized in Table. 3. The optimum result was obtained at the enzyme load 0.4 g/g of support and process with this amount of crude enzyme was repeated in larger quantity. The results are summarized in Table 4. The immobilized enzyme was lyophilized and stored in cold.

The stability of immobilized urease in the presence of pancreatin was then tested. Pancreatin SIGMA was used in this experiment. 2 mg of pancreatin was dissolved in 5 ml 0.1M phosphate pH 7.9 and the pH was adjusted to 8.2. Then 30 mg of immobilized urease was added and the volume was adjusted to 10 ml. The mixture was then stirred at 37°C for 2 hours and the remaining urease activity was determined. Only 11.2% of starting activity was lost after pancreatin treatment in comparison with 4.1% activity lost in the thermal treatment at the same conditions without pancreatin. The result shows the high stability of immobilized urease in the presence of pancreatin.

CONCLUSION

Affinity chromatography of soybean urease on two sorbents was described and compared. Phenylurea di-

Table 2. The yield and purity of the preparative-scale purification of soybean urease

Purification step	Volume [ml]	Protein concentration [mg/ml]	Total protein [mg]	Activity [U/ml]	Total activity [U]	Activity yield [%]	Specific activity [U/mg protein]
Crude extract	125	30.2	3 775	30 080	3 760 000	100	996
Thermal precipitation	125	25.6	3 200	32 640	4 080 000	108.5	1 275
Affinity chromatography	175	2.05	338.75	11 577	2 026 060	53.8	5 980

Table 3. Characteristics of immobilized soybean urease as function of urease load (0.1 g of urease sample is equal to 33 700 U of urease activity)

The amount of lyophilized urease used for immobilization [g]	Activity [U/g support]	Specific activity [U/mg bound protein]	Activity yield [%]
0.1	116	81.9	9.2
0.2	1 516	402	45.4
0.4	1 862	412	44.55
0.6	1 225	143.4	16.2

Table 4. Characterization of soybean urease immobilized on the bead cellulose substituted with diethylene-triamine (Iontosorb DETA)

Property	Value
Activity applied [U/g support]	171 896
Activity obtained [U/g support]	12 649
Immobilized activity yield [%]	7.36
Protein applied [mg/g support]	163.2
Protein obtained [mg/g support]	4.73
Immobilized protein yield [%]	1.45
Specific activity of soluble urease [U/mg protein]	1 053
Specific activity of immobilized urease [U/mg protein]	2674

rectly immobilized on bead cellulose which is produced by Iontosorb factory was proved to give better results regarding the yield and resulting specific activity in comparison with the urea bound to bead cellulose via cyanurichloride produced by the same company. Comparing with the literature data published for the urea bound to epoxy-activated agarose gel or heparinoid-agarose (see literature cited above) the phenylurea gives also higher yield and higher specific activity of urease compared with the other sorbent. The phenylurea bound covalently to bead cellulose was proved to be an optimum sorbent for urease, at least that of soybean.

Immobilization of soybean urease on glutaraldehyde-activated Iontosorb DETA shows the good immobilization yield and activity convenient for clinical use and analytical application. The stability in the presence of pancreatin is believed to be also of importance.

References

- ARGALL M. E., SMITH G. D., STAMFORD N. P., YOUENS B. N. (1992): Purification and properties of urease from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Int.*, **27**: 1027-1036.
- BOLLEMEIER J. P., MIDDLEMAN S. (1979): Hydrolysis of urea by gelatin-immobilized urease: separation of kinetic and diffusion phenomena in a model immobilized-enzyme reactor system. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**: 2303-2321.
- CHEN D. H., LEU J. C., HUANG T. C. (1994): Transport and hydrolysis of urea in a reactor-separator combining an anion-exchange membrane and immobilized urease. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **61**: 351-357.
- ERNST B. (1988): Production of immobilized urease adsorbed on polystyrene granules. *Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe*, **21**: 194-198.
- GIL M. H., PIEDEDE A. P., ALEGRET S., ALONSO J., MARTINEZ-FABREGAS E., ORELLANA A. (1992): Covalent binding of urease on ammonium-selective potentiometric membranes. *Biosens. Bioelectron.*, **7**: 645-652.
- HARTREE E. F. (1972): Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**: 422-427.
- ICATLO FC J. R., KUROKI M., KOBAYASHI C., YOKOYAMA H., IKEMORI Y., HASHI T., KODAMA Y. (1998): Affinity purification of *Helicobacter pylori* urease. Relevance to gastric mucin adherence by urease protein. *J. Biol. Chem.*, **273**: 18130-18138.
- KAKIMOTO S., SUMINO Y., KAWAHARA K., YAMAZAKI E., NAKATSUI I. (1990): Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**: 538-543.

- KRAJEWSKA B., LESZKO M., ZABORSKA W. (1990): Development of urease-chitosan membrane. *Polim. Med.*, **20**: 31–41.
- LIUBINSKII G. V., IANISHPOL'SKII V. V., TERTYKH V.A., IUODVAL'KITE D. IU., GLEMZHA A. A. (1982): Properties of urease immobilized on the functional organic silica surface. *Ukr. Biokhim. Zh.*, **54**: 145–148.
- LUBBERS M. W., RODRIGUEZ S. B., HONEY N. K., THORNTON R. J. (1996): Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.*, **42**: 132–140.
- MENDES M. J., KARMALI A., BROWN P. (1988): One-step affinity purification of urease from jack beans. *Biochimie*, **70**: 1369–1372.
- ONYEZILI F. N. (1988): The enzyme coupling process in urease immobilization on O-alkylated nylon tubes. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **16**: 255–262.
- POLACCO J. C., HAVIR E. A. (1979): Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *J. Biol. Chem.*, **254**: 1707–1715.
- RISTAU O., POMMERENING K., JUNG C., REIN H., SCHELER W. (1985): Activity of urease in microcapsules. *Biomed. Biochim. Acta*, **44**: 1105–1111.
- SMITH P. T., KING A. D., GOODMAN N. (1993): Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, **139** (Pt 5): 957–962.
- SUNG H. Y., LEE W. M., CHIOU M. J., CHANG C. T. (1989): A procedure for purifying jack bean urease for clinical use. In: *Proc. Natl. Sci. Council. Repub. China [B]*, **13**: 250–257.

Received for publication August 10, 1999

Accepted for publication October 12, 1999

Souhrn

KMÍNKOVÁ M., KUČERA J. (1999): Purifikace a imobilizace ureasy sóji (*Glycine max*). *Czech J. Food Sci.*, **17**: 171–175.

Ureasa (močovina aminohydrolasa, EC 3.5.1.5) byla izolována ze sójových bobů s čistotou 58 % stanovenou gelovou chromatografií na koloně Separose 12HR 10/30. Purifikace byla založena na afinitní chromatografii extraktu sóji. Byly použity dva nové afinitní sorbenty – fenylmočovina vázaná kovalentně a močovina vázaná prostřednictvím kyanurchloridu. Nosičem pro oba sorbenty byla perlová celulóza. Takto purifikovaný enzym byl imobilizován kovalentní vazbou na diethylen-triamino-perlovou celulózu s použitím glutaraldehydu. Výtěžek vázané aktivity byl 7,36 % vložené aktivity a specifická aktivita vázaného enzymu byla 35 230 jednotek na 1 g sušiny imobilizovaného enzymu a 2 467 jednotek na 1 mg vázaných bílkovin. Imobilizovaný enzym byl stabilní v přítomnosti pankreatinu a může být proto použit k odstranění močoviny z fyziologických tekutin.

Klíčová slova: sójová ureasa; purifikace; fenylmočovina afinitní chromatografie; imobilizace

Corresponding author:

Ing. MILENA KMÍNKOVÁ, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: m.kminkova@vupp.cz

Energy and Nutrient Value of Selected Delicatessen Salads*

EVA MAŠKOVÁ, VLASTA FIEDLEROVÁ, MARIE HOLASOVÁ and JANA RYSOVÁ

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

MAŠKOVÁ E., FIEDLEROVÁ V., HOLASOVÁ M., RYSOVÁ J. (1999): **Energy and nutrient value of selected delicatessen salads.** *Czech J. Food Sci.*, 17: 176–181.

Nutrient content of 11 kinds of mayonnaise salads (potato, Italian, delicate, camping, red cabbage, bean, Iceland, Camembert, Dutch, fish, egg), 6 non-mayonnaise salads (carrot, cabbage, maize, to-fu, spring, summer) and 2 kinds of rolls (plain, whole-meal) was evaluated. All samples were analysed for basic composition, content of selected vitamins (B₁, B₂, B₆, niacin, C, E, A, total carotenoids, carotenes) and minerals (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, P, I). Finally, the contribution of consuming an average 100g serving of a salad and one roll to the fulfilment of the recommended daily allowances (RDA) of some observed nutrient factors for an adult person was estimated. A 100g serving of a salad mostly supplies the human organism with 10% or less of the recommended daily allowances of observed vitamins and minerals. With the exception of riboflavin and calcium, whole-meal rolls are a better source of vitamins and minerals than plain rolls.

Key words: fast food; salad; roll; basic composition; thiamin; riboflavin; vitamin B₆; niacin; vitamin C; vitamin E; vitamin A; minerals

The fast food products, also including delicatessen salads, presently play an irreplaceable role in the nutrition of a number of people in this country, particularly of the younger generation. Fast foods are mainly produced by world-famous corporations like McDonald's, Kentucky Fried Chicken, Pizza Hut, or Dunkin's Donuts. These mammoth retail chains offer a long-established menu of foods only scarcely influenced by the country where the particular dining facility is located. Due to their rather long tradition world-wide, data on the nutrient composition of a number of their products are available (GREENFIELD *et al.* 1981, 1982; WILLS & GREENFIELD 1980, 1982; WILLS *et al.* 1985).

This is not the case of delicatessen salads, belonging to the fast foods most frequently consumed in the Czech Republic. Though this food habit has its long tradition in this country, and remains popular, comprehensive data on the nutrient value of these products are lacking both in the literature and in the Food Tables of the Society for Nutrition (PERLÍN *et al.* 1992, 1993).

In this study nutrient contents of 11 kinds of mayonnaise salads, 6 kinds of non-mayonnaise salads, and 2 kinds of rolls were evaluated. All samples were analysed for basic composition, content of selected vitamins (B₁, B₂, B₆, niacin, C, E, A, total carotenoids, carotenes) and minerals (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, P, I). Subsequently,

the contribution of consuming an average 100g serving of a salad and one roll to the fulfilment of the recommended daily allowances (RDA) of some observed nutrient factors was estimated.

MATERIAL AND METHODS

The respective samples of delicatessen salads and rolls were purchased in the network of delicatessen shops and supermarkets in various locations of the city of Prague. Those kinds of salads were selected that are traditional, offered under the same name in a number of shops, are frequently demanded, and supposedly have a stable recipe. The following samples were collected: mayonnaise salads (potato, Italian, delicate, camping, red cabbage, bean, Iceland, Camembert, Dutch, fish, egg), 6 non-mayonnaise salads (carrot, cabbage, maize, to-fu, spring, summer). Average weight of one piece of plain roll (43 g) and whole-meal roll (49 g) was found, to which the respective nutrient values were related. The samples of salads and rolls were homogenised in a blender and stored at -18°C until analyzed. The samples were subjected to the following determinations:

basic composition: dry matter, ash, protein, fat, saccharide content and energy value of the sample
thiamin (B₁): thiochrome method ČSN 56 0052

*The research was supported by the project of the National Agency for Agricultural Research No. EP 096098 6257.

riboflavin (B₂): lumiflavine method ČSN 56 0054
 vitamin B₆: microbiological assay with *Saccharomyces uvarum* ATCC 9080, ČSN 56 0056
 niacin: microbiological assay with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, ČSN 56 0051
 vitamin C: titrimetric method ČSN 56 0050
 vitamins E (α -tocopherol) and A: HPLC method with fluorescence detection, after alkaline saponification and extraction of non-saponifiable matter
 carotenoids: spectrophotometric determination, after alkaline saponification and extraction of non-saponifiable matter
 carotenes: HPLC method with DAD detection, after alkaline saponification and extraction of non-saponifiable matter
 minerals: dry ashing
 Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn – flame AAS
 P – spectrophotometry
 I – mineralisation by alkaline dry ashing, photometry

The results were obtained by duplicate determination of individual factors in single salad samples except potato and camping salads and plain roll, where two independent samples were used for analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the nutrient evaluation of delicatessen salads and rolls are given in Tables 1–3. Table 1 presents the basic composition and the calculated energy value of a 100g serving of salads and 1 piece of roll, Table 2 shows the content of some vitamins and Table 3 the content of selected minerals in observed samples.

The content of fat ranged from 0.2 to 31 g/100 g, being high in all mayonnaise salads, in other samples it always depended on the amount of plant oil added. With the exception of Dutch and Camembert salads with protein content approximately 10 g/100 g, other kinds were inferior to very poor sources of proteins. The content of saccharides in salads fluctuated between 1.4 and 15.8 g/100 g, higher values were found in products with a higher portion of potatoes, beans and maize. The energy values of 100g salad servings varied enormously. They were found low in vegetable salads, high in salads with higher content of mayonnaise.

The fat and protein content of rolls is very low, the content of saccharides approximately corresponds with the expected values (about 31 g in 1 roll).

