



## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-18-0061**

**Potraviny so zníženým obsahom cholesterolu**

Zodpovedný riešiteľ **prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.**

Príjemca **Slovenská technická univerzita v Bratislave - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Spolupráca sa nerealizovala

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

V procese prípravy sú žiadosti na Úrad priemyselného vlastníctva Slovenskej republiky o vydanie úžitkového vzoru a to:

1. Bezcholesterolové mlieko
2. Bezcholesterolová smotana
3. Bezcholesterolové maslo
4. Bezcholesterolový tvaroh

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Monografie

1. Kolarič, L., & Šimko, P.: Využitie  $\beta$ -cyklodextrínu vo výrobe mlieka a mliečnych výrobkov so zníženým obsahom cholesterolu. 1. vyd. – Bratislava (Slovensko): Slovenská technická univerzita v Bratislave. Fakulta chemickej a potravinárskej technológie. Slovenská chemická knižnica, 2023. – 114 s. – ISBN 978-80-8208-096-7

Vedecké práce v časopisoch abstrahovaných vo vedeckých databázach Web of Science a Scopus

1. Kolarič, L., & Šimko, P. (2022). Application of  $\beta$ -cyclodextrin in the production of low-cholesterol milk and dairy products. Trends in Food Science & Technology, 119, 13-22.
2. Šimko, P., & Kolarič, L. (2022). Decrease in aflatoxin M1 concentration in milk during cholesterol removal by application of  $\beta$ -cyclodextrin. Toxins, 14(6), 379.
3. Kolarič, L., & Šimko, P. (2022). Simultaneous determination of cholesterol, stigmaterol, and  $\beta$ -sitosterol contents in milk and dairy products. Journal of Food Processing and Preservation, 46(1), e16146.
4. Kolarič, L., & Šimko, P. (2022). Effect of processing conditions on measure of cholesterol removal from milk and cream. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 153(11), 1069-1075.

5. Kolarič, L., Kántorová, P., & Šimko, P. (2022).  $\beta$ -Cyclodextrin as the key issue in production of acceptable low-cholesterol dairy products. *Molecules*, 27(9), 2919.
6. Kolarič, L., & Šimko, P. (2021). The effect of treatment conditions on color characteristics and measure of cholesterol removal from milk by beta-cyclodextrin application. *Potravinárstvo: Slovak Journal of Food Sciences*, 15, 192-198.
7. Kolarič, L., & Šimko, P. (2020). Determination of cholesterol content in butter by HPLC: Up-to-date optimization, and in-house validation using reference materials. *Foods*, 9(10), 1378.
8. Kolarič, L., & Šimko, P. (2020). The comparison of HPLC and spectrophotometric method for cholesterol determination. *Potravinárstvo: Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 118-124.
9. Kukula, M., Kolarič, L., & Šimko, P. (2020). Decrease of cholesterol content in milk by sorption onto  $\beta$ -cyclodextrin crosslinked with tartaric acid; considerations and implications. *Acta Chimica Slovaca*, 13(2), 55-60.
10. Šimko, P., & Kolarič, L.: Formation, analysis, occurrence and mitigation of acrylamide content in foods. In: Birch, C. S. a Bonwick, D. A. (Eds.). *Mitigating Contamination from Food Processing*. Royal Society of Chemistry, London, 2019, s.17-44. ISBN: 978-1-78262-922-1.

