

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY

FOOD SCIENCES

6

ČÍSLO 15
PRAHA 1997
ISSN 0862-8653

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

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

Editorial board – Redakční rada

Head of the Editorial Board – Předseda

Ing. Zeno Šimůnek, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

Ing. Miloslav Adam, CSc., Ing. Luisa Benešová, prof. Ing. Dušan Čurda, CSc.,
prof. Ing. Jiří Davídek, DrSc., Ing. Jan Drbohav, CSc., Ing. Jiřina Houšová, CSc.,
prof. Ing. Ivo Ingr, DrSc., prof. Ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc.,
Ing. Olga Štiková, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

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

Editor-in-chief – Vedoucí redaktorka

RNDr. Marcela Braunová

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

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address.

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

Periodicity: The journal is published six times a year.

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

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

MERCURY CONTENTS IN FRUITING BODIES OF WILD GROWING EDIBLE MUSHROOMS

Pavel KALACH, Martina ŠLAPETOVÁ

Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice,
Czech Republic

Abstract: Total mercury content was determined using a cold-vapour AAS technique in 177 samples of 17 mushroom species. The samples were collected in unpolluted rural areas of the Czech Republic between 1994 and 1996. High mean values 4.56, 5.03, 5.04, 5.38, 6.96, 7.99 and 10.5 mg/kg dry matter were found in *Boletus edulis*, *Lepiota procera*, *Lepista nuda*, *Lepiota rhacodes*, *Agaricus campestris*, *Agaricus arvensis* and *Calocybe gambosa*, respectively. The maximal values were several times higher. Mercury was distributed unevenly within fruiting bodies of three *Boletus* species with the highest level in gills and the lowest in stems.

mushrooms; wild growing species; mercury content; distribution within fruiting bodies

Wild growing mushrooms have been a favourite delicacy in many countries. Collecting mushrooms has become a "national hobby" in the Czech Republic. Their annual consumption may exceed 10 kg in some individuals. However, it is well documented that some widely consumed species accumulate high levels of several heavy metals, from those namely cadmium and mercury are of toxicological significance (Seeger, 1982).

The objective of this survey was to enlarge existing data on mercury contents in commonly consumed mushrooms.

MATERIAL AND METHODS

Mushrooms were collected from unpolluted rural southern parts of the Czech Republic, mostly from South Bohemia, between 1994 and 1996. Samples were cleaned in the same manner as used for culinary purposes, cut and dried at ambient temperatures and stored at laboratory temperatures up to three months. In three *Boletus* species fully developed fruiting bodies were

separated into stems, gills and flesh of caps and mercury distribution was determined.

Total mercury content was determined in powdered samples (0.05–0.2 g) using a cold-vapour AAS analyzer (TMA-254, VŠCHT Prague) with a detection limit of 10 ng Hg/g. Mean differences between duplicates were 2%. Blank background levels were below the detection limit. Differences between determined and certified mercury contents in the reference green alga *Chlorella kessleri* were up to 7%.

RESULTS AND DISCUSSION

Mercury contents in total edible fruiting bodies in 177 samples of 17 mushroom species are given in Table I. The results proved that mercury contents are primarily species-dependent. The knowledge of environmental factors affecting great variability of mercury content within a species is very limited (Kojo, Lodenius, 1989). The effect of substrate contamination with mercury on the increased content of the element in fruiting bodies was documented (Minagawa et al., 1980; Kalač et al., 1996). Nevertheless, the correlations between mercury concentrations in substrates and fruiting bodies of different mushroom species were not significant (Falandysz, Kryszewski, 1996). However, in this survey no samples were collected from a site known to be polluted. In our opinion, the age of mycelium and a pause between fructifications may play an important role. Data given in Table I are in good agreement with our previous results (Kalač et al., 1989; Kalač, Stašková, 1994) and levels reported both from the Czech Republic (Cibulka et al., 1996) and from several European countries (Seeger, 1976a; Bargagli, 1986; Zurera et al., 1986; Falandysz et al., 1996). The mercury levels in some species given in Table I, namely in *Xerocomus lanatus* and *Entoloma saepium* have been not available until now.

Distribution of mercury within fruiting bodies of three *Boletus* species is given in Table II. The highest level was detected in gills, the lowest in stems. This observation proved the published data (Seeger, 1976b; Zurera et al., 1986; Kalač, Stašková, 1994).

I. Mercury contents in mushroom fruiting bodies

Family/Species	Number of samples <i>n</i>	Mercury contents [mg/kg dry matter]			
		<i>x</i>	<i>s_x</i>	<i>x_{min}</i>	<i>x_{max}</i>
Boletaceae					
<i>Boletus edulis</i>	8	4.56	2.50	0.73	7.66
<i>B. aestivalis</i>	10	2.97	3.02	0.32	8.58
<i>B. (Xerocomus) badius</i>	14	0.61	0.22	0.20	1.05
<i>B. (X.) chrysenteron</i>	7	0.66	0.16	0.47	0.95
<i>B. (X.) subtomentosus</i>	15	0.57	0.53	0.23	2.10
<i>Xerocomus lanatus</i>	5	1.01	0.59	0.55	1.91
<i>B. (Suillus) variegatus</i>	5	0.35	0.24	0.13	0.76
<i>B. scaber (Leccinum scabrum)</i>	12	0.28	0.16	0.13	0.72
Tricholomataceae					
<i>Calocybe gambosa</i>	14	10.5	7.33	2.39	32.7
<i>Lepista nuda</i>	9	5.04	2.61	1.34	9.62
Agaricaceae					
<i>Agaricus campestris</i>	8	6.96	3.59	0.55	11.1
<i>Agaricus arvensis</i>	17	7.99	5.32	2.66	25.5
<i>Lepiota rhacodes</i>	13	5.38	3.26	1.99	15.1
<i>Lepiota procera</i>	8	5.03	2.36	3.02	9.91
Amanitaceae					
<i>Amanita rubescens</i>	21	1.20	0.94	0.23	4.18
Entolomataceae					
<i>Entoloma chypeatum</i>	6	0.30	0.24	0.12	0.77
<i>Entoloma saepium</i>	5	0.09	0.04	0.05	0.15

Mean mercury contents exceeded 5 mg/kg dry matter in six widely consumed species and in some samples there were found values several times higher. Unfortunately, very limited information is available on chemical forms of mercury in edible mushrooms and virtually no data were published on mercury content changes during preservation and culinary treatments and

II. Distribution of mercury within fruiting bodies of three *Boletus* species

Species	Number of samples <i>n</i>	Stem [mg/kg dry matter]		Relative contents (stem = 1.0)			
				gills		flesh of cap	
		<i>x</i>	<i>s_x</i>	<i>x</i>	<i>s_x</i>	<i>x</i>	<i>s_x</i>
<i>B. edulis</i>	6	2.42	1.04	2.66	0.35	1.19	0.15
<i>B. aestivalis</i>	3	2.50	1.74	2.57	0.58	1.51	0.27
<i>B. badius</i>	6	0.51	0.27	1.91	0.47	1.13	0.52

on bioavailability in man. The earlier paper reports the proportion of methylmercury 1.2–16.4% from total mercury in the genus *Agaricus* (Stijve, Besson, 1976), while current results only 0.7–1.3% for *Boletus badius* and *Leccinum scabrum*. However, mushrooms are able to methylate labile Hg(II) and methylmercury accumulation factors may be as high as about 20 (Fischer et al., 1995).