Table 1. Basic composition and energy value of 100 g salad or 1 roll

Sample	Water [g]	Fats [g]	Saccharides [g]	Proteins [g]	Energy value	
					[kJ]	[kcal]
Mayonnaise salads						
Potato	73.2	10.8	13.2	1.8	679.3	162.4
Italian	67.0	17.8	10.5	3.1	923.4	220.7
Delicate	64.4	22.4	5.3	6.0	1066.7	254.9
Camping	69.8	17.4	5.0	5.7	859.2	205.4
Red cabbage	79.3	11.8	5.8	1.7	586.7	140.2
Bean	58.8	19.4	14.8	5.7	1107.8	264.8
Iceland	59.6	29.8	1.7	6.6	1301.4	311.0
Camembert	55.7	31.0	1.4	10.1	1401.3	334.9
Dutch	53.4	30.6	2.9	10.9	1425.8	340.8
Fish	59.9	27.0	5.1	6.0	1240.1	296.4
Egg	73.4	15.7	4.0	5.5	773.2	184.8
Non-mayonnaise salads						
Carrot	93.2	0.2	5.0	0.8	106.2	25.4
Cabbage	82.7	5.2	9.2	1.5	385.7	92.2
Maize	77.7	3.2	15.8	2.1	430.8	102.9
To-fu	79.4	2.0	9.6	6.6	356.0	85.1
Spring	79.6	9.6	5.5	2.9	518.6	123.9
Summer	89.6	1.4	3.2	4.9	194.1	46.4
Rolls						
Plain roll	5.2	0.6	31.5	4.9	648.4	154.9
Whole-meal roll	7.8	0.8	31.9	6.4	688.9	164.7

Table 2. Vitamin content in 100 g of salad or 1 roll

Sample	B ₁ [mg]	B ₂ [mg]	B ₆ [mg]	Niacin [mg]	C [mg]	E [mg]	A [μg]	Carotenoids [mg]	Carotenes [mg]
Mayonnaise salads									
Potato	0.06	0.02	0.12	0.6	traces	2.8	0	0.53	0.38
Italian	0.04	0.06	0.22	1.0	0.2	7.2	13	0.66	0.37
Delicate	0.08	0.06	0.07	1.1	0.0	2.8	6	0.39	0.08
Camping	0.06	0.05	0.10	1.0	0.0	4.0	6	0.62	0.12
Red cabbage	0.03	0.02	0.06	0.2	0.0	2.9	0	0.20	0.05
Bean	0.08	0.06	0.06	0.3	0.0	4.9	0	0.07	0.02
Iceland	0.04	0.05	0.06	0.3	0.0	7.4	27	0.21	0.15
Camembert	0.06	0.21	0.05	0.7	0.0	10.9	65	0.13	0.05
Dutch	0.05	0.22	0.07	0.5	0.0	7.1	59	2.19	0.56
Fish	0.04	0.08	0.07	0.5	0.0	11.6	12	0.56	0.50
Egg	0.05	0.13	0.09	0.4	0.0	3.6	28	0.24	0.04
Non-mayonnaise salads									
Carrot	0.02	0.05	0.17	1.0	0.0	0.3	0	5.79	5.67
Cabbage	0.03	0.02	0.13	0.3	0.2	2.8	0	0.47	0.43
Maize	0.06	0.05	0.12	1.1	0.0	1.4	3	2.40	0.29
To-fu	0.06	0.05	0.13	0.7	0.0	0.8	0	1.95	0.70
Spring	0.09	0.04	0.17	0.8	3.1	0.7	0	1.12	0.22
Summer	0.04	0.04	0.14	0.4	<0.2	1.4	0	2.14	1.09
Rolls									
Plain roll	0.04	0.04	0.03	0.7	0.0	0.5	0	0.05	0.02
Whole-meal roll	0.08	0.03	0.06	0.8	0.0	0.7	0	0.05	0.01

As can be read from Table 2, the content of observed hydrophilic vitamins (B₁, B₂, B₆, niacin, C) was very low both in salads and rolls. The values of thiamin ranged from 0.02 to 0.09 mg/100 g. The content of riboflavin was dependent on the presence of milk-derived products, specifically cheese, in the sample. This is why it reached its maximum in Camembert and Dutch salads (up to 0.22 mg per 100 g). The values of vitamin B₆ in salads fluctuated in the range of 0.05 to 0.22 mg/100 g, the highest content being determined in Italian salad and some vegetable salads. The levels of niacin ranged from 0.2 to 1.1 mg/100 g. Due to vitamin C instability, this factor was only found in traces, or was absent, in all samples studied. Vitamin C is oxidized to the high extent already during the raw material chopping. Very similar data on the content of some hydrophilic vitamins were also found by WILLS and GREENFIELD (1982) in potato and bean salads offered by Kentucky Fried Chicken, by DONG *et al.* (1980) in salads served to U. S. Armed forces, and by MŇUKOVÁ (1980) in the carrot salad supplied to canteen feeding. The values of all hydrophilic vitamins in rolls were very low. Thiamin and vitamin B₆ showed higher contents in whole-meal roll, confirming the data by ERBERSDOBLER (1997).

The content of observed lipophilic vitamins in salads fluctuated substantially. The levels of total carotenoids and carotenes very much depend on the presence of their very rich sources, particularly of carrot and paprika. High levels of these factors were therefore found in carrot salad (about 5 mg/100 g) and other, predominantly vegetable items. The share of carotenes in total carotenoids ranged from 12 to 98%, reaching its maximum in carrot salad. Carrot, with most abundant α - and β -carotenes (HEINONEN 1989), is the dominant source of carotenoids in this salad. On the other hand, the levels of vitamin A found in the samples were very close to null. Only the salads containing cheese, eggs, or fish are the sources of vitamin A. Very low values of vitamin A were also found by WILLS and GREENFIELD (1982) in potato and bean salads by Kentucky Fried Chicken. The content of vitamin E was well correlated with fat content and ranged from 0.3 to 11.6 mg/100 g. High levels were found in mayonnaise salads. The levels of observed lipophilic vitamins in rolls were very low or null.

Table 3 presents the content of observed minerals in salads and in rolls. Their levels mostly corresponded to the raw materials used. The values of sodium fluctuated

Table 3. Mineral content in 100 g of salad or 1 roll

Sample	Na [mg]	K [mg]	Ca [mg]	Mg [mg]	Fe [mg]	Cu [mg]	Zn [mg]	P [mg]	I [µg]
Mayonnaise salads									
Potato	202	160	17	10.0	0.64	0.102	0.21	36	5.6
Italian	312	266	16	15.0	0.52	0.057	0.49	57	5.6
Delicate	454	140	22	9.8	0.65	0.051	0.82	85	8.8
Camping	515	142	27	10.1	0.43	0.047	0.74	83	8.9
Red cabbage	320	131	30	7.5	0.29	0.028	0.14	25	4.2
Bean	220	155	44	19.0	1.24	0.066	0.56	80	6.0
Iceland	610	134	21	10.8	0.33	0.022	0.26	66	18.1
Camembert	461	121	114	8.7	0.69	0.032	1.04	153	8.6
Dutch	589	83	182	10.2	0.85	0.042	1.23	183	18.4
Fish	522	88	27	7.4	0.44	0.037	0.38	64	10.9
Egg	303	148	25	9.6	0.52	0.041	0.44	77	14.6
Non-mayonnaise salads									
Carrot	44	237	29	11.2	0.29	0.022	0.27	31	0.5
Cabbage	296	143	44	8.1	0.34	0.019	0.13	22	14.9
Maize	226	177	13	16.2	0.80	0.039	0.40	57	6.0
To-fu	561	212	48	30.9	1.33	0.123	0.70	104	13.2
Spring	448	204	40	15.9	0.49	0.038	0.29	56	1.5
Summer	103	196	25	8.4	0.27	0.055	0.15	31	6.6
Rolls									
Plain roll	259	55	21	9.2	0.39	0.047	0.28	53	1.2
Whole-meal roll	551	86	21	18.3	0.83	0.098	0.60	85	1.5

between 44 and 610 mg/100 g, being higher mainly in products containing fish and soy meat. The levels of potassium ranged from 83 to 266 mg/100 g. The content of calcium in salads usually was very low (about 20–50 mg per 100 g), only in salads containing cheese it exceeded 100 mg/100 g. Magnesium levels reached 19 mg/100 g or less, except for to-fu salad with 31 mg/100 g. The iron content of salads was not mostly significant (0.27 to 0.85 mg/100 g), with the maximum, approximately 1.3 mg per 100 g, in bean and to-fu salads. Copper values in salads were mostly low (0.02 to 0.12 mg/100 g), as well as those of zinc (up to 0.6 mg/100 g). The products containing cheese and smoked meats only showed zinc values of approximately 1 mg/100 g. The levels of phosphorus were found low (up to 100 mg/100 g), only the Camembert and Dutch salads reached higher values because of cheese content. Iodine content of salad samples ranged between 0.5 and 18.4 µg/100 g, being particularly low in vegetable salads because of the negligible content of this factor in vegetables. Higher values are the result of addition of ingredients of animal origin (cheese, egg, fish meat) and particularly of the use of iodized salt in their preparation.

The levels of all observed minerals in rolls were low and mostly corresponded with the raw materials used.

Doubled values of magnesium, iron, and zinc were found in whole-meal rolls as compared with plain rolls. These data are in keeping with the paper by ERBERSDOBLER (1997). Negligible amounts of iodine in rolls indicate that no iodized salt was used for their production.

Figs 1 and 2 offer a comparison of the content of selected nutrients in 100g serving of salads and in one roll, as related to the recommended daily allowances (RDA) for an adult person. Not all the observed nutrient factors are included because the Food and Tobacco Product Law No. 110/1997 Sb. does not determine their recommended daily allowances. Fig. 1 shows the contribution of 100 g of a salad to the supply of recommended daily allowances. It was compiled from minimum, average, and maximum values of the content of respective nutrient factors obtained by the analysis of all 17 salads. The data make it obvious that a 100g serving of a salad will not bring more than 15% of the recommended daily allowances of all observed vitamins, except for vitamin E. In fact, most values were close to 5% of the recommended daily allowances. The content of vitamin E is very dependent on the type and quantity of the plant oil used, the values therefore ranged between 3–116% of the recommended daily allowances. One 100g salad serving does not contribu-

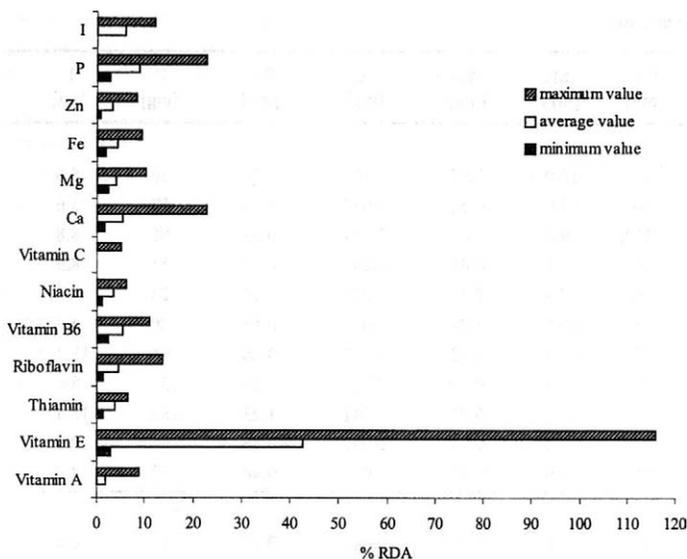


Fig. 1. Content of selected nutrients in 100 g of salad related to RDA

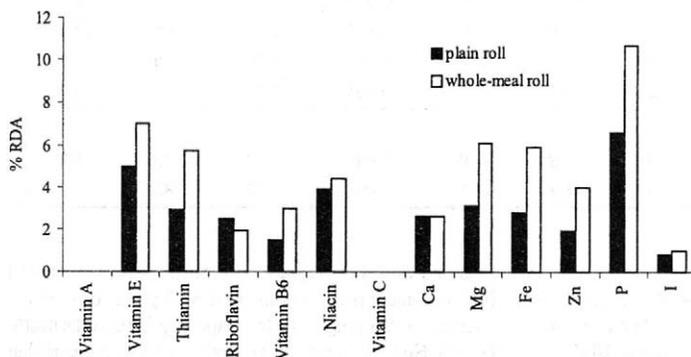


Fig. 2. Content of selected nutrients in 1 roll related to RDA

to more than 10% of the recommended daily allowances of selected minerals to the organism, except for Camembert and Dutch salad contributing some 23% of calcium and phosphorus.

Fig. 2 shows that neither plain roll nor whole-meal roll contributes significantly to the fulfilment of the recommended daily allowances of selected nutrients. The content of all observed nutrients in rolls did not exceed 10% of their recommended daily allowances. However, it should be stressed that, except for calcium and riboflavin, consuming whole-meal rolls rather than plain rolls covers their recommended daily allowances more fully.

It can be concluded that the analysed delicatessen salads, with some exceptions, have low saccharide content and all the non-mayonnaise samples also have low fat content. On the other hand, it is necessary to warn against high fat content and consequently high energy value of mayonnaise salads.

In most cases, delicatessen salads in 100g servings supply the human organism with no more than 10% of the recommended daily allowances of selected vitamins and minerals. The exceptions are vitamins A, C, B₁ and niacin, their content in salads being even lower. On the other hand, the majority of mayonnaise salads are a sufficient source of vitamin E considering its recommended daily allowances. As for the content of calcium and phosphorus, out of the observed salad samples, Camembert and Dutch salads were rather good sources of these factors. Whole-meal roll is a better source of vitamins and minerals than the plain roll, except for riboflavin and calcium.

References

- DONG M. H., MCGOWN E. L., SCHWENNEKER B. W., SAUBERLICH H. E. (1980): Thiamin, riboflavin, and vitamin B₆ contents of selected foods as served. *J. Am. Dietet. A.*, 76: 156-160.

- ERBERSDOBLER H. (1997): Ernährungsphysiologische Bewertung von Fast food auf der Basis von Backwaren. *Ernährung/Nutrition*, 21: 500–503.
- GREENFIELD H., CHUAH L. K., WILLS R. B. H. (1981): Composition of Australian foods. 12. Hamburgers. *Food Technol. Aust.*, 33: 619–620.
- GREENFIELD H., WIMALASIRI P., MA S. N. N., WILLS R. B. H. (1982): Composition of Australian foods. 16. Foods from *Pizza Hut* restaurants. *Food Technol. Aust.*, 34: 364–367.
- HEINONEN M. I., OLLILAINEN V., LINKOLA E. K., VARO P. T., KOIVISTOINEN P. E. (1989): Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits and Berries. *J. Agr. Food Chem.*, 37: 655–659.
- MŇUKOVÁ J. (1980): Některé nutriční změny u zmrazených pokrmů. *Výživa lidu*, 25: 134–135.
- PERLÍN C. (1992): *Potravinové tabulky*. I. díl. Společnost pro výživu, Praha.
- PERLÍN C. (1993): *Potravinové tabulky*. II. díl. Společnost pro výživu, Praha.
- WILLS R. B. H., GREENFIELD H. (1980): Composition of Australian foods. 3. Foods from a major fast-food chain. *Food Technol. Aust.*, 32: 363–366.
- WILLS R. B. H., GREENFIELD H. (1982): Composition of Australian foods. 18. Foods from Kentucky Fried Chicken. *Food Technol. Aust.*, 34: 566–569.
- WILLS R. B. H., KUO Y. L., LIM J. S. K., GREENFIELD H. (1985): Composition of Australian foods. 27. Vitamins in take-away foods. *Food Technol. Aust.*, 37: 162–163.
- Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a prováděcí vyhlášky. (Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 293 ze dne 28. 11. 1997 o způsobu výpočtu a uvádění výživové (nutriční) hodnoty potravin a o značení údaje o možném nepříznivém ovlivnění zdraví).
- ČSN 56 0050 (1969): Stanovení kyseliny L-askorbové.
- ČSN 56 0051 (1987): Stanovení niacinu (kyseliny nikotinové).
- ČSN 56 0052 (1969): Stanovení thiaminu (vitaminu B₁).
- ČSN 56 0054 (1971): Stanovení riboflavinu (vitaminu B₂).
- ČSN 56 0056 (1981): Stanovení vitaminu B₆ v poživatinách.

Received for publication August 10, 1999

Accepted for publication September 28, 1999

Souhrn

MAŠKOVÁ E., FIEDLEROVÁ V., HOLASOVÁ M., RYSOVÁ J. (1999): **Nutriční hodnota vybraných lahůdkových salátů.** *Czech J. Food Sci.*, 17: 176–181.