#### Príspevky na zahraničných konferenciách

1. Kolarič, L., & Šimko, P.: Optimization of HPLC method for determination of cholesterol. In 5th IMEKO FOODS: book of abstracts „Metrology for sustainable food production“. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2020, s. 87-88. ISBN 978-80-213-3036-8.
2. Kolarič, L., & Šimko, P.: The production of low-cholesterol milk products. In Eurofoodchem., book of abstracts XXI. Euro Food Chem., Lisabon, Portugalsko. 1. vyd. Lisabon, Portugalsko: Sociedade Portuguesa de Quimica, 2021, s. 44. ISBN 978-989-8124-34-0.
3. Kolarič, L., & Šimko, P.: Cholesterol removal in milk by beta cyclodextrin: The effect of processing conditions. In Proceedings of 2nd Advanced Chemistry World Congress. 1. vyd. Vancouver, Kanada : Peers Alley Media, 2021, s. 14-15.
4. Kolarič, L., & Šimko, P.: The effect of cholesterol removal from milk and cream on the textural and organoleptic properties of final products. In Advanced Materials Science World Congress and Advanced Chemistry World Congress. 1. vyd. Vancouver BC, Kanada : Peers Alley Media, 2022, s. 37-38.
5. Šimko, P. & Kolarič, L.: Current trends in mitigation of objectional compounds from foods. In Sborník Příspěvků, II. conference „Food Fechnology & Food Quality. 1. vyd. Praha, Česká republika: Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, 2022, s. 21-25. ISBN 978-80-7592-125-3.
6. Kolarič, L., & Šimko, P.: Sledovanie textúrnych a farebných zmien mlieka a smotany po odstránení cholesterolu pomocou  $\beta$ -cyklodextrínu. In Ingrový dny 2022, sborník 48. konference o jakosti potravin a potravinových surovin. 1. vyd. Brno (Česká republika) : Mendelova univerzita v Brně, 2022, s. 284-296. ISBN 978-80-7509-828-3.
7. Kolarič, L., & Šimko, P.: The removal of cholesterol content from milk and the production of low-cholesterol dairy products. 36th EFFoST International Conference: Shaping the Production of Sustainable, Healthy Foods for the Future. 1 vyd. Dublin, Írsko, University College Dublin, 2022, s. 173-174.
8. Šimko, P. & Kolarič, L.: How efficient is elimination of cholesterol and aflatoxin treat from milk? In: 11th Central European Congress on Food and Nutrition, Čatež ob Savi, Slovinsko, 2022.
9. Kolarič, L., Lauková, M., Minarovičová, L., & Šimko, P.: The use of  $\beta$ -cyclodextrin for decreasing the cholesterol content in cereal products. book of abstracts XXII. Euro Food Chem conference, Belehrad Srbsko. 1. vyd. Belehrad, Srbsko: Serbian Academy of Sciences and Arts, 2023, s. 39. ISBN 978-86-7132-083-2.

#### Prednášky na domácich vedeckých konferenciách

1. Šimko, P., & Kolarič, L.: Zvyšovanie bezpečnosti potravín na základe fyzikálnochemických interakcií nežiadúcich zložiek potravín s molekulami typu "finger print". *Hygiena Alimentorum*, 43 [10.05.2023-12.05.2023, Štrbské Pleso, Slovensko] In: HYGIENA ALIMENTORUM XLIII [textový dokument (print)] [elektronický dokument] : Zdravotná bezpečnosť a kvalita mliečnych a rastlinných komodít – aktuálne problémy a trendy : Recenzovaný zborník prednášok a posterových prezentácií z medzinárodnej vedeckej konferencie / Bodnárová, Libuša [Zostavovateľ, editor] ; Vašková, Janka [Recenzent] ;

- Lovayová, Viera [Recenzent]. – 1. vyd. – Košice (Slovensko) : Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2023. – ISBN 978-80-8077-787-6, s. 114-125.
2. Šimko, P., & Kolarič, L.: Bezpečnosť potravín ako limitujúci faktor zdravia obyvateľstva SR. In: Bezpečnosť a kvalita potravín. Zborník vedeckých prác [elektronický dokument] / Golian, Jozef [Zostavovateľ, editor] ; Čapla, Jozef [Zostavovateľ, editor] ; Golian, Jozef [Recenzent] ; Capcarová, Marcela [Recenzent] ; Tančinová, Dana [Recenzent] ; Fikselová, Martina [Recenzent] ; Mendelová, Andrea [Recenzent] ; Zajác, Peter [Recenzent]. – 1. vyd. – Bratislava (Slovensko) : Slovenská spoločnosť pre vedy poľnohospodárske, lesnícke, potravinárske a veterinárne pri Slovenskej akadémii vied, 2023. – ISBN 978-80-8266-028-2, s. 103-104.
3. Kolarič, L., & Šimko, P. Eliminácia cholesterolu zo smotany a výroba nízko-cholesterolového masla. Bezpečnosť a kontrola potravín, 19 [06.04.2022-08.04.2022, Piešťany, Slovensko] In: Bezpečnosť a kvalita potravín [elektronický dokument] : zborník vedeckých prác / Golian, Jozef [Zostavovateľ, editor] ; Čapla, Jozef [Zostavovateľ, editor] ; Golian, Jozef [Recenzent] ; Capcarová, Marcela [Recenzent] ; Tančinová, Dana [Recenzent] ; Fikselová, Martina [Recenzent] ; Mendelová, Andrea [Recenzent] ; Zajác, Peter [Recenzent]. – 1. vyd. – Nitra (Slovensko) : Garmond, 2022. – ISBN 978-80-8266-007-7, s. 92-98.
4. Šimko, P., & Kolarič, L., Minarovičová, L., Kohajdová, Z., & Lauková, M.: Denný príjem cholesterolu obyvateľstva SR, dôsledky a možnosti riešenia súčasného stavu Bezpečnosť a kontrola potravín, 18 [25.03.2021-26.03.2021, Piešťany, Slovensko] In: Bezpečnosť a kontrola potravín [elektronický dokument] : Zborník odborných prác z XVIII. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou online / Golian, Jozef [Zostavovateľ, editor] ; Čapla, Jozef [Zostavovateľ, editor] ; Golian, Jozef [Recenzent] ; Capcarová, Marcela [Recenzent] ; Mendelová, Andrea [Recenzent]. – 1. vyd. – Nitra (Slovensko) : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2021. – ISBN 978-80-552-2354-4, s. 56-58.
5. Šimko, P., Kolarič, L., Minarovičová, L., Karovičová, J., Kohajdová, Z., & Lauková, M.: Nežiaduce zlúčeniny v potravinách a súčasné možnosti ich eliminácie. Bezpečnosť a kontrola potravín, 17 [26.03.2020-27.03.2020, Piešťany, Slovensko] In: Bezpečnosť a kontrola potravín [elektronický dokument] : zborník prác z 17. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou online, Piešťany, 26.3.-27.3.2020 / Fikselová, Martina [Recenzent] ; Golian, Jozef [Recenzent] ; Capcarová, Marcela [Recenzent] ; Mendelová, Andrea [Recenzent]. – 1. vyd. – Nitra (Slovensko) : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2020. – ISBN 978-80-552-2168-7, s. 87-90.