Thus, due to current limited knowledge of mercury bioavailability from mushrooms in man, it may be recommended to limit consumption of accumulating species, including fruiting bodies grown in unpolluted areas.

The data presented in this survey may be used as background levels of mercury contents in some mushroom species growing in unpolluted areas.

Acknowledgement

The authors thank A. Debnar, K. Opelka, J. Schneider, Ing. J. Valter and P. Vampola for collecting mushroom samples and V. Svobodová and Ing. J. Bastl for technical assistance.

References

- BARGAGLI, R.: Accumulo di mercurio nei funghi eduli ed eventuali implicazioni per i consumatori. *Mic. Ital.*, 1986: 23–29.
- CIBULKA, J. – ŠIŠÁK, L. – PULKRÁB, K. – MIHOLOVÁ, D. – SZÁKOVÁ, J. – FUČÍKOVÁ, A. – SLÁMOVÁ, A. – STĚHULOVÁ, I. – BARLÁKOVÁ, S.: Cadmium, lead, mercury and caesium levels in wild mushrooms and forest berries from different localities of the Czech Republic. *Sci. Agric. Bohem.*, 27, 1996: 113–129.

- FALANDYSZ, J. – KRYSZEWSKI, K.: Rtec w grzybach i substracie spod grzybów z okolic Polanowic w gminie Gubin, województwo zielonogórskie. *Rocz. PZH*, 47, 1996: 377–388.
- FALANDYSZ, J. – MARCINOWICZ, A. – CHWIR, A.: Rtec w jadalnych grzybach z terenu lasów koscierskich i Mierzei Wislanej. *Rocz. PZH*, 47, 1996: 205–210.
- FISCHER, R. G. – RAPSOMANIKIS, S. – ANDREAE, M. O. – BALDI, F.: Bioaccumulation of methylmercury and transformation of inorganic mercury by macrofungi. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1995: 993–999.
- KALÁČ, P. – WITTINGEROVÁ, M. – STAŠKOVÁ, I. – ŠIMÁK, M. – BASTL, J.: Obsah rtuti, olova a kadmia v houbách. *Čs. Hyg.*, 34, 1989: 568–576.
- KALÁČ, P. – STAŠKOVÁ, I.: Těžké kovy v plodnicích volně rostoucích hub rodu pečařka (*Agaricus* spp.). *Potrav. Vědy*, 12, 1994: 185–195.
- KALÁČ, P. – NIŽNANSKÁ, M. – BEVILAQUA, D. – STAŠKOVÁ, I.: Concentrations of mercury, copper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a mercury smelter and a copper smelter. *Sci. Total Environ.*, 177, 1996: 251–258.
- KOJO, M.-R. – LODENIUS, M.: Cadmium and mercury in macrofungi – mechanisms of transport and accumulation. *Angew. Bot.*, 63, 1989: 279–292.
- MINAGAWA, K. – SASAKI, T. – TAKIZAWA, Y. – TAMURA, R. – OHSHINA, T.: Accumulation route and chemical form of mercury in mushroom species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25, 1980: 382–388.
- SEEGER, R.: Quecksilbergehalt der Pilze. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.*, 160, 1976a: 303–312.
- SEEGER, R.: Die Verteilung des Quecksilbers in der Fruchtkörpern von Steinpilzen und Champignons. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.*, 161, 1976b: 115–117.
- SEEGER, R.: Toxische Schwermetalle in Pilzen. *Dtsch. Apoth. Z.*, 122, 1982: 1835–1844.
- STIJVE, T. – BESSON, R.: Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *Agaricus*. *Chemosphere*, 5, 1976: 151–158.
- ZURERA, G. – RINCÓN, F. – ARCOS, F. – POZO-LORA, R.: Mercury content in mushroom species in the Cordova area. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 1986: 662–667.

Received July 4, 1997

Obsah rtuti v plodnicích volně rostoucích jedlých hub

Celkový obsah rtuti byl stanoven metodou AAS technikou studených par ve 177 vzorcích 17 druhů hub. Houby byly sbírány v letech 1994 až 1996 v převážně zemědělských oblastech České republiky pokládáných za neznečištěné. Vysoké průměrné

obsahy rtuti 4,56; 5,03; 5,04; 5,38; 6,96; 7,99 a 10,5 mg/kg sušiny byly zjištěny v hříbu smrkovém, bedle vysoké, čirůvce fialové, bedle červenající, pečárce polní, pečárce ovčí a čirůvce májovce. Maximální zjištěné hodnoty byly několikanásobně vyšší. Ve třech druzích rodu hřib je rtuť v plodnicích rozložena nerovnoměrně. Nejvyšší obsah je ve výtrusorodé části, nejnižší ve třeni.

jedlé houby; volně rostoucí druhy; obsah rtuti, rozložení v plodnicích

Contact address:

Doc. Ing. Pavel Kaláč, CSc., Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta
Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika
Phone: + 420 38 455 45, fax: + 420 38 498 69, e-mail: kalac@ZF.JCU.CZ

INFLUENCE OF SOAPS ON THE COURSE OF RAPESEED OIL BLEACHING

Walter SCHWARZ, Jiří BRÁT, Hana BROMOVÁ¹

SETUZA a.s., Ústí nad Labem; ¹Institute of Chemical Technology,
Prague, Czech Republic

Abstract: The present study is concerned with the influence of soaps on the course of bleaching. Model laboratory experiments found a more significant influence of soaps on the course of bleaching in concentrations that considerably exceed the real conditions in industry. In the bleaching of rapeseed oil with a bleaching clay Tonsil Optimum FF a pronounced deterioration of the oil colour was observed with the initial soap content in the oil 30 mg/kg.

bleaching; rapeseed oil; soaps; bleaching earth; oil colour

Adsorption bleaching is an integral part of refining process. Due to its intrinsic complexity this operation forms a constant part of research programmes of a number of R & D laboratories and institutions. Lately the research in this field is orientated towards development of new types of adsorbents (Morton, Griselli, 1990), their combined use with classic bleaching earth, and towards technological changes, e.g. wet and dry bleaching process in two stages, etc.