Lahůdkové saláty se řadí k výrobkům rychlého občerstvení konzumovaných převážně v České republice, ale doposud nejsou známy údaje o jejich nutriční hodnotě. Bylo provedeno nutriční hodnocení 11 druhů majonézových salátů (bramborový, vlašský, pochoutkový, kempink, hanácký, fazolový, islandský, hermelínový, holandský, rybí, vajíčkový), 6 salátů bez majonézy (mrkvový, zelný, kukuřičný, tofu, jarní, letní) a 2 různých druhů pečiva (běžné a celozrnné typu kornšpic). Ve výrobcích bylo experimentálně zjištěno základní složení, obsah některých vitaminů (B₁, B₂, B₆, niacin, C, E, A, karotenoidy, karoteny) a minerálních látek (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, P, I). V konečné fázi byl odhadnut přínos konzumace průměrné 100g porce salátu a 1 kusu pečiva k naplnění denní doporučené dávky některých sledovaných výživových faktorů. Výsledky nutričního hodnocení lahůdkových salátů a pečiva jsou uvedeny v tab. 1–3. Obsah vybraných živin ve 100g porci salátu a 1 kusu pečiva vzhledem k jejich doporučené denní dávce pro dospělého člověka je uveden na obr. 1 a 2. Analyzované lahůdkové saláty mají, až na výjimky, nízký obsah sacharidů a všechny nemajonézové vzorky i nízký obsah tuků. Naopak všechny majonézové saláty vykázaly vysoký obsah tuků a energetickou hodnotu. Saláty ve 100g porci dodají lidskému organismu ve většině případů maximálně do 10 % doporučené denní dávky vybraných vitaminů a minerálních látek. Výjimkou jsou vitaminy A, C, B₁ a niacin, jejichž obsah v salátech byl ještě nižší. Naopak většina majonézových salátů je dostatečným zdrojem vitaminu E vzhledem k jeho doporučené denní dávce. Hermelínový a holandský salát obsahují ve 100g porci přibližně 23 % denní doporučené dávky vápníku a fosforu. S výjimkou riboflavinu a vápníku je pečivo typu kornšpic lepším zdrojem vitaminů a minerálních látek než běžné pečivo.

Klíčová slova: salát; pečivo; základní složení; thiamin; riboflavin; vitamin B₆; niacin; vitamin C; vitamin E; vitamin A; minerální látky

Corresponding author:

Ing. EVA MAŠKOVÁ, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: e.maskova@vupp.cz

Detection of Sunflower and Soybean Oil Adulterated with Rapeseed Oil

IVAN BOHAČENKO and ZDENA KOPICOVÁ

Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

BOHAČENKO I., KOPICOVÁ Z. (1999): **Detection of sunflower and soybean oil adulterated with rapeseed oil.** Czech J. Food Sci., 17: 182–187.

Erucic acid, α -linolenic acid and brassicasterol were tested as markers proving the adulteration of sunflower and soybean oils with rapeseed oil. The results of the analyses of plant oils showed that erucic acid can only be used as a marker of such adulteration by massive additions of rapeseed oil. The reason of this is its low and fluctuating content in oils produced from non-erucic rapeseed (rapeseed oils in quality "00" – averaging 0.4% of total fatty acids). This was a source of difficulties in cases where low additions of rapeseed oil were determined and the content of erucic acid fluctuated near the detection limit of the analytical method used. Similarly, α -linolenic acid can only be used as a supporting marker of the presence of rapeseed oil, due to the permitted range of its content in sunflower oil. Brassicasterol appeared as a highly indicative marker, which was lacking in both sunflower and soybean oils, but was found in rapeseed oil, averaging 1400 mg/kg. Its peak could be identified very easily in chromatograms, with the possibility of calculating the probable amount of rapeseed oil added. A spot-check survey of the incidence of this kind of plant oil adulteration was carried out in retail outlets. Its results indicate that sunflower and soybean oils of both local and foreign provenance, or their mixtures, containing lesser to major addition (3–25%) of rapeseed oil, are sold rather frequently in this country.

Key word: adulteration; sunflower oil; soybean oil; rapeseed oil; brassicasterol; erucic acid

Food adulteration is presently a world-wide problem. The countries with advanced economy have paid much attention to it in the long run, from the viewpoint of both trade relations and consumer protection. After the switch-over of the Czech Republic to the market economy system, connected with the acceptance of international trade conditions (especially those of the European Union), these aspects are also increasingly implemented in this environment.

Plant oils belong to the food commodities with their authenticity closely observed. The adulteration of more expensive plant oils by cheaper oils has been known for a long time (GROB 1993; YAMAZAKI *et al.* 1994) and a number of methods for its unequivocal proof were worked out (FIRESTONE 1997; GROB *et al.* 1994a, b, c; WHITE 1997). The countries producing plant oils as one of their most significant export commodities (e.g., Italy, Spain, and Greece) play an important role here. They are exceedingly interested in proving oil authenticity, especially in olive oils (JIMENÉZ DE BLAS *et al.* 1996; PALLOTA 1994).

The respective kinds of refined and non-refined oils differ from one another in various aspects. One of them is the abundance of fatty acids, but the utilization of this parameter for the determination of oil authenticity may

often be rather problematic. The reason is a wide permitted range of their percentage in various oils (procedural regulation No. 328/1997 Sb. of the Act No. 110/1997 Sb.), which complicates the identification of the violation of permitted limits.

The differentiation of oils according to the composition of their sterol fraction, which is so characteristic of each plant oil, showed to be more indicative. The content of its components, i. e., of respective sterols, fluctuates within a much narrower range than in fatty acids, and if there is any foreign oil contained, its presence can be proved more easily in this way. However, it is necessary to point out that desterolized oils, which are obtained by strong conditions of refining, e.g., by bleaching at 150–180°C with 5–7% earth added, are also used for adulteration. MARIANI *et al.* (1992) demonstrated that a part of the sterols is adsorbed to the earth, the other part is dehydroxylated, predominantly producing the olefinic degradation products. Modern analytical methods are able to detect even this malpractice because it is possible to determine sterol degradation products in desterolised oils that are used for adulteration (BIEDERMANN *et al.* 1996; GROB *et al.* 1994a, b).

Finally, it should be mentioned that other analytical techniques also are introduced to prove the authenticity of

plant oils. Near infrared spectroscopy (NIR) (WESLEY *et al.* 1995, 1996), isotopic methods using gas chromatography coupled to an isotopic ratio mass spectrometer (GC-C-IRMS), site-specific natural isotopic fractionation studied by nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR) (ROYER *et al.* 1997), and pyrolysis mass spectrometry (PY-MS) (GUILLOU *et al.* 1997) can be mentioned.

The methods developed for the determination of fatty acids and sterols in plant oils mainly include gas chromatography (GC) and high pressure liquid chromatography (HPLC) techniques, often combined with pre-purification by thin layer chromatography (TLC). To determine fatty acids with the GC method, oils are first re-esterified in an acid or alkaline way, when their methyl esters are obtained. The sterol fraction is most frequently obtained from the unsaponifiable fraction, which can be further analysed by help of GC, HPLC, GC-MS, GC with pre-purification on TLC or LC-GC (ABOU HADEED *et al.* 1990; ALONSO *et al.* 1997; AMATI *et al.* 1971; FREGA *et al.* 1992).

Even though in other countries the authenticity of olive oils is most frequently assayed, we directed our attention to proving the adulteration of sunflower and soybean oils by the admixture of rapeseed oil for the following reasons:

- these three oils are most frequently consumed in this country, whereas olive oil should be rather considered as a luxury, having only limited consumption;
- sunflower, soybean and particularly rapeseed oils are produced in the Czech Republic, but also imported either in original packaging, or in bulk and subsequently bottled locally;
- the average price of rapeseed oil is lower than that of sunflower or soybean oil;
- rapeseed oil of local provenance is easily accessible because sufficient sources of raw material for its production are available in the Czech Republic.

We decided to use two markers for the proof of the adulteration by rapeseed oil, i. e., erucic acid and brassicasterol, which should be lacking in both sunflower and soybean oils. The content of α -linolenic acid could also serve as a supporting marker in sunflower oil, because its presence in sunflower oil should not exceed 1.5%, whereas in rapeseed oil it ranges from 6 to 14%. The α -linolenic acid is not suitable as a marker for tests of soybean oil, because it is contained in that oil within the range of 4–11% (see the procedural regulation No. 328 cited above). The purpose of this study was to implement and validate analytical methods for the determination of these substances, and to survey the local market for the preliminary evaluation of the incidence of this kind of adulteration.

MATERIAL AND METHODS

The analyses were carried out by help of a gas chromatograph HP 5890A with FID detection (Hewlett Packard), injection: split 20 : 1, carrier gas: nitrogen 4.8.

Standards: Erucic Acid Methyl ester, purity min. 99% (SIGMA); Fatty Acid Methyl ester Kit – saturated and unsaturated, purity min. 99% (SIGMA); Brassicasterol, 1 mg/1 ml CH_2Cl_2 , purity min. 95% (LARODAN); Dihydrocholesterol (3β -OH-5 α -cholestan), purity min. 95% (SIGMA); β -Sitosterol Practical: from soybeans, 40%, containing campesterol and stigmasterol (SIGMA).

Chemicals: Hexan SupraSolv for organic trace analysis (MERCK); Diethylether GR ACS (MERCK); Methanol LichroSolv for chromatography (MERCK); Ethanol for UV spectroscopy (LACHEMA); Isopropyl alcohol p.a. (LACHEMA); Pyridin p.a. >99% (MERCK); Hexamethyldisilazan (HMDS) purum >98% (FLUKA); Trimethylchlorosilan (TMCS) puriss. >99.5% (FLUKA).

The following 45 oil samples were purchased for the survey of the retail network: 11 rapeseed oils, 20 sunflower oils, 10 soybean oils and 4 oils declared as mixtures of sunflower and soybean oils. Out of these, 35 were produced in the Czech Republic and 10 were imported.

Determination of Fatty Acids

Fatty acid methyl esters were prepared by a modified method (BANNON *et al.* 1985).

A sample oil (0.3 g) was simmered with 25 ml of 0.2% solution of KOH in methanol. After the reaction was terminated, fatty acid methyl esters were extracted twice by 20 ml of diethyl ether and the combined ether layers were washed with water to neutral reaction. After a careful evaporation of the extracting agent the residue was dissolved in 5 ml of isooctane and used for analysis by capillary gas chromatography under the following conditions:

Column: DB-23 (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); temperature: injector 220°C; detector 300°C; constant column 200°C; total time of analysis 55 min; column flow rate 1.62 ml/min

The following analytical parameters for erucic acid were found: detection limit 0.03 % of total fatty acids and relative standard deviation of 10 determinations $\text{RSD}_r = 3.72\%$.

Determination of Brassicasterol

Determination was carried out by a modified method (AOAC 1990; SLOVER *et al.* 1983).

Oil sample (0.5 g) of the plant oil tested was saponified by boiling with 4 ml of concentrated KOH solution (60 g/40 ml water) in 20 ml of alcohol solution (ethanol : methanol : isopropylalcohol = 95 : 5 : 5) for 1 hr. The unsaponifiable fraction was extracted into hexane, and subsequently purified with water until the alkaline reaction disappeared, and then desiccated with sodium sulphate. A 0.2 ml aliquot of a solution of dihydrocholesterol (concentration 1 mg in 1 ml of hexane) was used as an internal standard. After the evaporation of the solvent by help of a rotatory vacuum evaporator at a temperature not exceeding 50°C the residue was silylated with 0.3 ml of silylating agent (pyridine : HMDS : TMCS = 9 : 3 : 1).

After 15 min the sample was analyzed by the capillary gas chromatography method under the following conditions:

Column: DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); temperature: injector 300°C; detector 320°C; constant column 270°C; column flow rate 1.25 ml/min; total time of analysis less than 40 min.

The result shown is the mean of two parallel determinations.

The following analytical parameters for brassicasterol were found: detection limit 30 mg/1 kg oil and relative standard deviation of 10 determinations $RSD_r = 3.60\%$.

Yield calculated from five independent determinations of dihydrocholesterol as an internal standard: 95-110%.

RESULTS AND DISCUSSION

The implementation and validation of the analytical methods for fatty acid and brassicasterol determination in plant oils, as described above, were carried out.

The use of erucic acid as a marker to prove the presence of rapeseed oil in sunflower or soybean oil, or in their mixtures, cannot be recommended without any reservation. The results shown in Table 1 indicate that its content in rapeseed oils examined, which were manufactured from non-erucic rapeseed, was very low, averaging 0.40% of total fatty acids (max. 0.99%; min. 0.16%).

Table 1. Content of analytical markers in samples of local rapeseed oils obtained from retail outlets

Sample	Fatty acid		Brassicasterol [mg/kg]
	α-linolenic % of total FA	erucic % of total FA	
1	7.90	0.25	1461.87
2	8.89	0.29	1457.25
3	8.59	0.28	1544.01
4	7.78	0.27	1472.93
5	6.76	0.32	1412.37
6	7.62	0.27	1401.30
7	7.37	0.99	1476.58
8	5.90	0.18	1320.03
9	4.83	0.16	1304.91
10	7.38	0.97	1516.90
11	8.48	0.30	1111.65
Average	7.41	0.39	1407.25

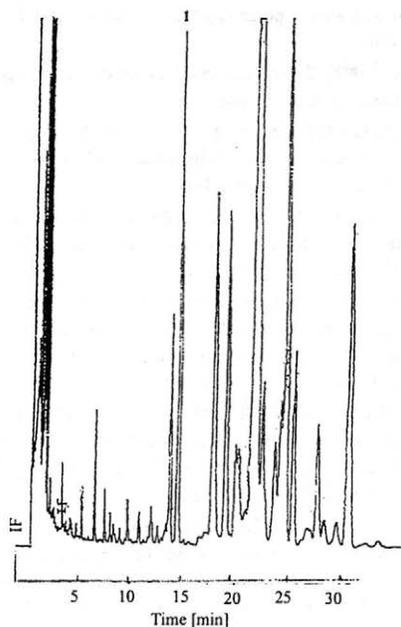
Consequently, it can be expected that the addition of 10-15% rapeseed oil to sunflower oil, a significant amount from the point of adulteration, will probably result in the erucic acid content ranging from 0.04 to 0.06%. Yet this quantity of erucic acid is at the sensitivity limit of the method used, apart from the fact that the results can be subject to rather significant error. This fact is in conformity with our data on the content of this compound in

sunflower and soybean oils obtained from food retail outlets (Table 2), when in many cases erucic acid not detected though the other marker, brassicasterol, was found at

Table 2. Content of analytical markers in sunflower and soybean oils obtained from retail outlets