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Na základe výzvy

<https://mpsr.sk/vyzva-na-predkladanie-ziadosti-o-schvalenie-obsahovych-nametov-pre-podopatrenie-16-1-podpora-na-zriadovanie-a-prevadzku-operacnych-skupin-eip-zameranych-na-produktivitu-a-udrzatelnost-polnohospodarstv/1185-43-1185-15981/> oslovilo koordinátora projektu konzorcium výrobcov mlieka na Slovensku (Agrofarma Červený Kameň, sr.o. Lírio s.r.o. a Necpalská mliekareň, s.r.o.) so žiadosťou o účasť na projekte s názvom „Výroba mlieka a mliečnych výrobkov so zníženým obsahom cholesterolu“

Táto žiadosť bola MPRZ SR prijatá a tak bude prenos poznatkov z tohto projektu do praxe veľmi rýchly

<https://mpsr.sk/zoznam-prijatych-obsahovych-nametov-v-ramci-vyzvy-c-c-1-2020-pre-opatrenie-16-podopatrenie-16-1-prv-sr-2014-2020/1185-43-1185-16992/>

Je možné predpokladať započatie výroby bezcholesterolového mlieka a bezcholesterolových mliečnych výrobkov v časovom horizonte r.2024.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Mlieko a mliečne výrobky sú významnými potravinami v zdravej strave obyvateľstva. Na druhej strane je mliečny tuk bohatý na obsah cholesterolu, ktorý je rizikovým faktorom vzniku kardiovaskulárnych ochorení (KVO). KVO sú hlavnou príčinou úmrtnosti, najmä vo vyspelom svete, pričom dlhodobý vysoký príjem cholesterolu prostredníctvom potravín je jedným z najväznejších faktorov vzniku a progresie KVO. Keďže mlieko a mliečne výrobky sú konzumované vo veľkej miere, tak výroba výrobkov s nízkym obsahom cholesterolu by