All these trends are based on the fact that vegetable oil, besides coloured pigments, contains a number of other substances that influence or are able to influence the bleaching. These are particularly phospholipids, soaps, metal complexes and others (Kheok, Lim, 1982; Ong, 1983; Gutfinger, Letan, 1978). The activity of bleaching earth is negatively influenced by soap. Acid groups of activated montmorillonite decompose the soap and free fatty acid on the one hand and inactivate – neutralize themselves on the other. It is necessary therefore to maintain the soap content at the lowest level. The oil must be thoroughly washed (Bockisch, 1993).

MATERIAL AND METHODS

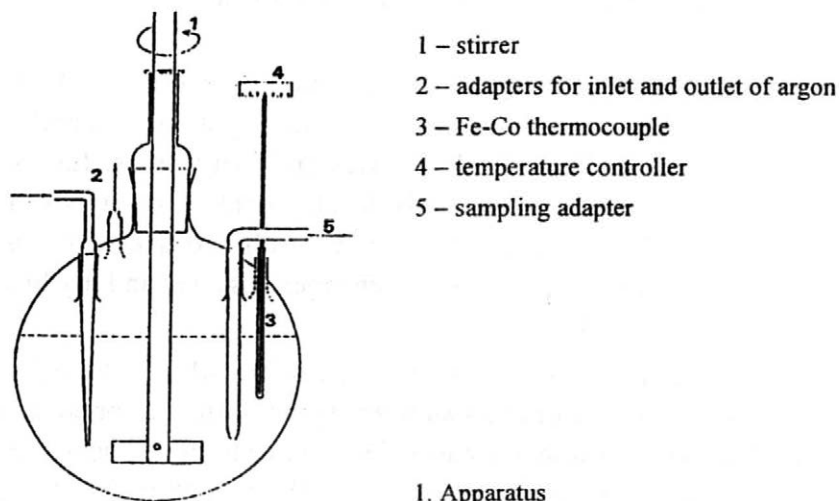
Raw materials

This study based on model laboratory experiments monitors the influence of soaps present in oil on the course of bleaching. The starting material used

was industrially deacidified erucic acid free rapeseed oil [acid value 0.23 mg KOH/g of oil, phospholipid content expressed as phosphatidylcholine 0.01 wt. %, individual fatty acids wt. %: C 18:1 – 46.8; C 18:2 – 14.0; C 18:3 – 4.6; C 16:0 – 3.5; others are below 1 wt. %, colour of oil by Naudet–22 (Naudet, Drap, 1960)] and commercially available bleaching earth Ton-sil Optimum FF.

Apparatus and Method

The layout of the apparatus used is in Fig. 1. The bleaching was done in two-litre flask equipped with adapters for sampling, inlet and outlet of argon and for Fe-Co thermocouple for temperature measuring and regulation. The temperature was maintained at 95 °C. Each experiment was run with 800 g of oil and 8 g of bleaching earth, i.e. 1 wt. %.



RESULTS AND DISCUSSION

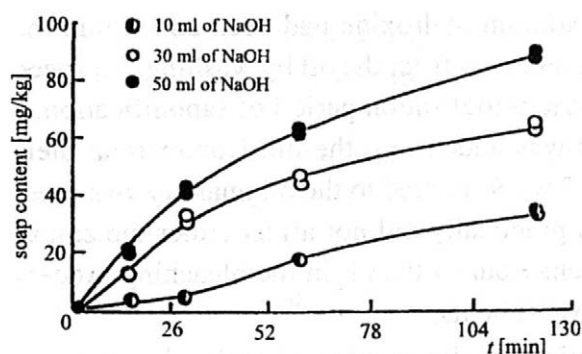
To obtain experimental results transferable into practice, the arrangement of the experiments were to be as close as possible to real technological conditions. That is why, as far as the effect of soaps on bleaching is concerned, it was necessary to ensure a uniform dispersion of soaps in oil similar to that normally observed in practice after alkali refining is completed. A direct addition of soaps into the deacidified oil proved to be unsuitable. That is why another method was chosen. Before the bleaching itself started, a small por-

tion of concentrated solution of sodium hydroxide had been added into the oil. The soaps produced were not removed from the oil by washing. To speed up the process, and to overcome the initialisation period of saponification, a small amount of free fatty acids was added into the oil. Commercial oleic acid at the amount of 1.6 g, i.e. 0.2 wt. % related to the oil quantity was used. This small amount of fatty acids practically did not affect either the colour characteristics of the oil or the behaviour of the oil in the bleaching process when compared with reference experiments.

In a series of laboratory experiments the amount of hydroxide solution added, and the period of its action in oil varied. The concentration of the hydroxide solution added into individual series of experiments oscillated at the upper limit of its solubility in water so that a possible influence of water on the bleaching could be eliminated. The concentration of the solution used was 19.72 mol/l. The experiments then represented a combination of one of the quantities of hydroxide (10 ml, 30 ml and 50 ml) with various reaction times (15, 30, 60, or 120 min). This produced various initial concentrations of soaps in the oil before bleaching. The different amounts of the hydroxide added, and the inconstant reaction times enabled us to determine a possible effect of unreacted hydroxide on the course of bleaching. The determination of the content of soaps was based on the determination of free fatty acids after acid hydrolysis of the samples taken, consequent determination of acid value (DGF-Einheitsmethode..., 1987), and a re-calculation using the mean molecular weight of the fatty acids of rapeseed oil used for experiments. Fig. 2 shows the kinetics of soap origination in oil with different amounts of NaOH, and different reaction times.