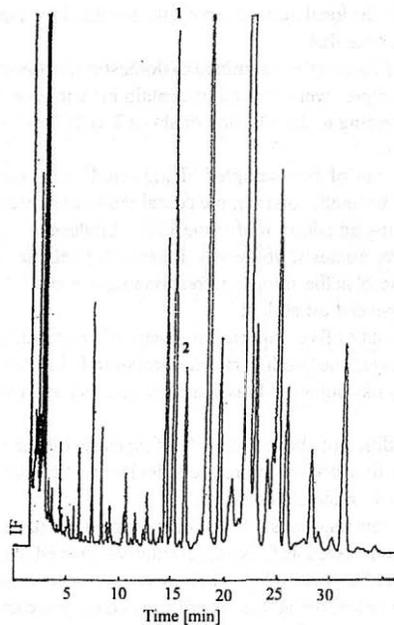
Sample	Fatty acid		Brassicasterol [mg/kg]
	α-linolenic % of total FA	erucic % of total FA	
Local sunflower oils			
1	1.65	0.10	343.56
2	1.43	0.03	265.34
3	1.89	0.07	313.33
4	0.53	0.03	89.91
5	1.71	0.05	310.85
6	1.42	0.06	257.82
7	0.60	0.03	147.64
8	0.21	n.d.	n.d.
9	0.27	n.d.	42.41
10	0.22	n.d.	n.d.
11	0.30	n.d.	48.72
12	0.46	n.d.	107.06
13	0.38	n.d.	52.00
14	0.18	n.d.	26.56
15	0.29	n.d.	67.05
Imported sunflower oils			
16	1.02	0.07	234.52
17	0.07	n.d.	n.d.
18	0.11	n.d.	n.d.
19	0.11	n.d.	n.d.
20	0.14	n.d.	n.d.
Local soybean oils			
1	6.21	n.d.	137.43
2	5.74	n.d.	29.59
3	6.86	n.d.	97.07
4	5.94	0.03	260.70
5	6.62	n.d.	99.61
Imported soybeans oils			
6	8.00	n.d.	n.d.
7	5.87	n.d.	n.d.
8	5.47	n.d.	n.d.
9	7.73	0.27	1150.31
10	5.49	n.d.	145.21
Mixture of soybean and sunflower oils			
1	3.40	n.d.	159.74
2	3.62	0.03	232.40
3	3.30	n.d.	170.87
4	2.91	n.d.	152.59

n.d. - below detection limit



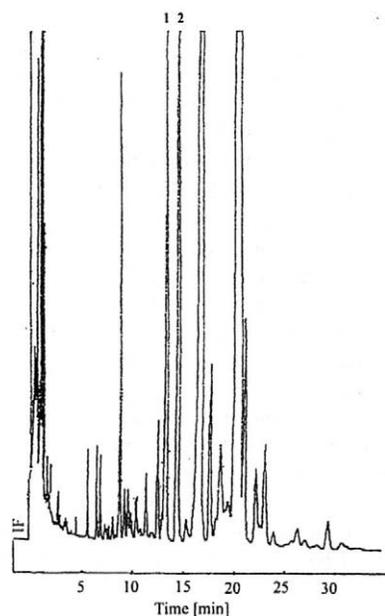
1 - dihydrocholesterol (internal standard)

Fig. 1. Gas chromatogram of the unsaponifiable fraction of pure sunflower oil



1 - dihydrocholesterol (internal standard); 2 - brassicasterol

Fig. 2. Gas chromatogram of the unsaponifiable fraction of sunflower oil containing brassicasterol



1 - dihydrocholesterol (internal standard); 2 - brassicasterol

Fig. 3. Gas chromatogram of the unsaponifiable fraction of rapeseed oil

easily detectable concentrations. It can be concluded that erucic acid as a marker could be applied only in cases of massive additions of non-erucic rapeseed oil.

The evaluation of the content of α -linolenic acid, a supporting marker in the adulteration proof of sunflower oil by rapeseed oil, represents a similar situation. Based on the results of analyses shown in Table 2, it can be stated that its content exceeding 0.7% of total fatty acids indicated with rather high probability the addition of more than 10% of rapeseed oil. Also, it was observed that this coincided with the decrease of linoleic acid below 60% and the increase of oleic acid above 20%. Yet it is very difficult to use these data for an unequivocal proof of this way of sunflower oil adulteration. The respective fatty acid pattern, or its changes, fall into the approved fluctuation tolerances (linolenic acid max. 1.5%; linoleic acid 20-75%; oleic acid 14-65%, see the above-mentioned procedural regulation No. 328/1997 Sb.).

Brassicasterol can be used as an indicative marker of the adulteration of refined sunflower and soybean oil with non-sterilised rapeseed oil. Its peak could be easily identified on chromatograms (Figs 1-3). In addition, as its concentration is determined in terms of mg/kg oil, the probable amount of rapeseed oil added can be calculated. As the content of brassicasterol in this oil averaged 1400 mg/kg (Table 1) and the sensitivity of the method used by us equalled 30 mg brassicasterol per kg oil, it follows that the presence of rapeseed oil can be detected starting from a 2% admixture.

As for the local market survey, the results shown in Table 2 indicate that

- out of 15 samples examined of domestic sunflower oils, 13 samples were proved to contain brassicasterol corresponding to the addition of about 3 to 25% of rapeseed oil;
- three out of five samples of imported sunflower oils were authentic, one sample contained brassicasterol indicating an addition of some 17% of rapeseed oil;
- all five domestic soybean oil products contained brassicasterol at the amount corresponding to some 2 to 19% of rapeseed oil added;
- three out of five imported soybean oils were authentic; however, one product rather corresponded to rapeseed oil by its content of brassicasterol and its fatty acid pattern;
- an addition of about 10 to 17% of rapeseed oil was found in all four domestic products declared as mixtures of sunflower and soybean oils.

Even this random survey of domestic oil retail, naturally not considered as fully representative, proved that sunflower and soybean oils, or their mixtures, adulterated with a larger or smaller additions of rapeseed oil, are currently sold. Consequently, attention should be paid to the monitoring of the authenticity of these products.

References

- ABOU HADEED A. M. F., KOTB A. R., DANIELS C. E. J. (1990): A data processing method for the determination of the concentration of the components of unsaponifiable matter in vegetable oils. *Food Chem.*, **35**: 167-178.
- ALONSO L., FONTECHA J., LOZADA L., JUÁREZ M. (1997): Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography. *J. AOCS*, **74**: 131-135.
- AMATI A., CARRARO ZANIRATO F., FERRI G. (1971): Determinazione degli steroli negli oli d'oliva vergini italiani. Applicazione al controllo della genuinità. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **48**: 39-44.
- AOAC (1990), *é*. 976.26.
- BANNON C. D., CRASKE J. D., HILLIKER A. E. (1985): Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *J. AOCS*, **62**:1501-1507.
- BIEDERMANN M., GROB K., MARIANI C., SCHMIDT J. P. (1996): Detection of desterolized sunflower oil in olive oil through isomerized delta7-sterols. *Z. Lebensm. Unters. Fors.*, **202**: 199-204.
- ČSN 58 873 mod. ISO 3596-2 (1994).
- FIRESTONE D. (1997): Fats and oils. General Referee Reports: *J. AOAC Int.*, **80**: 140-143.
- FREGA N., BOCCI F., LERCKER G. (1992): Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary column. *J. AOCS*, **69**: 447-450.
- GROB K. (1993): The detection of adulterated edible oils and fats. *Lipid Technol.*, **5**: 144-146.
- GROB K., GIUFFRÉ A. M., BIEDERMANN M., BRONZ M. (1994a): The detection of adulteration with desterolized oils. *Fat. Sci Technol.*, **96** : 341-345.
- GROB K., GIUFFRÉ A. M., BIEDERMANN M., BRONZ M. (1994b): Methoden zur Erkennung verfälschter Speiseöle. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **85**: 340-350.
- GROB K., GIUFFRÉ A. M., BIEDERMANN M., BRONZ M. (1994c): Resultate einer Kontrolle von Speiseölen: Fälschungen durch Zumischungen, Verunreinigungen. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **85**: 351-365.
- GUILLOU C., ANKLAM E., LIPP M., RADOVIC B. (1997): Application of pyrolysis-mass spectrometry (PY-MS) for authenticity proof of food. In: *Proc. 4th Europ. Symp. Food Authenticity*. La Baule, France.
- JIMENÉZ DE BLAS O., DEL VALLE GONZÁLEZ A. (1996): Determination of sterols by gas chromatography. Differentiation among different types of olive oil: Virgin, refined, and solvent-extracted. *J. AOCS*, **73**: 1685-1689.
- MARIANI C., VENTURINI P., BONDIOLI E., FEDELI E., GROB K. (1992): Valutazione delle variazioni indotte dalla decolorazione sui principali componenti minori ed esterificati dell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **69**: 393-399.
- PALLOTA U. (1994): A review of Italian research on the genuineness and quality of extra virgin olive oil. *Ital. J. Food Sci.*, **6**: 259-274.
- ROYER A., NAULET N., LEES M., MARTIN G. J. (1997): Isotopic analysis for the authentication of extra-virgin olive oils. In: *Proc. 4th Eur. Symp. Food Authenticity*. La Baule, France.
- SLOVER H. T., THOMPSON JR R. H., MEROLA G. V. (1983): Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography. *J. AOCS*, **60**: 1524-1528.
- VYHLÁŠKA č. 328 Zákona o potravinách č.110/1997Sb.
- WESLEY I. J., BARNES R. J., MCGILL A. E. J. (1995): Measurement of adulteration of olive oils by near-infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**: 289-292.
- WESLEY I. J., PACHECO F., MCGILL A. E. J. (1996): Identification of adulterants in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**: 515-518.
- WHITE P. J. (1997): Method for evaluating authenticity of edible fats and oils. In: *Proc. 4th Eur. Symp. Food Authenticity*. La Baule, France.
- YAMAZAKI M., NAGAO A., YAMAMOTO H. (1994): Estimation of the mixing ratio of a foreign oil in an adulterated sesame oil. II. Rice bran oil or rapeseed oil. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **43**: 10-17.

Received for publication August 24, 1999

Accepted for publication September 14, 1999

Souhrn

BOHAČENKO I., KOPICOVÁ Z. (1999): **Průkaz falšování slunečnicového a sójového oleje olejem řepkovým.** Czech J. Food Sci., 17: 182–187.

Byla ověřena možnost využití kyseliny erukové, α -linolenové a brassicasterolu jako markerů pro falšování slunečnicového a sójového oleje olejem řepkovým. Z výsledků analýz rostlinných olejů vyplynulo, že kyselinu erukovou jako marker tohoto způsobu falšování lze využít pouze pro identifikaci masivních přísadků řepkového oleje. Důvodem je její nízký a rozkolísaný obsah v olejích vyráběných z bezerukové řepky (řepkové oleje kvality "00" – v průměru 0,4 % z celkového zastoupení mastných kyselin). To pak činilo obtížné při stanovení v případech nižších přísadků řepkového oleje, kdy se obsah erukové kyseliny pohyboval na hranici citlivosti námi použité metody. Kyselinu α -linolenovou lze rovněž využít pouze jako podpůrný marker přítomnosti řepkového oleje vzhledem k rozmezí jejího povoleného obsahu ve slunečnicovém oleji. Jako vysoce průkazný marker se projevil brassicasterol, který není ve slunečnicovém ani sójovém oleji obsažen, zatímco v řepkovém oleji jej bylo nalezeno v průměru 1 400 mg/kg. Jeho pik byl na chromatogramu velmi dobře identifikovatelný, navíc je možné vypočítat pravděpodobný přísadek řepkového oleje. Na základě výsledků namátkového průzkumu trhu provedeného za účelem posouzení četnosti výskytu tohoto způsobu falšování lze konstatovat, že u nás jsou často prodávány slunečnicové a sójové oleje domácí i zahraniční provenience, resp. jejich směsi, obsahující větší či menší (3–25%) přísadek řepkového oleje.

Klíčová slova: falšování; slunečnicový olej; sójový olej; řepkový olej; brassicasterol; kyselina eruková

Corresponding author:

Ing. IVAN BOHAČENKO, CSc., Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: i.bohacenko@vupp.cz

Teplotní historie chlazeného kuřete od zpracování do kulinární úpravy včetně analýzy nebezpečí růstu vybraných mikroorganismů*

MILAN HOUŠKA¹, ALEŠ LANDFELD¹, JAN STROHALM¹, KAREL KÝHOS¹, PAUL NESVADBA²

¹Výzkumný ústav potravinářský Praha, Praha, Česká republika; ²The Robert Gordon University, School of Applied Sciences, St. Andrew Street, Aberdeen, Scotland, UK

Abstract

HOUŠKA M., LANDFELD A., STROHALM J., KÝHOS K., NESVADBA P. (1999): **Thermal history of chicken during processing and transport for a FMM-assisted analysis of microbial growth risk.** Czech J. Food Sci., 17: 188–195.

The thermal history of chicken carcasses has been measured and analysed in the processing line (cooling tunnel, storage) and during transport. The effective surface heat transfer coefficient was predicted in these situations. The thermal properties of the chicken meat were predicted by using modified predictive software COSTHERM2. The simulation of the thermal conduction problem inside the chicken breast muscle was performed by using the HEATSOLV computational software. The measured and simulated thermal histories were used and then step by step analysis was carried out using the predictive database Food Micro Model. Possible growth of the most dangerous pathogenic micro-organisms was predicted.

Key words: chilled chicken; thermal history; hazard analysis; potential growth of micro-organisms

Souhrn

HOUŠKA M., LANDFELD A., STROHALM J., KÝHOS K., NESVADBA P. (1999): **Teplotní historie chlazeného kuřete v průběhu zpracování a dopravy včetně analýzy nebezpečí růstu vybraných mikroorganismů.** Czech J. Food Sci., 17: 188–195.

Teplotní historie chlazených opracovaných kuřat byla experimentálně stanovena od porážky přes chlazení, skladování, dopravu až po prodej. V úvahu byly vzaty nejhorší reálné historie pro povrchovou vrstvu. S využitím kovového modelu kuřete a numerického modelování byly odhadnuty součinitele povrchového přestupu tepla (SHTC) při chlazení kuřete ve vybraném chladičím tunelu a při dopravě v transportní bedně (volná konvekce v uzavřeném prostoru). Tepelné vlastnosti kuřecího masa byly odhadnuty ze složení s využitím prediktivní databáze COSTHERM2. Simulace vedení tepla v prsním svalu kuřete byla provedena za zjednodušujících předpokladů s využitím programu HEATSOLV. Měřené a simulované teplotní historie byly zjednodušeny do tvaru schodovité funkce a krok po kroku byl analyzován potenciální růst vybraných patogenních mikroorganismů s využitím prediktivní databáze Food Micro Model. Pro stanovenou teplotní historii bylo stanoveno nebezpečí růstu zejména pro psychrotrofní druhy mikroorganismů. Nejméně zvládnutou fází chladičích řetězců se jeví prodej, donáška domů a skladování v domácnosti.

Klíčová slova: chlazené kuře; teplotní historie; analýza nebezpečí; potenciální růst mikroorganismů

Výroba chlazených kuřat v poslední době v České republice výrazně vzrostla vzhledem k pohotovosti výrobku ke kulinární úpravě i k lepším organoleptickým vlastnostem v porovnání s mraženými kuřaty. Tento nárůst produkce byl umožněn investicemi do výrobních zařízení (zejména nová chladičící zařízení pracující na principu chlazení ledovým vzduchem místo vodních lázní). Na druhé straně se vyžaduje striktní kontrola a řízení tep-

loty produktu v celém chladičím řetězci, protože ve spojení s reálnými podmínkami distribuce a chováním spotřebitelů se zvyšuje riziko růstu patogenních mikroorganismů.