mohla účinne znížiť vysoký príjem cholesterolu, čo by bolo jedným z kritických krokov v prevencii vzniku KVO. Cieľom projektu bolo vyvinúť a validovať účinnú metódu stanovenia obsahu cholesterolu v mliečnych výrobkoch metódou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s UV-DAD detekciou a pomocou tejto metódy skúmať možnosti odstraňovania cholesterolu z mlieka a smotany aplikáciou  $\beta$ -cyklodextrínu ( $\beta$ -CD) a ďalších vhodných sorbentov. Optimálne podmienky pre prípravu vzorky na stanovenie obsahu cholesterolu zahŕňovali proces saponifikácie pri zahrievaní vzorky v prítomnosti 15 cm<sup>3</sup> metanolického roztoku KOH s koncentráciou  $c = 1 \text{ mol/dm}^3$  počas 15 min a následnú dvojitú extrakciu cholesterolu pomocou 15 cm<sup>3</sup> zmesi n-hexán:chloroform (1:1, v/v). HPLC metóda pozostávala z izokratickej elúcie s prietokovou rýchlosťou 0,5 cm<sup>3</sup>/min, mobilnej fázy zloženej z acetonitrilu a metanolu v pomere 60:40 (v/v), stacionárnej fázy Zorbax Eclipse Plus C18 kolóny a z UV-DAD detekcie pri vlnovej dĺžke 205 nm. Pri týchto podmienkach prešla metóda in-house validačnými kritériami a jej vhodnosť bola potvrdená analýzou referenčných materiálov. V prípade optimalizácie parametrov opracovania mlieka a smotany s  $\beta$ -CD sa zistilo, že účinnosť odstraňovania cholesterolu ovplyvňovali také parametre, ako sú rýchlosť miešania a odstredovania, doba usadzovania a koncentrácia  $\beta$ -CD. V mlieku bola najvyššia miera odstránenia (99,4 %) pozorovaná pri 1,5 % (w/w)  $\beta$ -CD, zatiaľ čo v smotane bola najvyššia miera (94,3 %) dosiahnutá pri 5 % (w/w)  $\beta$ -CD. Na zachovanie akceptácie zo strany spotrebiteľov by organoleptické profily týchto produktov mali byť v optimálnom prípade rovnaké v porovnaní s pôvodnými. Počas experimentov bola dosiahnutá vysoká účinnosť odstraňovania cholesterolu z masla (95,6 %) aj tvarohu (97,9 %), pričom farebné rozdiely ( $\Delta E$ ) sa pohybovali od 0,27 do 0,57 a textúrne charakteristiky tiež neboli štatisticky významne ovplyvnené postupom odstránenia cholesterolu. Záverom sa dá teda konštatovať, že navrhovaný postup opracovania mlieka pomocou  $\beta$ -CD je vhodný pre výrobu nového sortimentu nízko-cholesterolových mliečnych výrobkov so značnými zdravotnými benefitmi pri prevencii vzniku KVO.

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

Milk and dairy products are important foods in a healthy diet. On the other hand, milk fat is a rich source of cholesterol, which can be a potential risk factor for cardiovascular diseases (CVD). CVDs are a major cause of mortality, especially in the developed world, while long-term high cholesterol intake through foods could be one of the most serious factors in CVDs. As milk and dairy products are consumed extensively, the production of low cholesterol products could effectively reduce high cholesterol intake, which would be one of the critical steps in CVD prevention. The purpose of this project was to develop and validate an efficient method for the determination of cholesterol content in dairy products based on high performance liquid chromatography (HPLC) method with UV-DAD detection and to study the processes of removing the cholesterol content from milk and cream with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and other suitable sorbents. Optimal conditions for sample preparation included a saponification process by heating the sample in the presence of 15 cm<sup>3</sup> of methanolic KOH solution with a concentration of 1 mol/dm<sup>3</sup> for 15 min and subsequent double extraction of cholesterol with 15 cm<sup>3</sup> of n-hexane:chloroform mixture (1:1, v/v). HPLC method consisted of isocratic elution with a flow rate of 0.5 cm<sup>3</sup>/min, a mobile phase composed of acetonitrile and methanol in a ratio of 60:40 (v/v), a stationary phase of a Zorbax Eclipse Plus C18 column and UV-DAD detection at a wavelength of 205 nm. Under these conditions, the method passed in-house validation criteria and its suitability was verified by analysis of reference materials. In the case of optimizing the treatment conditions of milk and cream with  $\beta$ -CD as the most appropriate sorbent it was found that the measure of cholesterol removal was influenced by mixing and centrifugation speed, settling time and  $\beta$ -CD concentration. In milk, the highest removal efficiency (99.4%) was observed at 1.5% (w/w)  $\beta$ -CD addition, while in cream the highest efficiency (94.3%) was observed at 5% (w/w)  $\beta$ -CD addition. To maintain consumer acceptance, organoleptic profiles of such products should be, in optimal case, the same with the comparison to original ones. During the experiment, high cholesterol removal efficiency was achieved in both butter (95.6%) and cottage cheese (97.9%), with colour differences ( $\Delta E$ ) ranging from 0.27 to 0.57, while texture characteristics were not affected significantly by cholesterol removal procedure. Therefore, it can be concluded that the procedure of milk treatment with  $\beta$ -CD is suitable technology for production of a new assortment of low-cholesterol dairy products with

significant health benefits towards prevention of CVD.