It is obvious that the highest growth of soap content was obtained when a higher amount of hydroxide was added. When comparing both factors, i.e. the time of hydroxide action and its quantity, we can see various initial concentrations of soaps formed in oil before bleaching, ranging from 0 to 85 mg/kg. In the course of individual experiments samples were taken at 4th, 8th, 16th and 32th minute from the beginning of the addition of adsorbent ($t = 0$). It was then possible to monitor both the kinetics of the bleaching itself, and the depth of bleaching, i.e. the equilibrium concentration of coloured substances in oil. A method recommended by Naudet and Drap (1960) was chosen to express the content of coloured substances in oil, and

2. Time dependence of soap formation in oil before bleaching tests



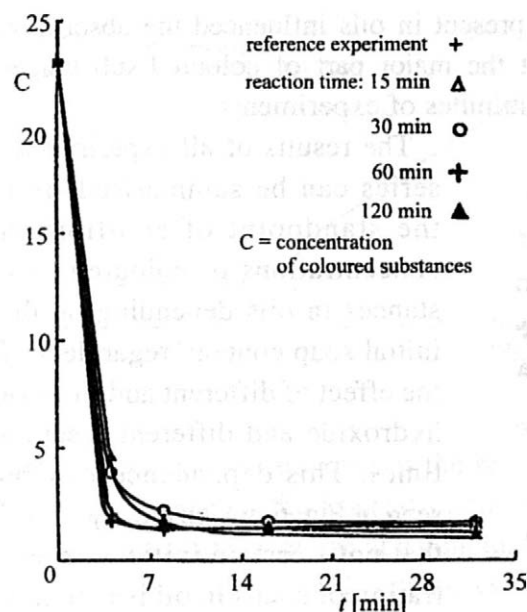
to compare a relative bleaching effect within the framework of the experiments carried out. According to this method the concentration of coloured substances is related to the expression

$$C = 100 \cdot \log \frac{100}{Y}$$

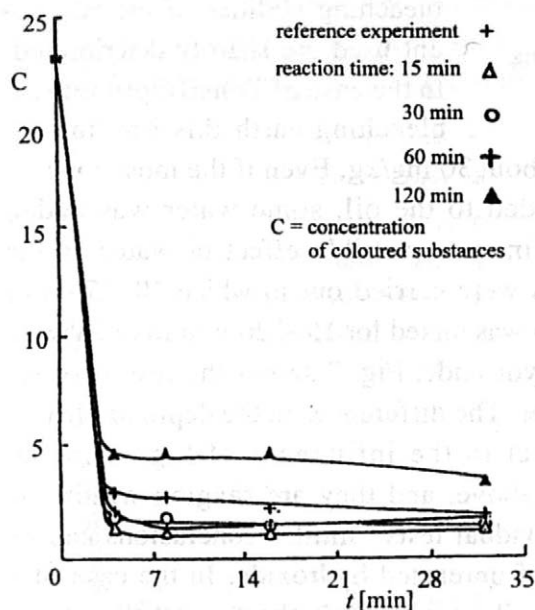
where: Y – one of the co-ordinates of the objective description of colour worked out by the International Commission on Illumination (CIE)

The use of this system is regulated by a number of national standards (ČSN 01 1718; DIN 5033; ASTM E 308; NF X 08-012). The calculation of tristimulus values of the colour issues from the distribution coefficients of the given trichromatic system, and from the spectral composition of measurements of coloured stimuli of the samples measured. The calculation is based on the fact that every colour can be imitated by an additive mixture of specific lights of the given trichromatic system. The transmittance values ranging from 380–770 nm (10 nm increments) are multiplied by corresponding distribution coefficients, and the sums of these partial products give the dimensions of tristimulus values X , Y and Z . The value of Y component equals the hundredfold of the transmission factor of the coloured stimulus measured. The correlation dependence of C values on colour scales was proved among others in another work (Brát et al., 1988).

Figs. 3, 4 and 5 show time dependence of the bleaching of modified raw material with an intentionally increased initial content of soaps. Fig. 3 describes the time dependence of the course of bleaching after the addition of 10 ml of concentrated NaOH and different reaction times. In dependence on the reaction time of the hydroxide the content of soaps was ranging from 0 to



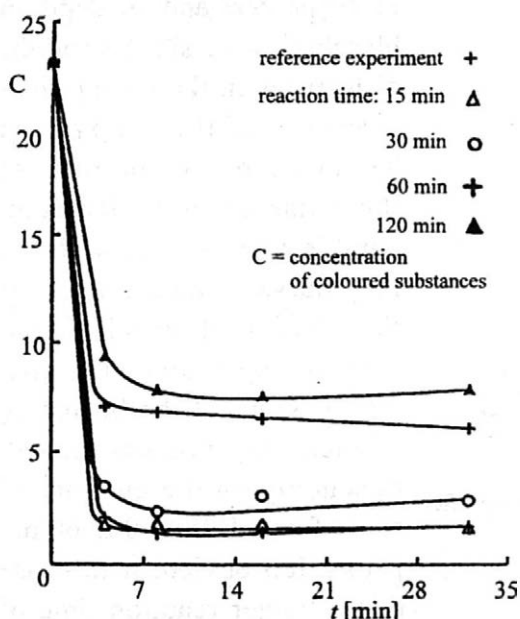
3. Time dependence of the course of bleaching after the addition of 10 ml of NaOH



4. Time dependence of the course of bleaching after the addition of 30 ml of NaOH

30 mg per kg. The curves describing the course of bleaching show that both the velocity of the process and the depth of bleaching were similar and the differences in the colour characteristics of the samples can be considered as the limit of the noise of mutually comparable results. Fig. 4 shows the course of bleaching after the addition of 30 ml of concentrated hydroxide. The content of soaps at the beginning of bleaching process ranged, depending on the quantity of soaps formed, from 0 to 60 mg per kg. It is obvious in this case that a longer reaction time of the hydroxide in oil (60 and 120 min) with a consequent pronounced growth of soap content in oil influences the course of bleaching itself. Even more pronounced are these differences when 50 ml of hydroxide is added to the oil. In such cases the content of soaps oscillated between 0 and 80 mg/kg. Reaction times of 30 minutes and more (Fig. 5) induced significantly different colour characteristics of the oil in the final phase of bleaching. Nearly all the cases of time dependence describing the course

of bleaching showed that the soaps present in oils influenced the absorption velocity only very slightly, and that the major part of coloured substances was removed during the initial four minutes of experiments.