Tato práce se zabývá stanovením reálné teplotní historie ve výrobě, dopravě a distribuci včetně kvantitativní analýzy možného růstu vybraných patogenních mikroorganismů.

*Práce byla vypracována s podporou MZe ČR, grant č. EP0960006260.

MATERIÁL A METODY

Měření teplot, pH a vodní aktivity

K měření teplotních historií byla použita paměťová teplotní čidla Tynitalk firmy Gemini (Velká Británie), která byla opatřena čidly Pt100 s dobou náběhu v kapalině nebo pevné látce 60 s. Při měření teploty okolního vzduchu se tato doba prodlužuje na 10 minut. K měření okamžitých hodnot teploty kuřecího masa na porážkové lince byl použit digitální vpichovací teploměr Therm (Ahlborn Mess-technik, Německo).

Hodnoty pH a vodní aktivity kuřecí kůže (bez podkožního tuku) byly stanoveny v homogenátu připraveném z ručně oddělené kůže z oblasti prsního svalu kuřete v den odebrání z výrobní linky. Ke stanovení pH byl použit vpichovací polovodičový pHmetr, ke stanovení aktivity vody přístroj Novasina (Švýcarsko). Stanovení bylo provedeno servisně v laboratoři OHES Kladno.

Stanovení součinitele přestupu tepla

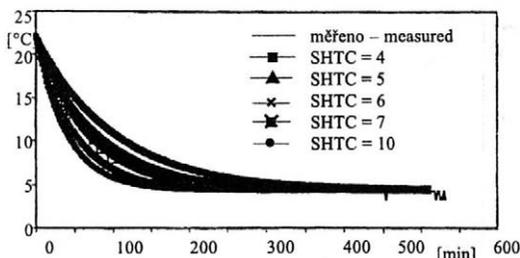
Matematickým modelem teplotní historie kuřecího těla lze stanovit konkrétní průběh teploty v každém místě za předpokladu, že známe průběh teploty okolního vzduchu a zejména součinitel přestupu tepla (surface heat transfer coefficient – SHTC). Na znalosti tohoto součinitele, který udává tepelný tok jednotkou plochy při jednotkovém teplotním spádu a který je závislý na rychlosti proudění média okolo tělesa, je závislá přesnost výpočtu. Proto byly hodnoty tohoto součinitele stanoveny experimentálně v podmínkách, pro něž modelování má největší význam, tj. zejména chlazení kuřete ve visu v chladicím tunelu (nucená konvekce při rychlosti obtékání vzduchu cca 0,4 až 0,6 m/s) a při dopravě nebalených kuřat volně ležících na polypropylenových podložních miskách v transportní přepravce zakryté fólií (volná konvekce v uzavřeném prostoru).

Hodnoty SHTC byly stanoveny měřením teplotní historie během chlazení a ohřevu kovového modelu kuřecího těla (měřeno uprostřed prsního svalu a stehna). Kovo-

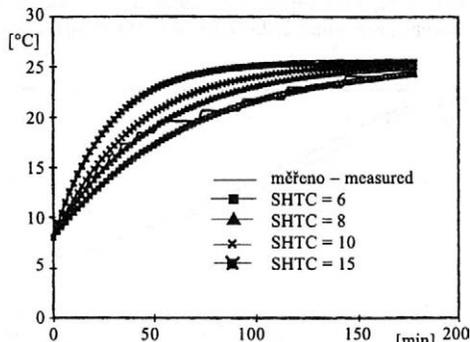
vý model byl odlit do sádrové formy z cínové pájky (1 : 1 cín : olovo), u níž byla odhadnuta tepelná vodivost na 50,6 W/m.K a měrná tepelná kapacita 0,177 kJ/kg.K z hodnot vlastností čistých složek, které udává RAŽNJEVIČ (1985). Naměřené průběhy byly porovnány s výsledky simulačního modelování pomocí programu HEAT-SOLV (NESVADBA1995; ALLEN *et al.* 1997), které bylo provedeno pro různé zadané hodnoty součinitele SHTC (simulace byla provedena pro prsa, jejichž tvar byl zjednodušen do tvaru ploché nekonečně rozlehlé desky o tloušťce 27 mm, což představuje v silném zjednodušení průměrnou tloušťku této části skutečného kuřete). Součinitel přestupu tepla, pro který vypočtený průběh teploty vykázal nejlepší shodu s experimentálními daty, byl považován za průměrnou hodnotu působící při experimentu. Vzhledem k tomu, že byla modelována kovová slitina, tj. velmi tepelně vodivý materiál s mizivou tepelnou kapacitou, bylo možné vliv tloušťky materiálu zanedbat (proto se experimentuje s takto vodivými materiály). Přenos zjištěné hodnoty SHTC na skutečné kuře je možný, i když součinitel pro skutečné kuře může být poněkud větší díky zvětšení přestupu tepla odparem vlhkosti z povrchu. Toto zvýšení bylo možné v našem případě zanedbat, neboť odpar při působících teplotách prakticky neovlivní přestup tepla (i když výrobce chlazených kuřat tento odpar musí respektovat).

Porovnání vypočtených a měřených průběhů teplot při volné konvekci kolem těla kuřete v transportní přepravce je pro chlazení a ohřev uvedeno na obr. 1 a 2. Z obrázků vyplývá, že nejlepší shody je dosaženo pro hodnoty SHTC 6 W/m².K pro chlazení a cca 7 W/m².K pro ohřev. Tyto hodnoty lze dále použít pro simulaci teplotní historie reálných kuřat při dopravě za stejných geometrických podmínek, pokud budeme znát časový průběh teploty vzduchu například v dopravním prostředku.

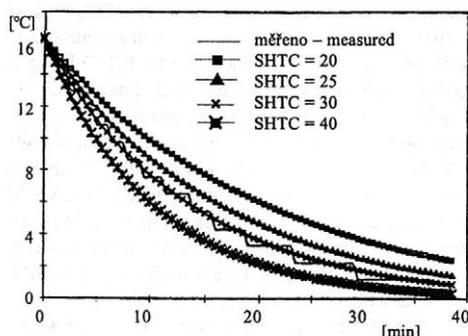
Inspekci (obr. 3) bylo stanoveno, že nejlepší shody experimentálního průběhu chlazení kovového modelu kuřete při jeho průchodu tunelem s vypočtenými průběhy se dosáhne při hodnotě SHTC = 30 W/m².K. Tato hodnota



Obr. 1. Porovnání teplot při chlazení kovového modelu kuřete s predikcemi pro volnou konvekci (teplota vzduchu 4,4 °C) – Comparison of cooling temperature of chicken metal model with prediction for free convection (air temperature 4.4°C)



Obr. 2. Porovnání teplot během ohřevu kovového modelu kuřete s predikcemi pro volnou konvekci (teplota vzduchu 25,5 °C) – Comparison of temperature in heating of chicken metal model with prediction for free convection (air temperature 25.5°C)



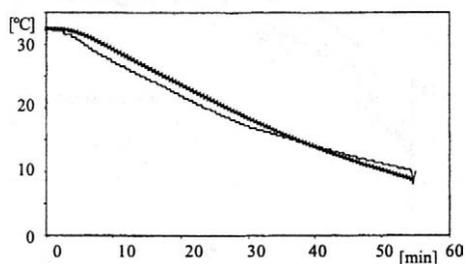
Obr. 3. Porovnání měřených teplot během chlazení kovového modelu kuřete v chladicím tunelu s predikcemi programu HEATSOLV (teplota vzduchu 1 °C) – Comparison of measured temperature during cooling in cooling tunnel of chicken metal model with prediction of software HEATSOLV (air temperature 1 °C)

byla později použita k simulaci průběhu chlazení skutečného kuřete v též chladicím tunelu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Modelování a měření teplotní historie chlazených kuřat

Teplotní historie chlazeného kuřete (hmotnost 1,1 kg) byla měřena ve vybraném závodě, během dopravy (od výrobce k distributorovi) a během prodeje. Nejdůležitější operací u výrobce je chlazení opracovaných kuřecích těl vzduchem v chladicím tunelu. Proto byla pozornost zaměřena na tuto operaci a proběhlo měření teplotní historie reálného kuřete při průchodu chladicím tunelem. Teplota byla měřena uprostřed prsního svalu o střední tloušťce masné části 27 mm. Při měření byla stanovena též rychlost proudění (0,4–0,6 m/s) a teplota vzduchu –6 °C. Pro tyto podmínky byla provedena simulace programem HEATSOLV. Prsní sval byl opět jako v případě kovového modelu nahrazen nekonečnou deskou konstantní tloušťky 27 mm. Tepelné vlastnosti kuřecího masa byly stanoveny programem COSTHERM2 (ALLEN *et al.* 1997)



Obr. 4. Porovnání průběhu teplot s predikcí pro chlazení kuřete v chladicím tunelu (teplota vzduchu –6 °C) – Comparison of measured temperature with prediction for cooling of chicken in cooling tunnel (air temperature 6 °C)

jako funkce teploty (v rozsahu 0–40 °C) na základě tabulárních hodnot základního složení, získaných z tabulek (voda 75 %, bílkovina 22,8 %, tuk 0,9 %, minerály 0,6 %) (SOUCI *et al.* 1989). Střední hodnoty tepelných vlastností v uvedeném rozsahu byly stanoveny takto: tepelná vodivost 0,493 W/m.K, měrná tepelná kapacita od 3,628 do 3,667 kJ/kg.K. Hustota (měrná hmotnost) kuřecího masa byla měřením stanovena na 1 071 kg/m³. Při modelování byla použita hodnota součinitele přestupu tepla SHTC 30 W/m².K. Tato hodnota se musí stanovit pro každý tunel zvlášť (závisí zejména na rychlosti proudění, tvaru zboží, způsobu obtékání, ale i vlhkosti vzduchu apod.). Při modelování byl zanedbán odvod tepla do vnitřní dutiny kuřecího těla vzniklé po vyjmutí vnitřnosti.

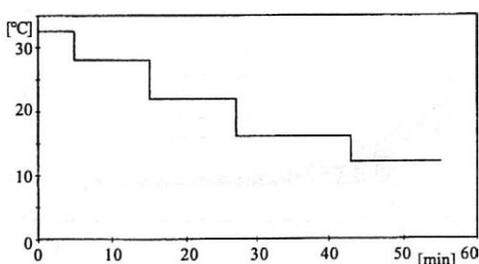
Z porovnání naměřeného a vypočteného průběhu teploty uprostřed prsního svalu kuřete v chladicím tunelu vybraného závodu (obr. 4) je patrné, že se průběhy poměrně dobře shodují. To dává možnost poměrně jednoduše v budoucnu predikovat průběhy chlazení v kritických místech dalších druhů drůbeže bez nutnosti nákladných experimentů, resp. predikovat nutný čas průchodu kuřete dané velikosti daným zařízením (rychlost dopravníku) při přepravení teplotě ve svalu na výstupu ze zařízení.

Predikované, resp. měřené průběhy teploty při chlazení v tunelu byly nahrazeny schodovitou funkcí (obr. 5). Toto zjednodušení je nutné při aplikaci současné verze prediktivní databáze Food MicroModel (MCCLURE *et al.* 1994).

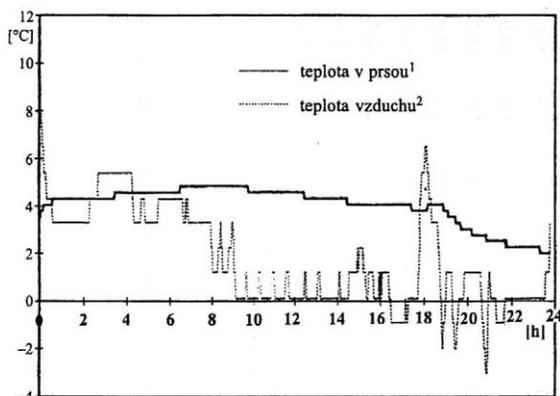
Typický průběh teploty v prsním svalu kuřete a teploty vzduchu v jeho okolí v průběhu dopravy v chladicím voze jsou uvedeny na obr. 6. Rovněž tato historie byla nahrazena schodovitou funkcí nutnou k predikci růstu mikroorganismů.

Analýza potenciálního nebezpečí růstu vybraných mikroorganismů

Zjednodušená teplotní historie opracovaného těla kuřete od jeho porážky až do kuchyně v domácnosti spotřebitele je uvedena v tab. 1 a 2. Byly vybrány a analyzovány nejhorší zjištěné podmínky z provedených experimentů. V tabulkách jsou uvedeny jednotlivé operace nebo úseky



Obr. 5. Náhraza teplotní historie reálného kuřete schodovitou funkcí (chlazení v tunelu) – Substitute of thermal history of real chicken by step function (cooling in tunnel)



Obr. 6. Teplotní historie reálného kuřete během dopravy v chladicím voze – Thermal history of real chicken during transport in refrigerated car

¹temperature in breast; ²air temperature

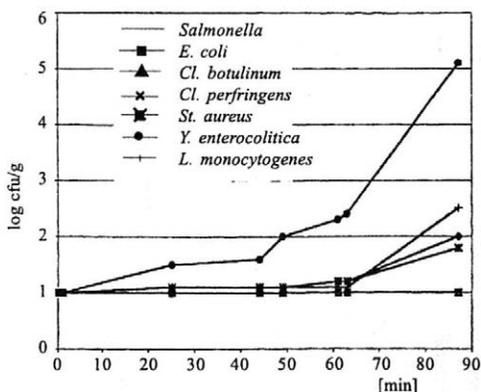
historie od výroby až do domácnosti. V prvním sloupci je uveden průběžný čas, ve druhém střední teploty získané měřením, ve třetím doba trvání jednotlivých úseků historie a v dalších sloupcích počty mikroorganismů jednotlivých patogenů (proškrtnutý úsek znamená, že podmínky neumožňují modelovat růst, neboli že mikroorganismus neroste). V druhém sloupci pod daným mikroorganismem se nalézá veličina vyjadřující, jaké procento (součtově) z doby lag fáze už absolvoval daný mikroorganismus za celou dobu sledování. Tyto údaje byly vypočteny z rovnice [1] na základě hodnot lag fází vypočtených pro podmínky jednotlivých úseků teplotní historie.

Největšímu nebezpečí kontaminace a nejrychlejší změně teploty podléhá povrch kuřecího těla. Proto byla hodnota pH a aktivity vody stanovena právě pro povrchovou vrstvu, tj. pro kůži. Při teplotě 10 °C byly zjištěny hodnoty pH = 5,91 a aktivity vody $a_w = 0,991$ (tab. 1

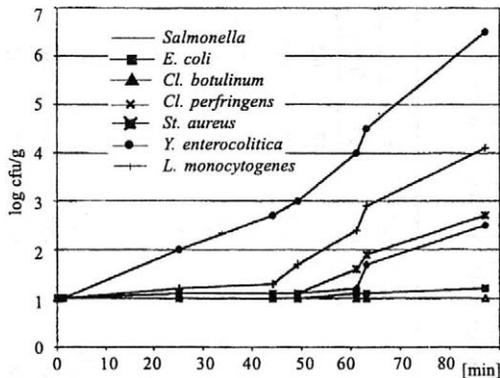
a obr. 7). V praxi se často stává, že při přenosu vychlazeného zboží do teplejšího prostředí se orosí obal výrobku a od něho i povrch kuřete. Proto se za horší případ uvažovala aktivita vody $a_w = 1,000$ (tab. 2 a obr. 8).