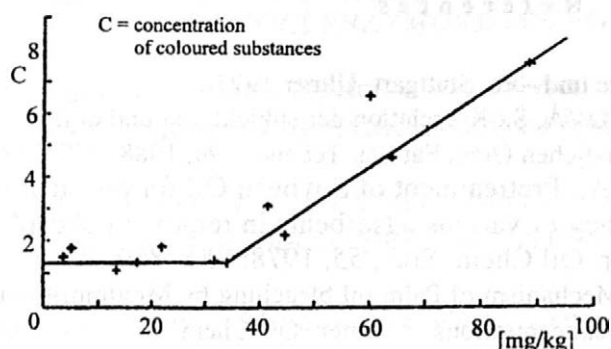


5. Time dependence of the course of bleaching after the addition of 50 ml of NaOH

initial soap concentration in oil was about 30 mg/kg. Even if the most concentrated hydroxide solution was added to the oil, some water was added together with the hydroxide. To eliminate possible effect of water on the course of bleaching, reference tests were carried out in which 10–15 ml of water was added to the oil, and the oil was mixed for 15–120 min in individual tests in the same way as with the hydroxide. Fig. 7 shows the results of selected tests after the addition of water. The differences in the depth of bleaching are insignificant, with respect to the influences of higher initial concentrations of soaps discussed above, and they are ranging within the limit of noise of the results of individual tests. Similar conclusions can be reached with respect to the effect of unreacted hydroxide. In the case of a short reaction time of hydroxide in oil even at the highest quantities of hydroxide added, the time dependence of the course of bleaching differed very

The results of all experimental series can be summarised from the standpoint of equilibrium concentrations of coloured substances in oils depending on the initial soap content, regardless of the effect of different additions of hydroxide and different reaction times. This dependence can be seen in Fig. 6, which clearly shows that until certain initial concentration of soaps in oil is reached, the bleaching process is insignificantly influenced but when this concentration is exceeded, the bleaching abilities of the adsorbent used are sharply deteriorated. In the case of Tonsil Optimum FF bleaching earth this limiting in-

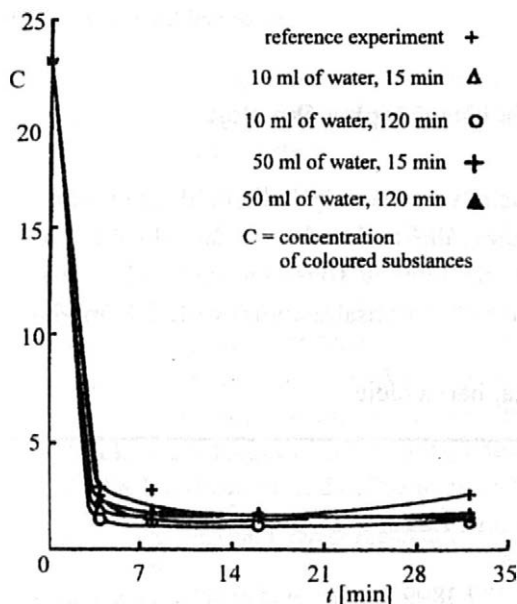
6. Dependence of equilibrium concentration of coloured substances in oil before the bleaching itself



slightly from those observed in the reference test. As a matter of fact these were the tests with the highest content of unreacted hydroxide in the oil. Based on this we can arrive at a conclusion that the effect of hydroxide itself on the removal of coloured substances was not so pronounced.

In conclusion it can be said that if there was observed a more pronounced effect of soaps on the process of adsorption bleaching in relation to the removal of coloured substances caused by the action of increased content of soaps in neutralised oil, this was seen at concentrations exceeding those used in usual technological practice. Laboratory test showed that the limit for rapeseed oil bleaching with Tonsil Optimum FF oscillates around 30 mg/kg. In

connection with the study of the effect of soaps on the course of bleaching of rapeseed oil, a potential influence of water added together with hydroxide solution was studied too. In accordance with the results obtained from reference tests it can be said that the addition of water ranging from 10 ml to 50 ml per 800 g of oil modified the bleaching process insignificantly.



7. Time dependence of the course of bleaching after the addition of water

References

- BOCKISCH, M.: Nahrungsfette und -öle. Stuttgart, Ulmer 1993.
- BRÁT, J. – ZAJÍC, J. – TKÁČOVÁ, Š.: Korrelation der subjektiven und objektiven Bewertung der Farbe von pflanzlichen Ölen. *Fat Sci. Technol.*, 90, 1988: 257–258.
- GUTFINGER, T. – LETAN, A.: Pretreatment of Soybean Oil for physical refining: evaluation of efficiency of various adsorbents in removing phospholipids and pigments. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 55, 1978: 856–859.
- KHEOK, S. C. – LIM, E. E.: Mechanism of Palm oil bleaching by Montmorillonite clay activated at various acid concentrations. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 59, 1982: 129–131.
- MORTON, R. B. – GRISELLI, F.: Stability and quality aspects in Edible oil refining with Trisyl Silica. 46. DGF Vortragstagung 1990, Nürnberg.
- NAUDET, M. – DRAP, C.: Sur la décoloration des huiles par les agents physiques d'adsorption. I. – Considérations générales et aspects théoriques du problème. *Rev. Franc. Corps Gras*, 7, 1960: 127–134.
- ONG J., T. L.: Oil recovery from spent bleaching earth and disposal of the extracted material. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 60, 1983: 266A–267A.
- ASTM E 308: Spectrophotometry and description of color in CIE 1931 System. 1981.
- ČSN 01 1718: Měření barev. 1975.
- DGF-Einheitsmethode C III 15: Seifen. 1987.
- DIN 5033: Farbmessung. 1979.
- NF X 08-012: Méthodes et appareils de mesures des caractéristiques colorimétriques 1974.

Received December 3, 1996

Vliv mýdel na průběh bělení řepkového oleje

Modelové laboratorní pokusy zaznamenaly významnější vliv mýdel na průběh bělení oleje v koncentracích, které převyšují reálné podmínky v průmyslové praxi. Při bělení bezerukového řepkového oleje s bělicí hlinkou Tonsil Optimum FF docházelo k výraznému zhoršení barvy oleje při počátečním obsahu mýdel v oleji 30 mg/kg.

bělení; řepkový olej; mýdla; bělicí hlínka; barva oleje

Contact address:

Ing. Walter Schwarz, CSc., SETUZA a.s., Žukovova 100
401 29 Ústí nad Labem, Česká republika
Phone: + 420 47 529 2230, fax: + 420 47 529 3899, e-mail: walter.schwarz@setuza.cz

POROVNÁNÍ A OPTIMALIZACE METOD STANOVENÍ SALMONEL POMOCÍ ENZYMOVÉ IMUNOANALÝZY*

Comparison and Optimisation of Methods for Determination of Salmonellas by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Kateřina MÁLKOVÁ, Igor HOCHÉL, Ladislav FUKAL, Kateřina DEMNEROVÁ,
Pavel RAUCH¹, Jiří ŠKVOR², Martin POPLŠTEIN², Gary M. WYATT³

¹Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology; ²Institute of Sera and Vaccines, Prague, Czech Republic;

³Institute of Food Research – Norwich Laboratory, Norwich, United Kingdom

Abstract: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) for detection of different *Salmonella enteritidis* antigens have been developed, using both commercially available and laboratory prepared antibodies. The direct and indirect sandwich ELISAs enable detection of 2×10^3 – 4×10^4 cells/ml or 1×10^4 to 3×10^5 cells/ml. However the indirect competitive assay could not be advised as a screening method because of high detection limit (1×10^6 cells/ml). The system of detection salmonellas via somatic O-antigen seems to be more efficient than with flagellar H-antigen. The sensitivity of developed indirect sandwich ELISA was further three times increased using Biotin-Streptavidin amplification system. The results were compared with commercially available kits (TECRA Diagnostics).