K analýze byla použita prediktivní databáze Food MicroModel verze 2.53 (Leatherhead Food RA, UK). Počáteční koncentrace mikroorganismů byla volena jednotně pro všechny testované mikroorganismy $\log \text{CFU} = 1$. Pro analýzu růstu a přežívání pomocí FMM je to minimální výchozí počet. Modelované průběhy nejsou ovlivněny výchozím počtem mikroorganismů, a proto si můžeme posouvat stanovené průběhy vertikálně podle aktuálního výchozího nálezu.

K analýze byly vybrány mikroorganismy, které za uvedených podmínek (teplota, pH a aktivita vody) vykazují možný růst, představují vážné zdravotní riziko a v souvislosti s kuřecím masem byly uváděny případy výskytu.



Obr. 7. Predikce možného růstu mikroorganismů v kuřecí kůži o pH 5,91 a $a_w = 0,991$ za předpokladu počáteční koncentrace $\log \text{cfu/g} = 1$ – Prediction of possible growth of micro-organisms in chicken skin at pH 5.91 and $a_w = 0.991$, starting concentration $\log \text{cfu/g} = 1$



Obr. 8. Predikce možného růstu mikroorganismů v kuřecí kůži o pH 5,91 a $a_w = 1,000$ za předpokladu počáteční koncentrace $\log \text{cfu/g} = 1$ – Prediction of possible growth of micro-organisms in chicken skin at pH 5.91 and $a_w = 1.000$, starting concentration $\log \text{cfu/g} = 1$

Tab. 1. Predikce možného růstu mikroorganismů v kuřecí kůži o pH = 5,91 a $a_w = 0,991$ za předpokladu výchozí koncentrace log cfu/g = 1 – Prediction of possible growth of microorganisms in chicken skin at pH = 5.91 and $a_w = 0.991$ for assumption of start concentration log cfu/g = 1

Operace ³	Čas ¹ [min]	T [°C]	Časový krok ² [min]	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. botulinum</i>		<i>Cl. perfringenes</i>		<i>St. aureus</i>		<i>Y. enterocolitices</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
				cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It
Zavěšování ⁴	0,5	37	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Omračování ⁵	1	37	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Paření ⁶	3	37	2	–	–	–	–	–	–	1	2,7	–	–	–	–	–	–
Odřezávání krků ⁷	3,5	37	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Škubání peří ⁸	8	35	4,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Převěšování ⁹	8,2	35	0,2	–	–	–	–	–	–	1	13,3	–	–	–	–	1,0	3,2
Kuchání ¹⁰	17,7	35	9,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Chladicí tunel ¹¹ krok ¹² 1	22,7	32,5	5	–	–	–	–	–	–	1	16,6	–	–	–	–	1,0	3,3
krok 2	32,7	28	10	1,0	4,75	1	7,0	1	1,6	1	21,1	1,0	9	–	–	1,0	5,5
krok 3	44,7	22	12	1,0	8,62	1	10,9	1	3,3	1	23,3	1,0	23,8	–	–	1,0	9,1
krok 4	60,7	16	16	1,0	11,0	1	12,8	1	4,5	1	24,1	1,0	27,6	–	–	1,0	10,6
krok 5	72,7	12	12	1,0	11,9	1	13,4	1	4,9	–	–	1,0	28,5	1	1,8	1,0	11,2
Chladicí sklad v závode ¹³	1 513	8	1 440	1,1	54,3	–	–	1	23,0	–	–	1,1	28,6	1,5	127,5	1,1	42,9
Doprava v chladicím voze ¹⁴	2 653	4,5	1 140	–	–	–	–	1	28,0	–	–	–	–	1,6	–	1,1	57,8
Chladicí sklad v obchodě ¹⁵	2 953	2,5	300	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	–	1,1	60,3
Chlazená vitrina v obchodě ¹⁶	3 673	10	720	1,2	88,2	1	36,7	1	43,4	–	–	1,2	56,5	2,3	–	1,1	87,5
Doprava do domácnosti ¹⁷	3 793	15	120	1,2	103,4	1	48,2	1	50,8	1	28,5	1,2	78,6	2,4	–	1,1	97,1
Skladování v domácí lednici ¹⁸	5 233	10	1 440	2,0	–	1	94,8	1	81,7	–	–	1,8	–	5,1	–	–	2,5

cfu/g = log cfu/g

– = data mimo rozsah modelu – data outside of range of the model

¹time; ²time step; ³operation; ⁴hanging; ⁵stunning; ⁶steam heating of feathers; ⁷slitting of throat; ⁸huckin of feathers; ⁹rehanging; ¹⁰removal of internal organs; ¹¹cooling tunnel; ¹²step; ¹³cooling storage; ¹⁴transport in refrigerated lorry; ¹⁵cold storage in shop; ¹⁶display cabinet in shop; ¹⁷transport home; ¹⁸storage in refrigerator at home

Tab. 2. Predikce možného růstu mikroorganismů v kuřecí kůži o pH = 5,91, $a_w = 1,0$ za předpokladu výchozí koncentrace log cfu/g = 1 – Prediction of possible growth of micro-organisms in chicken skin at pH = 5.91 and $a_w = 1,0$ for assumption of start concentration log cfu/g = 1

Operace ³	Čas ¹	T	Časový krok ²	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>Cl. botulinum</i>		<i>Cl. perfring.</i>		<i>St. aureus</i>		<i>Y. enterocol.</i>		<i>L. monocytog.</i>	
	[min]	[°C]	[min]	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It	cfu/g	%It
Zavěšování ⁴	0,5	37	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Omračování ⁵	1	37	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Paření ⁶	3	37	2	–	–	–	–	–	–	1	32,6	–	–	–	–	–	–
Odřezávání krků ⁷	3,5	37	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Škubání perí ⁸	8	35	4,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Převěšování ⁹	8,2	35	0,2	–	–	–	–	–	–	1	45,9	–	–	–	–	1	4,9
Kuchání ¹⁰	17,7	35	9,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Chladicí tunel ¹¹ krok ¹² 1	22,7	33	5	–	–	–	–	–	–	1	50,2	–	–	–	–	1	6,7
krok 2	32,7	28	10	1	4,4	1	7,7	1	3	1	56,6	1	31,6	–	–	1	10,2
krok 3	44,7	22	12	1	8,3	1	12	1	5,8	1	60,1	1	42,8	–	–	1	13,4
krok 4	60,7	16	16	1	11	1	14	1	7,4	1	61,5	1	48,5	–	–	1	15,7
krok 5	72,7	12	12	1	12	1	14,9	1	7,9	–	–	1	50,0	1	2,1	1	15,8
Chladicí sklad v závodě ¹³	1 512,7	8	1 440	1,1	65,2	–	–	1	28,9	–	–	1,1	94,8	2	98,0	1,2	79,1
Doprava v chladicím voze ¹⁴	2 652,7	4,5	1 140	–	–	–	–	1	34,1	–	–	–	–	2,7	–	1,3	104,2
Chladicí sklad v obchodě ¹⁵	2 952,7	2,5	300	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	1,7	–
Chlazená vitrina v obchodě ¹⁶	3 673	10	720	1,2	106,5	1,1	40,3	1	52,9	–	–	1,6	–	4	–	2,4	–
Doprava do domácnosti ¹⁷	3 793	15	120	1,7	–	1,1	52,9	1	63	1	69,8	1,9	–	4,5	–	2,9	–
Skladování v domácí lednici ¹⁸	5 233	10	1 440	2,5	–	1,2	103,8	1	100,6	–	–	2,7	–	6,5	–	4,1	–

cfu/g = log cfu/g

– = data mimo rozsah modelu – data outside of range of the model

¹time; ²time step; ³operation; ⁴hanging; ⁵stunning; ⁶steam heating of feathers; ⁷slitting of throat; ⁸hucking of feathers; ⁹rechanging; ¹⁰removal of internal organs; ¹¹cooling tunnel; ¹²step; ¹³cooling storage; ¹⁴transport in refrigerated lorry; ¹⁵cold storage in shop; ¹⁶display cabinet in shop; ¹⁷transport home; ¹⁸storage in refrigerator at home

Kromě mikroorganismů uvedených v tab. 1 a 2 byl analyzován možný růst patogenu *Campylobacter jejuni*, hojně nalázaný v kuřecím masu. Tento mikroorganismus roste v zažívacích orgánech zejména ptáků. Za podmínek uvedených v tab. 1 i 2 však pouze přežívá, resp. dochází k pomalému snižování jeho výskytu. Proto jsme se jím dále nezabývali, i když sám o sobě je uváděn vzhledem k schopnosti přežít i při nízkých teplotách skladování jako velmi nebezpečný. Nemůže prakticky dojít k jeho pomnožení, pokud teploty nepřevyšují 30 °C. Model přežívání ukazuje na velmi zajímavé závislosti tohoto děje na pH a aktivitě vody, resp. teplotě. Přítomnost tohoto mikroorganismu je tedy indikátorem porušení hygienických zásad a správné výrobní praxe (např. sekundární kontaminace při kuchání), nikoli zpravidla indikátorem porušení skladovacích podmínek.

Samotná predikce růstu probíhala tak, že v počátečních modelovatelných fázích byla vždy stanovena doba lag fáze daného mikroorganismu pro podmínky (teplota, pH, a_w) daného časového kroku a vypočteno procento absolvování lag fáze pro daný mikroorganismus:

$$\%lt = \frac{\text{doba}}{\text{lag fáze}} * 100 \quad [1]$$

Tato veličina se kumulativně načítá a výpočet se opakuje v následujících krocích, dokud není dosaženo 100 %. Jestliže v daném kroku bylo dosaženo překročení 100 % o podstatnou část (více než 10 %), byl krok rozdělen a v části, ve které již došlo k překročení 100 %, byl uvažován růst aktivovaného mikroorganismu bez lag fáze (v FMM lze lag fázi vyřadit). Od této chvíle nastává intenzivní logaritmický růst počtu mikroorganismů. Analýza z možného růstu byla provedena pro kmeny *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* a *Listeria monocytogenes*. Výsledky modelování jsou podle podkladů FMM vždy na straně bezpečnosti. Není totiž uvažováno s kompetitivní činností jiných mikroorganismů (která v praxi nastává) a není uvažováno s omezenou dostupností živin.

Jak je z tabulek patrné, během porážky jsou tak vysoké teploty, že jsou mimo rozsah platnosti modelu růstu většiny studovaných mikroorganismů. Jestliže připustíme, že by teplota během těchto fází byla mírně nižší než naměřená (abychom mohli použít modely růstu), zjistí se, že během krátkých intervalů daných operací nedojde k žádnému podstatnému nárůstu počtu mikrobů ani k podstatnému absolvování lag fáze. Výjimku tvoří *Clostridium perfringens*, které dokázalo absolvovat 24 % (při $a_w = 0,991$) až 60 % (při $a_w = 1,0$) své doby lag fáze do konce chlazení.

Je velmi zajímavé, že poměry při chlazení a skladování v závodě umožňují salmonelám spotřebovat okolo 54 až 65 % a mikroorganismu *Staphylococcus aureus* 28–95 % doby lag fáze (nižší hodnoty při $a_w = 0,991$ a vyšší hodnoty při $a_w = 1,0$).

Nejdůležitější poznatek této analýzy však je, že může docházet k růstu mikroorganismů již během vystavení

zboží ve vitrínách, během transportu domů nebo zejména při nevhodném skladování v domácí ledničce. Výrobce sice deklaruje požadavek skladování chlazených kuřat při teplotách do 5 °C, ale naše zkušenosti ukazují, že reálné podmínky jsou často horší.

Maximální nárůsty a rychlosti růstu byly stanoveny pro psychrotrofní mikroorganismy *Yersinia enterocolitica*, která vykazovala predikovaný nárůst na konci sledované doby až řádu 5 (při $a_w = 0,991$) a 6 (při $a_w = 1,0$). Pro salmonely byl zjištěn pouze mírný nárůst počtu mikroorganismů ve sledované teplotní historii.

ZÁVĚRY

Analýza růstu vybraných patogenních mikroorganismů prokázala, že většina z nich spotřebovala svou dobu lag fáze již během dopravy a distribuce a u některých z nich byl indikován růst na počty, které jsou nebezpečné lidskému zdraví. Proto je třeba, aby teplotní historie chlazených kuřat byla přísně kontrolována během celé výroby a distribuce. Jestliže to náklady dovozí, bude třeba aplikovat indikátory teploty nebo integrované teplotní historie alespoň na skupinové balení výrobku, aby byli prodejci a zákazníci informováni, že v daném výrobku často se vyskytující mikroorganismus již absolvoval svou dobu lag fáze.

Syrové kuřecí maso je třeba pokládat za potenciálně infikované patogenními mikroorganismy, a proto je třeba při zacházení s ním respektovat základních deset zlatých pravidel Světové zdravotnické organizace.

Bezpečné tepelné zpracování (vaření nebo pečení) je třeba aplikovat na chlazené kuřecí porce a varovat se křížové kontaminace tepelně ošetřených produktů se syrovým masem a s nástroji, které s ním přišly do styku. U velkých producentů hotových jídel je třeba ověřovat dostatečné tepelné ošetření kontrolou teploty v jádře nejpomaleji prohřívávaných částí, tj. v prsním, případně stehenním svalu.

Poděkování

Autoři práce děkují p. JERRY MCHUGHOVI (University College Cork, Irsko) za účinnou pomoc při numerických a provozních experimentech.

Seznam symbolů

a_w	aktivita vody	[-]
CFU	počet mikroorganismů (kolonii tvořící jednotka)	[-]
pH	kyselost	[-]
SHTC	povrchový součinitel přestupu tepla	[W/m ² .K]
T	teplota	[°C]
%lt	procento spotřebované doby lag fáze	[%]

Literatura

- ALLEN A. R., LIU M., NESVADBA P. (1997): Development of Integrated Software for the Modelling of Thermal Processing of Foods. In: Proc. Conf.-Workshop Modelling of Thermal Properties and Behaviour of Foods... , Praha.

- MCCLURE P. J., DE BLACKBURN C., COLE M. B., CURTISS P. S. *et al.* (19): Modelling of growth, survival and death of micro-organisms in foods: The UK Food Micro-Model approach. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**: 265–275.
- NESVADBA P. (1995): HEATSOLV. Reference manual.
- RAŽNJEVIČ K. (1984): Termodynamické tabulky. Bratislava, Alfa.
- SOUČI S. W., FACHMANN W., KRAUT H. (1989): Food Composition and Nutrition Tables 1989/90. 4. vydání. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, mbH.

Došlo 22. 9. 1998

Přijato k publikování 16. 2. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. MILAN HOUSKA, CSc., Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 21, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: m.houska@vupp.cz

NOVÉ KNIHY

CHEMIE POTRAVIN

Na knižním trhu se právě objevila nová kniha *Chemie potravin* autorského kolektivu vedeného prof. Ing. Janem Velíškem, DrSc.