Salmonella; O:9,12 antigen; H-antigen; polyclonal antibodies; monoclonal antibodies; direct and indirect sandwich ELISA; competitive indirect ELISA; Biotin-Streptavidin system

Abstrakt: Kombinací řady připravených i zakoupených protilátek proti různým antigenům *Salmonella enteritidis* bylo vypracováno několik variant stanovení salmonel enzymovou imunoanalýzou (ELISA): přímá (detekční limit 2×10^3 až 4×10^4 buněk/ml) i nepřímá sendvičová ELISA (1×10^4 až 3×10^5 buněk/ml) a také nepřímá kompetitivní ELISA (1×10^6 buněk/ml). Stanovení prostřednictvím protilátek proti somatickému O-antigenu bylo citlivější v porovnání s použitím protilátek proti flagelárním H-antigenům. U stanovení nepřímou sendvičovou ELISA lze dosáhnout dalšího trojnásobného snížení detekčního limitu aplikací

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

komerčního amplifikačního systému biotin-streptavidin. Dosažené detekční limity byly porovnány se zjištěnými parametry komerčně dostupných souprav firmy TECRA Diagnostics.

Salmonella; O:9,12 antigen; H-antigen; polyklonální protilátky; monoklonální protilátky; přímá a nepřímá sendvičová ELISA; kompetitivní nepřímá ELISA; biotin-streptavidin

V současné době jsou salmonely stanovovány, případně určovány, konvenčními mikrobiologickými postupy podle normy ČSN ISO 6579 (56 0088). Tato metoda je však značně pracná a časově náročná (5–7 dní), a proto vzniká stále větší potřeba alternativní screeningové metody umožňující rychlou kontrolu vstupů a výstupů průmyslovými laboratořemi. Stanovení využívající imunochemickou techniku ELISA jsou dostatečně rychlá a citlivá a proto vyhovují těmto požadavkům.

Pro každé určité stanovení musí být metody ELISA šity na míru. Proto je nezbytně nutné nalézt nejvhodnější uspořádání testu a provést časově náročnou optimalizaci. Avšak zpracování velkého množství vzorků si od screeningové metody vyžaduje přesnost a reprodukovatelnost. U metod, případně i komerčních souprav je posuzována její pracnost, časová náročnost a v neposlední řadě též cenová dostupnost.

V práci jsou porovnány tři vyvinuté metody ELISA v několika různých variantách, lišících se navzájem typem a použitím protilátek i antigenů, a jedna z nejrozšířenějších komerčně dostupných souprav firmy Tecra Diagnostics.

Salmonely mají charakteristickou antigenní skladbu. Charakteristickými typy antigenů salmonel jsou:

1. Somatické antigeny, obsažené v bakteriální stěně. Nejblíže k povrchu jsou uloženy K-antigeny kapsulární, v hlubší vrstvě O-antigenní komplexy a nejhluběji je umístěn R-antigen. Somatické O-antigeny lipopolysacharidické povahy jsou nejdůležitějšími antigeny salmonel; na základě O-antigenních specifit se provádí klasifikace různých kmenů salmonel. Pro diagnostické účely se O-antigen získává po rozrušení bičíkových a kapsulárních antigenů.
2. Bičíkový H-antigen je bílkovinné povahy. Příprava H-antigenu použitého v analýzách byla popsána v předcházející práci (Málková et al., 1996).

Na základě O a H antigenních specifit se provádí určení serologické skupiny salmonel (Kauffmann, 1966, 1972; Popoff et al., 1992).

Kromě uvedených specifických antigenů, které odlišují různé rody enterobakterií, existuje ještě jeden flagelární antigen, společný všem příslušníkům Enterobacteriaceae (common structural antigen) – CSA-antigen, který má rovněž bílkovinnou povahu.

V práci byly testovány možnosti detekce salmonel pomocí protilátek proti rozdílným antigenům na příkladě nejčastěji vyskytujících se serovarů *Salmonella enteritidis* (za rok 1994 94 % z celkového množství onemocnění salmonelózou) a *Salmonella typhimurium* (ve stejném období 3 % – data jsou zpracována z podkladů Státního zdravotního ústavu v Praze, Centra epidemiologie ze dne 29. 3. 1995).

MATERIÁLY A METODY

Použité antigeny

Antigeny O:9,12 a O:4,5,12 byly zakoupeny u firmy Imuna Šarišské Michaľany, SR; přípravu H-antigenu použitého v analýzách popsali Málková et al. (1996).

Kvantifikace antigenu

Jelikož v práci bylo použito různých antigenů, za jednotku množství byl vybrán počet bakteriálních buněk/ml. Koncentrace pak byla stanovena počítáním buněk pomocí fázové kontrastní mikroskopie nebo použitím empirického vztahu mezi koncentrací buněk a turbiditami při 410 nm.

Protilátky

Pro analýzy bylo využito několika typů monoklonálních a polyklonálních protilátek, jak komerčně dostupných, tak i laboratorně připravených.

- Protilátky proti O-antigenům:
 - komerční *Salmonella* O antiserum polyvalentní OA:1,2,12; O:4,5,12; O:9,12; O:9,46; O:3,10; O:1,3,19; O:21 (Imuna Šarišské Michaľany, SR);
 - antisera laboratorně připravená imunizací králíků činčila bílá (ÚHKT Praha) proti somatickému antigenu O:9,12 (Imuna Šarišské Michaľany, SR);
 - laboratorně připravená protilátka získaná imunizací myši BALB/c (ÚSOL Praha) O:9,12 antigenem (Imuna Šarišské Michaľany, SR).