Kniha vychází ve třech dílech formátu A4 v celkovém rozsahu přesahujícím 900 stran (cena 730 Kč). Je rozdělena do 12 kapitol, které pokrývají všechny úseky chemie potravin (Úvod; Aminokyseliny, peptidy a bílkoviny; Tuky a jiné lipidy; Sacharidy; Vitaminy; Minerální látky; Voda; Aromatické látky; Barviva; Přirozené toxické látky; Aditivní látky; Kontaminující látky).

Kapitoly jsou členěny na podkapitoly, které se zabývají strukturou a názvoslovím jednotlivých sloučenin, jejich vznikem, výskytem, změnami, významnými reakcemi, výživovými, toxikologickými a legislativními aspekty.

Technologové v knize najdou podrobné informace o reakcích, ke kterým dochází při zpracování a skladování potravin, a o způsobech jak je lze ovlivňovat a řídit. Pracovníci distribuční sféry ocení především informace o rychlostech změn a podmínkách, které podstatným způsobem ovlivňují skladovatelnost vyrobených potravin. Kontrolou se mohou na základě popsaných chemických i biochemických změn kvalifikovaněji rozhodovat o kritických fázích jednotlivých technologických postupů, které je nezbytně nutné analyticky sledovat.

Tato základní kniha by neměla chybět u žádného řidičího a odborného pracovníka potravinářského průmyslu a oborů, které s tímto průmyslovým odvětvím souvisejí.

Senzorické hodnocení jablečné šťávy ošetřené vysokým tlakem v průběhu skladování*

PAVLA NOVOTNÁ¹, HELENA VALENTOVÁ², JAN STROHALM¹, KAREL KÝHOS¹, ALEŠ LANDFELD¹,
MILAN HOUŠKA¹

¹Food Research Institute Prague, Prague; ²Institute of Chemical Technology – Department of Food
Chemistry and Analysis, Prague, Czech Republic

Abstract

NOVOTNÁ P., VALENTOVÁ H., STROHALM J., KÝHOS K., LANDFELD A., HOUŠKA M.: **Senzory evaluation of high-pressure treated apple juice during its storage.** Czech J. Food Sci., 17: 196–198.

A storage experiment of apple juice processed with high pressure was made. The comparison of the sensory quality with samples preserved by freezing and pasteurized was also made. The samples were evaluated on 1, 10 and 30 days after preparation. The appearance was best for pasteurized juice by heat. The aroma did not show any substantial differences between samples. The best flavour was found for frozen juice. Intensity of off-flavours was strongest for heat pasteurized juice. Viscosity of all samples was evaluated to be thin. The smallest changes of total quality were detected for samples frozen and heat pasteurized. The preference test showed the best sample being frozen juice, the second sample pressurized juice and the third sample heat pasteurized juice. This order was not affected by the time of storage.

Key words: apple juice; storage; sensory evaluation; high pressure

Souhrn

NOVOTNÁ P., VALENTOVÁ H., STROHALM J., KÝHOS K., LANDFELD A., HOUŠKA M.: **Senzorické hodnocení jablečné šťávy ošetřené vysokým tlakem v průběhu skladování.** Czech J. Food Sci., 17: 196–198.

Byla provedena zkouška skladování vzorků jablečné šťávy ošetřené vysokým tlakem v porovnání se vzorky mraženými a tepelně ošetřenými. Senzorické hodnocení jablečné šťávy se uskutečnilo 1., 10. a 30. den po vyrobění. Vzhledově nejlépe se jevila šťáva ošetřená teplem. V hodnocení vůně nebyl mezi vzorky rozdíl. Přijemnost chuti byla nejlepší u mražené šťávy. Intenzita pachutí byla nejsilnější u tepelně ošetřené šťávy. Viskozita vzorků byla hodnocena jako řídká. Při skladování dochází k nejmenším změnám u vzorku mraženého a tepelně ošetřeno. Preferenčním pořadovým testem bylo zjištěno, že nejlepší se vždy jevil zmražený vzorek, jako druhý vzorek ošetřený tlakem a nejhůřší byl vzorek tepelně ošetřený, a to bez ohledu na délku skladování.

Klíčová slova: jablko; šťáva; skladování; senzorické hodnocení; vysoký tlak

Ošetření potravin vysokým tlakem je známé již více než sto let, nejdále ve vývoji této technologie je Japonsko. Potravinu takto zpracované se svými senzorickými vlastnostmi i z hlediska zachování vitamínů blíží potravinám čerstvým. Při vysokotlaké technologii se užívá izostatického tlaku řádově stovek MPa po dobu několika minut.

Ve Výzkumném ústavu potravinářském v Praze byl umístěn vysokotlaký lis o objemu pracovní komory 1,2 l. V rámci výzkumného projektu Stavba zařízení a výzkum vlivu vysokého tlaku na netepelné zpracování potravin bylo započato s prvními výzkumy ošetřování potravin

(kusového ovoce, zeleniny a šťáv) tlakem. Vzorky byly podrobeny hodnocení v průběhu skladování, u některých vzorků bylo provedeno mikrobiální a analytické hodnocení (např. obsah vitamínů) (STROHALM *et al.* 1997). Velmi nadějně je tlakové zpracování u přírodních ovocných a zeleninových šťáv.

Předmětem této práce bylo senzorické hodnocení tlakem ošetřené přírodní jablečné šťávy v průběhu skladování. K porovnání byly připraveny vzorky ošetřené teplem a mražené. Touto tematikou se nedávno zabývali PARISH (1996), TONELLO, JOLIBERT (1996) a firma GEC ALSTHOM (firemní literatura).

*Práce byla vypracována s podporou grantu MZe ČR č. EP 096 0986259.

MATERIÁL A METODY

Příprava vzorků

K přípravě vzorků byla použita jablka odrůdy Golden Delicious skladovaná v chladírně s řízenou atmosférou v ZD Libčany.

Jablka s vykrájenou stopkovou a kališní jamkou byla rozpůlena a nadrcena na kuličkovém drtiči. Šťáva byla vylisována na ručním košovém lisu s plachetkou. Získaná šťáva byla naplněna do PET lahví o objemu 0,4 l (pro vzorky ošetřené tlakem a mražené) a do sklenic Omnia s uzávěrem Omnia (pro vzorky ošetřené teplem).

Část vzorků naplněných do PET lahví byla okamžitě uložena do mrazicího boxu, kde setrvala do hodnocení. Druhá část vzorků byla podrobena ošetření vysokým tlakem, a to 400 MPa po dobu 10 min. Vzorky naplněné do sklenic s uzávěrem Omnia byly sterilovány při teplotě 80 °C po dobu 20 min a poté vychlazeny na teplotu místnosti +25 °C.

Vzorky byly skladovány v chladničce, jejíž teplota byla 6 ± 0,5 °C. Zmražená šťáva byla uchovávána v mrazicím boxu při teplotě -17 ± 0,5 °C. Teplota šťáv při podávání byla 20 °C.

Při přípravě vzorků nebylo použito žádných konzervačních ani antioxidantních přípravků, a proto již při výrobě šťávy došlo k jejímu zhnědnutí.

Senzorické hodnocení

Časové rozvržení senzorického hodnocení bylo stanoveno na 1., 10. a 30. den. Senzorické hodnocení provedl Ústav chemie a analýzy potravin na VŠCHT v Praze. Hodnocení probíhalo v hodnotitelských boxech devíti osobami zaškolenými podle ISO 6658. Podávaly se vždy všechny vzorky najednou. Toto uspořádání dovozovalo zároveň vyhodnotit pořadí preferencí podaných šťáv. Všechny vzorky byly před hodnocením temperovány na teplotu 20 °C.

Hodnocení bylo provedeno na grafické stupnici o délce 100 mm v tomto senzorickém profilu:

celkový vzhled	příjemný (0)	–	nepříjemný (100)
vůně	velmi dobrá (0)	–	špatná (100)
příjemnost chuti	velmi dobrá (0)	–	špatná (100)
intenzita pachutí	neznatelná (0)	–	velmi silná (100)
viskozita stanovená srkáním	řidká (0)	–	hustá (100)
stanovení preference vzorků (pořadí 1., 2., 3.)			

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky hodnocení byly získány 1., 10. a 30. den po zhotovení. Výsledky senzorického hodnocení jsou shrnuty v přehledné tabulce a jsou vypočteny jako aritmetický průměr z devíti hodnocení. V závorce jsou uvedeny také směrodatné odchylky od průměru.

Z tab. 1 a obr. 1–3 je patrné, že 1. den skladování byla vzhledově nejlepší šťáva ošetřená teplem. V hodnocení vůně není mezi vzorky rozdíl. Příjemnost chuti je v čerstvě připravených, neskladovaných vzorcích nejlepší u zmrazeného vzorku a nejhůrší u vzorku ošetřeného teplem. Intenzita pachutí je nejsilnější u vzorku ošetřeného teplem. Viskozita vzorků je hodnocena jako řidká a u vzorku ošetřeného teplem je hodnocena jako nejnižší.

Při skladovacím pokusu dochází k nejmenším změnám u vzorku mraženého a tepelně ošetřeného. Podrobněji lze jednotlivé změny při hodnocení 1., 10. a 30. den zjistit v tab. 1 a na obr. 1–3. U vzorku ošetřeného vysokým tlakem jde o pokles hodnot „k příznivějším hodnotám“ u všech sledovaných ukazatelů po 10 dnech skladování, pak do 30 dní skladování se hodnoty již neměnily. Výraznější rozdíly nastaly u hodnocení vůně a viskozity. U vzorku ošetřeného tlakem dochází skladováním ke zlepšení chuti. Preferenční pořadový test (tab. 1) nebyl závislý na době skladování. Jako nejlepší se vždy projevil vzorek ošetřený zmražením, jako druhý byl hodnocen vzorek ošetřený vysokým tlakem a jako třetí byl hodnocen vzorek ošetřený teplem.

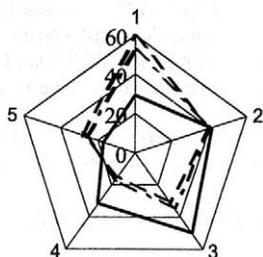
Podrobněji je o této práci pojednávají STROHALM *et al.* (1998).

Tab. 1. Senzorické hodnocení vzorků jablečné šťávy ošetřené různými způsoby – Organoleptic evaluation of samples of apple juice treated under high pressure, frozen or heat pasteurized (arithmetical mean of nine evaluations)

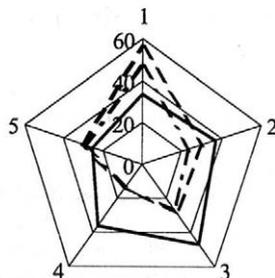
Den hodnocení ⁵	Ošetření ¹								
	vysokým tlakem ²			zmražením ³			teplem ⁴		
	1.	10.	30.	1.	10.	30.	1.	10.	30.
Celkový vzhled ⁶	52(5)	46(6)	47(6)	59(4)	56(5)	59(3)	29(4)	34(4)	30(4)
Vůně ⁷	41(4)	24(4)	25(5)	40(3)	30(6)	32(6)	41(6)	37(6)	30(6)
Příjemnost chuti ⁸	35(5)	27(7)	25(5)	31(5)	30(5)	27(6)	50(9)	47(7)	40(8)
Intenzita pachutí ⁹	17(5)	13(4)	16(4)	15(5)	13(4)	19(7)	32(8)	36(7)	31(8)
Viskozita (srkáním) ¹⁰	26(3)	29(5)	17(3)	28(3)	31(8)	23(4)	17(4)	25(7)	21(5)
Preference ¹¹	2	2	2	1	1	1	3	3	3

V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky – Standard deviations are given in brackets

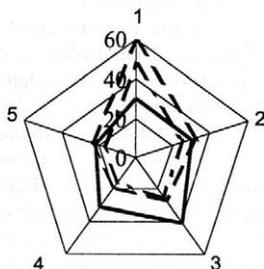
¹treatment; ²high pressure; ³freezing; ⁴heat pasteurization; ⁵day of evaluation; ⁶general appearance; ⁷flavour; ⁸taste acceptability; ⁹off-flavour intensity; ¹⁰viscosity (by sipping); ¹¹preferences



Obr. 1. Senzorické hodnocení jablečné šťávy (1. den skladování) – Organoleptic evaluation of appl juice (1st day of storage)



Obr. 2. Senzorické hodnocení jablečné šťávy (10. den skladování) – Organoleptic evaluation of apple juice (10th day of storage)



Obr. 3. Senzorické hodnocení jablečné šťávy (30. den skladování) – Organoleptic evaluation of apple juice (30th day of storage)

Závěr

Porovnáním celkových tvarů diagramů senzorického hodnocení (obr. 1–4) lze konstatovat, že nejpodobnější profily hodnocení vykazují vzorky ošetřené mražením a tlakem. Od nich se liší vzorky teplem ošetřené. Při použití krátkodobé průtokové sterilace šťávy na vysokou teplotu mimo obal s následným aseptickým plněním by byla takto ošetřená šťáva organolepticky přijatelnější než sterilovaná v obalu 20 min při 80 °C.

V průběhu hodnocení nedošlo u žádného hodnoceného vzorku k patrným změnám způsobeným činností mikroorganismů, tj. kažení.

Ošetření čerstvé jablečné šťávy vysokým tlakem se zdá být slibným způsobem zpracování, zachovávajícím senzorické znaky čerstvého produktu. Rovněž z energetického hlediska je tlakové ošetření šťáv výhodnější než např. pasterace s aseptickým plněním (HOUŠKA *et al.* 1998).

Vysvětlivky pro obr. 1–3 – Explanation for Figs. 1–3

- vysoký tlak – high pressure
- zmrazení – freezing
- ošetřeno teplem – heat pasteurization

- 1 = celkový vzhled – general appearance
- 2 = vůně – flavour
- 3 = ošetřeno teplem – heat pasteurization
- 4 = intenzita pachuti – off-flavour intensity
- 5 = viskozita vzorku – sample viscosity

Literatura

- STROHALM J., HOUŠKA M., NOVOTNÁ P., KÝHOS K., BRŮNA D., ČAPEK Č. (1997): Výzkum vlivu vysokého tlaku na neteplně zpracování potravin. [Technická zpráva.] Praha, VÚPP.
- STROHALM, VALENTOVÁ H, HOUŠKA M., LANDFELD A., NOVOTNÁ P. (1998): Senzorické vlastnosti tlakované jablečné šťávy v průběhu skladování. [Technická zpráva.] Praha, VÚPP.
- HOUŠKA M., STROHALM J. (1998): Porovnání spotřeby energie a analýza nákladů při aseptické a tlakové pasteraci ovocných šťáv. [Technická zpráva.] Praha,
- TONELLO C., JOLIBERT F. (1996): Effect of high hydrostatic treatments on shelf-life of different fruit products. In: Proc. 34th Meet. High Pressure Bio-science and Bio-technology. Belgium, Katholieke Universiteit Leuven, September 1–5.
- PARISH M. E. (1996): High pressure effects on quality of chilled orange juice. In: Proc. 34th Meet. High Pressure Bio-science and Bio-technology. Belgium, Katholieke Universiteit Leuven, September 1–5.
- Prospekt firmy GEC ALSTHOM ACB – High pressure processing of Food, Pharmaceuticals and Cosmetics

Došlo 4. 9. 1998

Přijato k publikaci 2. 12. 1998

Kontaktní adresa:

Ing. PAVLA NOVOTNÁ, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 21, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: p.novotna@vuppp.cz

KONFERENCE A SEMINÁŘE

XXX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

Ve dnech 17.–19. 5. 1999 se ve Skalském dvoře konalo jubilejní XXX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin pořádané Odbornou skupinou pro potravinářskou a agrikulturní chemii České společnosti chemické. Tradiční odborná akce je pořádána každoročně od roku 1970. Letos se jí zúčastnilo 100 odborníků z České republiky a ze Slovenska a bylo na ní prezentováno 36 ústních sdělení a 56 posterů.