- Protilátky proti flagelárním H-antigenům:
 - monoklonální protilátka proti H-antigenům, specifická k serovaru *S. enteritidis* (Lee et al., 1990; Wyatt et al., 1990, 1992; 1993 – IFR-0107 Norwich, UK).
- Byla též použita komerční protilátka CSA-1 (Bac Trace™ Antibodies, Gaithersburg, Velká Británie), jež má velmi široké spektrum specifit pro různé serovary salmonel a je vhodnou protilátkou pro navázání buněk salmonel z roztoku na povrch mikrotitračních destiček.
- Antiimmunoglobulinové protilátky komerčně značené křenovou peroxidasou (HRP):

Pro vlastní detekci byly v některých uspořádáních metod ELISA použity následující protilátky:

 - kozí protilátka proti myším IgG-GAM/HRP (goat-anti-mouse/HRP, Sigma A4416);
 - prasečí protilátka proti myším IgG-SwAM/HRP (swine-anti-mouse/HRP, SEVAC Praha);
 - prasečí protilátka proti králíčím IgG-SwAR/HRP (swine-anti-rabbit/HRP, SEVAC Praha).
- Protilátka komerčně značená biotinem: Byla použita kozí protilátka proti myším IgG-GAM/Biotin (goat-anti-mouse/Biotin, Amersham Buchler GmbH, SRN; RPN-1177).

Izolace a značení imunoglobulinů

Všechna získaná polyklonální antisera byla podrobena frakčnímu srážení (Harboe, Ingild, 1973) a izolované separátní imunoglobulinové frakce byly dále označovány jako protilátky. Ke značení protilátek křenovou peroxidasou (RZ = 3, grad I; Boehringer Mannheim GmbH, SRN) byla použita jodistanová oxidační metoda (Wilson, Nakane, 1978). Parametry připravených konjugátů a jejich optimální koncentrace jsou uvedeny v tab. I.

1. Přímá sendvičová technika – provedení ELISA

Toto uspořádání vyžaduje značenou specifickou detektorovou protilátku (PL1-HRP), která však může být totožná s protilátkou vazebnou PL1 (schéma 1).

Na povrch polystyrenové mikrotitrační destičky byla imobilizována po dobu 16 hodin při teplotě 2–4 °C vazebná protilátka, ředěná na koncentraci 1–10 µg bílkoviny/ml 0,05M karbonát-bikarbonátového pufru pH 9,6. Po

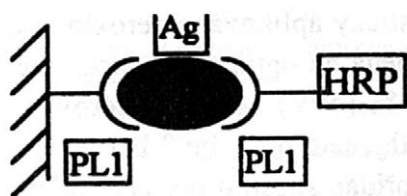


Schéma 1

trojnásobném promytí stejným pufrům v automatické promývačce destiček byly nena-
vázané imunoglobuliny odstraněny a do
jamek destičky napipetovány vzorky, pří-
padně standardy pro vytvoření kalibračních
křivek a inkubovány 2 h při 37 °C. Následo-
valo trojnásobné promývání roztokem PBS
s přísadkou 0,05% (V/V) Tween-20 (pro-

I. Přímá sendvičová ELISA – parametry připravených IgG značených křenovou peroxidasou –
Direct sandwich ELISA – the parameters of prepared conjugate IgG labelled with horseradish
peroxidase

Označení protilátky ¹	Poměr HRP/IgG ²	Koncentrace ³ [g/ml]	Detekční limit ⁴ [buněk/ml]
Imuna ^{a*}	1,65	1,54	3,9x10 ⁴
Imuna ^{a*}	6,66	0,34	1,2x10 ⁴
ÚHKT (O:9,12)-1 ^{b#}	1,11	0,64	6,2x10 ³
ÚHKT(O:9,12)-1 ^{b#}	1,20	3,30	2,4x10 ³
ÚHKT(O:9,12)-2 ^b	1,83	1,25	1,8x10 ⁴
ÚSOL O:9,12 ^c	1,96	1,88	3,0x10 ⁴
ÚSOL O:4,5,12 ^c	2,49	1,17	2,5x10 ⁴

Protilátka vazebná je totožná s protilátkou detektorovou. Detektorová protilátka je laboratorně
značená křenovou peroxidasou (schéma 1). V případech * a # se jedná o stejným způsobem
připravené konjugáty IgG/HRP, které vykazovaly různé parametry – The capture antibodies are
identical to detector antibodies. The detector antibodies are labelled with horseradish peroxidase
(scheme 1) conjugates IgG/HRP * and # are identically prepared, however their parameters
are different.

1. Description of antibodies:

- Commercially available polyclonal antiserum against *Salmonella* antigens OA:1,2,12;
O:4,5,12; O:9,12; O:9,46; O:3,10; O:1,3,19; O:21 (Imuna Šarišské Michalany, Slovak Repub-
lic);
- laboratory raised antiserum in rabbits (1 and 2) against somatic O:9,12 (ÚHKT Praha
– Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic);
- laboratory raised antiserum in mouse BALB/c against somatic antigens *Salmonella* O:9,12
and O: 4,5,12 (ÚSOL Praha - Institute of Sera and Vaccines, Prague, Czech Republic).

2. Molecular proportion horseradish peroxidase/IgG.

3. Optimal concentration of conjugate.

mývací roztok PBS-Tween). Poté byla do destičky aplikována peroxidasou značená detektorová protilátka, která byla ředěna na optimální koncentraci (tab. I) roztokem PBS+Tween s obsahem 1 % (w/V) hovězího sérového albuminu (BSA). Protilátka interagovala s antigenem po dobu 2 h a teplotě 37 °C. Nakonec byla destička opět promyta, přidán substrát pro peroxidasu a po zastavení enzymové reakce byla míra zbarvení měřena na fotometru pro mikrotitrační destičky. Analýza byla provedena vždy nejméně ve dvou paralelních stanoveních.

2. Nepřímá sendvičová technika – provedení ELISA

Tato technika nevyžaduje proces značení specifické protilátky peroxidasou, avšak není možné použít vazebnou (PL1) a detektorovou (PL2) protilátku stejného živočišného druhu (schéma 2).

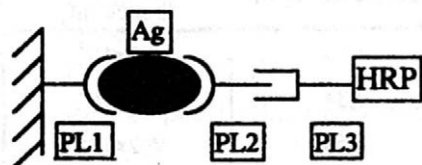


Schéma 2

Na povrch mikrotitrační destičky byla imobilizována 16 h při teplotě 2–4 °C protilátka zředěná na optimální koncentraci (tab. II) 0,05M karbonát-bikarbonátovým pufrům pH 9,6. Po trojnásobném promytí promývacím roztokem PBS-Tween v automatické promývačce destiček následovala saturace povrchu inertní bílkovinou

(PBS+1% BSA, inkubace 1–2 h, 37 °C) a po opětovném promytí byly do jamek destičky napipetovány vzorky případně standardy a inkubovány 2 h při 37 °C. Následovalo pětinasobné promytí jamek promývacím roztokem (PBS-Tween), načež byla přidána detektorová protilátka o koncentraci 1–2 µg bílkoviny/ml (tab. II) a po další inkubaci (2 h, 37 °C) a promývání i peroxidasou značená antiimunoglobulinová protilátka (anti-species tab. IV) zředěná na vhodnou koncentraci pufrům PBS s přídavkem 0,05% (V/V) Tween-20. Destička byla naposledy promyta, přidán substrátový roztok pro peroxidasu a enzymová reakce kvantifikována pomocí fotometru. Analýza byla provedena nejméně ve dvou paralelních stanoveních.