Úvodní blok referátů byl zaměřen na problematiku výběru a validace analytických metod. Přednášející se zaměřili na definice a principy stanovení základních pracovních charakteristik, které bezprostředně ovlivňují použitelnost dané metody a kvalitu generovaných dat. Bylo pojednáno o následujících charakteristikách: selektivita a specifická, rozsah a linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti, přesnost, citlivost, robustnost. Praktický příklad validace metody byl demonstrován na stanovení stopových prvků v biologických materiálech metodou izotopové zředovací hmotnostní spektrometrie. Pro validaci metod a pro zkoušení způsobilosti slouží též mezilaboratorní porovnání. Účast laboratorů v mezilaboratorním porovnání je jedním z kritérií ČSN EN 45001 Všeobecná kritéria pro činnost zkušebních laboratorů. Program zahrnoval informace o základních principech organizace mezilaboratorního porovnání i výsledky mezinárodních mezilaboratorních testů způsobilosti zaměřených na stanovení dusičnanů v potravinách. Další objektivní vlastností každého měření, poskytující určité informace o výsledku měření a nutnou pro možnost vzájemného porovnání výsledků, je nejistota měření. Pro strategii odhadu nejistot v oblasti chemické analýzy neexistuje jednoznačný jednoduchý návod, který by analytika dovedl k získání celkové nejistoty metody. V rámci bloku byla demonstrována příkladová studie odhadu nejistot pro stanovení dusičnanů metodou HPLC. Tuto problematiku doplnila informace o riziku nadhodnocení výsledků sekundární kontaminací vzorku při stanovení kyseliny ftalové.

Program sympozia byl z velké části zaměřen na metody hodnocení potravin z hlediska hygienického, nutričního a senzorickeho. Velký počet příspěvků se proto zabýval vývojem analytických postupů pro stanovení základních i minoritních složek potravin, aditiv i kontaminantů s užitím chromatografických, spektrofotometrických, bioafinitních, senzorických, mikrobiologických a fyzikálních metod. Prezentované práce se týkaly např. využití spektrofotometrických metod na sledování jakosti panenských a rafinovaných jedlých tuků a olejů, na stanovení obsahu amylosy ve škrobu, na stanovení acetylderivátů galaktosy a trehalosy. Metody HPLC byly použity např. pro stanovení karotenoidů, tokoferolů, vitamínu B₆, niacinu, rutinu, markerových sacharidů pro průkaz falšování instantní kávy, dále pak biogenních aminů, benzo(a)pyrenu, bisfenolu A a agaritinu. Metodami GC, případně doplněnými některými novými technikami (GC-MS, nástřík s programovatelnou teplotou vypařování – PTV, extrakce na tuhou fázi – SPE), byly stanoveny např. stopové koncentrace ethylenglykolu ve víně, vicinální diketony, PCB a nitrosoaminokyseliny v pivu, estery kyseliny ftalové, trichothecenové mykotoxiny a aktivita pektinmethylesterasy. Pro stanovení fungicidů imazalilu byla použita kapilární isotachoforesa, pro stanovení kovů ve víně průtoková galvanostatická rozpouštěcí chronopotentiometrie, pro stanovení základního složení sušeného mléka NIR spektroskopie, pro stanovení prvků emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a k monitorování kultivace kvasinek průtoková cytometrie. Příspěvky týkající se senzorickeho hodnocení se zabývaly např. určením vztahu senzorickeho znaků a chemických charakteristik vína a vypracováním metody měření barvy výrobku v procesu pečení.

Příspěvky z oblasti hodnocení hygienické jakosti potravin tvořily další tematický okruh programu, který byl zahájen sdělením o nových prioritách v oblasti hodnocení kontaminace potravin ve vztahu k Vyhláše Ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb. k Zákonu č. 110/1997 Sb. i v souvislosti s novými riziky environmentálních kontaminantů. Kromě série referátů zabývajících se vývojem vhodných analytických metod stanovení vybraných kontaminantů byla diskutována otázka průniku xenoestrogenů do potravního řetězce, problematika biogenních aminů ve víně, výsledky monitoringu kontaminace lovné zvěře organochlorovanými polutanty a výsledky monitoringu spotřebního koše z hlediska obsahu benzo(a)pyrenu.

V několika dalších sděleních byla diskutována nutriční jakost potravin a možnosti jejího ovlivnění. Bylo referováno např. o bezpluchém ječmeni jako zdroji nutričně cenných látek, o cereálních směsích a jejich hodnocení, o zdrojích inulinu a oligofruktosy, o možnosti zvýšení nutriční hodnoty obilních lihovarských výpalků, o vlivu kulinární úpravy hrachu na obsah α -galaktosidů. Dále byla diskutována problematika řešení jodového deficitu, stability vitamínu B₁₂ a kyseliny listové v obohacené dětské výživě, možnosti zvýšení obsahu polynenasycených mastných kyselin ve vejcích a obsahu polynenasycených mastných kyselin ve tkáních kapra.

Senzorické jakosti se týkaly referáty pojednávající o hodnocení vybraných tavených sýrů, o stanovení senzorického profilu k určení optimálního přídavku glutamanu sodného k různým výrobkům. Senzorická jakost byla uvedena i jako jedno z kritérií hodnocení vlivu genotypu na vybrané znaky kvality vepřového masa.

Novými technologiemi a charakterizací procesů pomocí sledování různých parametrů se zabývala další skupina referátů. Jednalo se např. o modelování technologického postupu extrakce sušené čekanky, o postup přípravy vlákniny z krmné mouky, o separaci suspendovaných částic z kapalných médií při zpracování obilovin v lihovarské technologii pomocí statického spádového síta. Dále byl sledován vliv technologických postupů na jakost koncentrátů barviv izolovaných z červené řepy.

Z problematiky interakcí složek potravin byly sledovány reakce vybraných oligopeptidů s allylisothiokyanátem v modelových systémech, další práce se týkaly identifikace produktů vzniklých Streckerovou degradací aminokyselin a Maillardovou reakcí v modelových systémech. Pozornost byla zaměřena na změny volných aminokyselin během zrání fermentovaných masných výrobků i na sledování změn způsobených záhřevem potravin a na vývoj metod k jejich charakterizaci (změny syrovátkových bílkovin při záhřevu mléka, obsah polymerních triacylglycerolů v tucích při smažení).

Pravidelnou součástí programu je diskuse o metodách senzorického hodnocení spojená s praktickým hodnocením některých potravinářských výrobků. V letošním roce byly hodnoceny vzorky cereálních tyčinek, zeleninových salátů, vitaminových nápojů, pomazánkového másla a jogurtů. Během sympozia se prezentovala firma ChromSpec, spol. s r. o.

Sborník souhrnů všech sdělení je k dispozici ve Výzkumném ústavu potravinářském Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař.

Konání příštího, již XXXI. sympozia o nových směrech výroby a hodnocení potravin je plánováno opět ve Skalckém dvoře ve dnech 22.–24. 5. 2000.

Marie Holasová, Vlasta Fiedlerová (Praha)

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The responsibility for the contents of a manuscript rests with the authors. The Editorial Board will decide on publication, after considering the manuscripts scientific importance, quality, and the comments of the referees.

The manuscript should be typed with a wide margin, double spaced on standard A4 paper. A PC diskette with the complete text and including references, tables and figure legends of graphical documentation should be provided with manuscript, indicating the used editor program.

Manuscript should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, Instruction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Contact address, Tables, Legends to figures.

The Title page must contain a informative title, complete name(s) of the author(s), the name(s) and address(es) of the institution(s) where the work was done.

The **Abstract** should state in short and concise form what was done and how, and should contain basic numerical and statistical data from the results.

Key words follow the abstract; they are ranked from general to specific terms, and are written in lower case letters and separated by semicolons.

The **Introduction** (without a subtitle) should consist of a short review of literature relevant and important for the study. The reason(s) for the work may be included.

In **Materials and Methods**, the description of experimental procedures should be sufficient to allow replication. Abbreviations can be used if necessary; first use of an abbreviation should be just after its complete name or description. The International System of Units (SI) and their abbreviations should be used.

Results should be presented clear and concise.

The **Discussion** should interpret the results, without unnecessary repetition. Sometimes it is possible or advantageous to combine Results and Discussion in one section.

If **Acknowledgments** are needed, they are next.

References in the text citations consist of author's name and year of publication. If there are more than two authors, only the first is named, followed by the phrase *et al.* The list of References should include only publications quoted in the text. These should be in alphabetical order under the first author's name, citing all authors, year (in brackets), full title of the article, abbreviation of the periodical, volume number, first and last page numbers.

Contact address which also should include the telephone, fax and e-mail numbers of the corresponding author.

Tables and Figures shall be enclosed separately. Tables and Figures are numbered in Arabic numerals. Each of them must be referred to in the text. Figures should be restricted to material essential for documentation and understanding of the text. Duplicated documentation of data in both tables and figures is not acceptable. All illustrative material must be of publishing quality. Both line drawing and photographs are referred to as figures. They cannot be redrawn by publisher. Photographs should have high contrast. Each figure should be accompanied by a concise, descriptive legend.

Reprint: Twenty (20) reprint of each paper are supplied free of charge.

POKYNY PRO AUTORY

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu i kvalitě práce.

Rukopis musí být zaslán vytištěný na papíru formátu A4. K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. grafickou dokumentací pořízenou na PC (uvést použitý program).

Vědecké práce musí mít toto členění: titulní strana, abstrakt a klíčová slova, úvod, materiál a metody, výsledky, diskuse, literatura, kontaktní adresu, tabulky a obrázky včetně popisů.

Titulní strana musí obsahovat název práce, plné jméno autorů, název a adresu instituce, kde byla práce dělána.

Souhrn musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot.

Klíčová slova (key words, index terms) se připojují po vynechání řádku pod souhrn. Řadí se směrem od obecných výrazů ke speciálním; začínají malým písmenem a oddělují se středníkem.

Úvod (bez nadpisu) by měl obsahovat krátký přehled důležité literatury vztahující se k tématu a cíli práce.

Materiál a metody: Model pokusu musí být popsán podrobně a výstižně. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl práci opakovat. Zkratky jsou používány jen pokud je to nutné; první použití zkratky musí být uvedeno úplným popisem nebo vysvětlením. Používané měrové jednotky musí odpovídat soustavě měrových jednotek SI.

Výsledky: Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních hodnot tabulek, ale dát přednost grafům, anebo tabulky shrnout v statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část práce by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Je přípustné spojit s předchozí kapitolou (Výsledky a diskuse).

Poděkování se uvádí před přehledem použité literatury.

Literatura: Odkazy na literaturu v textu se provádějí uvedením jména autora a roku vydání publikace. Má-li práce tři a více autorů v textu se uvádí první z nich a za jméno se doplní zkratka *et al.* V části Literatura se uvádějí jen práce citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvního autora: příjmení, zkratka jména, rok vydání (v závorce), plný název práce, úřední zkratka časopisu, ročník, první–poslední stránka; u knih je uvedeno místo vydání a vydavatel.

Kontaktní adresa obsahuje také čísla telefonu, faxu a e-mail autora pověřeného korespondencí.

Tabulky a obrázky: Tabulky, obrázky a fotografie se dodávají zvlášť a všechny musí být citovány v práci. Akceptovány budou pouze obrázky, které jsou nezbytné pro dokumentaci výsledků a umožňují pochopení textu. Není přípustné dokumentovat výsledky jak v tabulkách, tak pomocí grafů. Všechny ilustrativní materiály musí mít kvalitu vhodnou pro tisk. Fotografie i grafy jsou v textu uváděny jako obrázky a musí být průběžně číslovány. Každý obrázek musí mít stručný a výstižný popis.

Separáty: Autor obdrží zdarma 20 separátních výtisků práce.

Contents

Obsah

<p>► The enzymatic hydrolysis of the protein wastes from carp (<i>Cyprinus carpio</i>) processing and the separation of hydrophobic peptides</p>	<p>Enzymová hydrolyzá bílkovinných odpadů ze zpracování kapra (<i>Cyprinus carpio</i>)</p>	<p>PROŠKOVÁ A. KUČERA J. VÁCHA F.</p>	<p>161</p>
<p>► Niacin determination in meat and offals by HPLC and its comparison with microbiological assay</p>	<p>Stanovení niacinu v mase a vnitřnostech metodou HPLC a srovnání s mikrobiologickým stanovením</p>	<p>HOLASOVÁ M. MAŠKOVÁ E.</p>	<p>166</p>
<p>► Purification and immobilization of soybean (<i>Glycine max</i>) urease</p>	<p>Purifikace a imobilizace ureasy sóji (<i>Glycine max</i>)</p>	<p>KMÍNKOVÁ M. KUČERA J.</p>	<p>171</p>
<p>► Energy and nutrient value of selected delicatessen salads</p>	<p>Nutriční hodnota vybraných lahůdkových salátů</p>	<p>MAŠKOVÁ E., FIEDLEROVÁ V. HOLASOVÁ M., RYSOVÁ J.</p>	<p>176</p>
<p>► Detection of sunflower and soybean oil adulterated with rapeseed oil</p>	<p>Průkaz falšování slunečnicového a sójového oleje olejem řepkovým</p>	<p>BOHAČENKO I. KOPICOVÁ Z.</p>	<p>182</p>
<p>Thermal history of chicken during processing and transport for a FMM-assisted analysis of microbial growth risk</p>	<p>► Teplotní historie chlazeného kuřete v průběhu zpracování a dopravy včetně analýzy nebezpečí růstu vybraných mikroorganismů</p>	<p>Houška M. LANDFELD A. STROHALM J. KÝHOS K., NESVADBA P.</p>	<p>188</p>
<p>Sensory evaluation of high-pressure treated apple juice during its storage</p>	<p>► Senzorické hodnocení jablečné šťávy ošetřené vysokým tlakem v průběhu skladování</p>	<p>NOVOTNÁ P., VALENTOVÁ H. STROHALM J., KÝHOS K. LANDFELD A., HOUSKA M.</p>	<p>196</p>
CONFERENCES AND SEMINARS		KONFERENCE A SEMINÁŘE	
<p>XXX. Symposium New trends of production and evaluation of foods</p>	<p>► XXX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin</p>	<p>HOLASOVÁ M FIEDLEROVÁ V.</p>	<p>198</p>