3. Kompetitivní nepřímá technika ELISA

Kompetitivní technika může využít pouze specifických protilátek (schéma 3); antigen (buňky salmonel) je vhodné prokřížit bifunkčním činidlem (např. glutaraldehydem).

II. Porovnání detekčních limitů různých uspořádání nepřímé sendvičové ELISA – The comparison of detection limits of different systems of indirect sandwich ELISA

Označení vazebné protilátky ¹	Označení detektorové protilátky ²	Značená AntiIgG ³	Detekční limit (buněk/ml) ⁴
ÚHKT-1 ^a	ÚSOL O:9,12 ^c	SwAM/HR	1,4×10 ⁴
ÚHKT-1 ^a	ÚSOL O:9,12 ^c	GAM/Biotin	4,7×10 ⁴
ÚSOL O:9,12 ^c	ÚHKT-1 ^b	SwAR/HRP	1,1×10 ⁵
ÚSOL O:4,5,12 ^c	ÚHKT-1 ^b	SwAR/HRP	2,6×10 ⁵
CSA-1 ^d	IFR-0107 ^e	GAM/HRP	3,4×10 ⁴
CSA-1 ^d	IFR-0107 ^e	GAM/Biotin	1,1×10 ⁴

1. Source of used capture antibodies:

- Commercially available polyclonal antiserum against *Salmonella* antigens OA:1,2,12; O:4,5,12; O:9,12; O:9,46; O:3,10; O:1,3,19; O:21 (Imuna Šarišské Michaľany, Slovak Republic);
- laboratory raised antiserum in rabbits (1 and 2) against somatic O:9,12 (ÚHKT Praha – Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic);
- laboratory raised antiserum in mouse BALB/c against somatic antigens *Salmonella* O:9,12 and O:4,5,12 (ÚSOL Praha – Institute of Sera and Vaccines, Prague, Czech Republic);
- commercially available antibody against common structural antigen of Enterobacteriaceae (CSA, Bac Trace™ Antibodies, Gaithersburg, UK).

2. Source of detector antibodies:

- add 1;
- monoclonal antibodies against H-antigens, specific to *S. enteritidis* (IFR0107, Institute of Food Research, Norwich, UK).

3. Used anti-IgG antibodies and their label.

4. Detection limit of described system.

Antigen naředěný 0,05M karbonát-bikarbonátovým pufrům pH 9,6 na koncentraci 5×10⁵ buněk/ml byl ponechán po dobu 16 h při 2–4 °C prosté sorpci na hydrofóbní povrch polystyrenové mikrotitrační destičky. Poté byl přidán glutaraldehyd (výsledná koncentrace 0,125 % V/V) a po 15 min stání při laboratorní teplotě dosaženo prokřížení antigenu (Brington, 1992). Nenavázaný antigen byl odstraněn automatickým promytím v pěti cyklech promývacím roztokem PBS s přísadkou 0,05% (V/V) Tween-20 a následovala saturace povrchu inerti bílkovinou (PBS+1% BSA, 1–2 h, 37 °C).

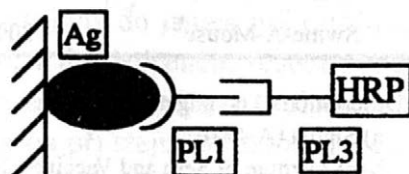


Schéma 3

III. Nepřímá kompetitivní ELISA; souhrn dosažených detekčních limitů (schéma 3) – Indirect competitive ELISA; summary of detection limits (scheme 3)

Označení detektorové protilátky ¹	Označení AntiIgG ²	Detekční limit (buněk/ml) ³
ÚHKT1 ^a	SwAR	1,0×10 ⁶
ÚHKT2 ^a	SwAR	1,1×10 ⁶
ÚSOL O:9,12 ^b	SwAM	4,3×10 ⁶

1. Source of detector antibodies:

- laboratory erased rabbit antisera (1 and 2) against somatic antigen O:9,12 (ÚHKT Praha – Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic);
- laboratory erased mouse antiserum against somatic antigen O:9,12 (ÚSOL Praha – Institute of Sera and Vaccines, Prague, Czech Republic).

2. Used anti-IgG antibodies and their label.

3. Detection limit of described system.

Jamky destičky byly znovu pětinasobně promyty promývacím roztokem. Poté byla do jamek destičky aplikována detektorová protilátka (tab. III) naředěná na koncentraci 1–2 µg bílkoviny/ml a zároveň i vzorky případně standardy pro vytvoření kalibračních křivek (vše ředěno roztokem PBS-Tween a inkubováno 2 h při 37 °C). Poté byly nezreagované složky odstraněny promytím a do destičky napipetována optimálně zředěná v PBS-Tween peroxidasou značená antiimmunoglobulinová protilátka (tab. IV) a inkubována 2 h při 37 °C. Nakonec byly jamky znovu promyty a uskutečněna enzymová reakce přidáním substrátového roztoku pro peroxidasu, kvantifikovaná po proběhnutí pomocí fotometru pro mikrotitrační destičky. Analýza byla provedena vždy nejméně ve dvou paralelních stanoveních.

IV. Optimální ředění komerčních značených antiimmunoglobulinových protilátek – The optimal dilution factors of commercially labelled anti-immunoglobulin antibodies

Označení protilátky ¹	Ředící faktor ²	Označení protilátky	Ředící faktor
Goat-A-Mouse ^a	1000x	Swine-A-Rabbit ^c	2000x
Swine-A-Mouse ^b	2000x	Goat-A-Mouse ^d	1000x

1. Description of conjugate, source:

- Sigma (A-4416);
- Institute of Sera and Vaccines, Prague, Czech Republic;
- Amersham Buchler GmbH (RPN-1051).

2. Used diluting factor.

Příprava substrátových roztoků pro peroxidasu

V práci byly použity dva typy připravovaných substrátových roztoků, lišících se především chromogeny. V předcházející studii (Hochel et al., 1995) nebyl zaznamenán významný rozdíl při porovnání substrátových roztoků o-fenylendiamin dihydrochloridu (OPD Sigma P-1526) a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinu (TMB Fluka Chemie AG, Švýcarsko). TMB je zvláště vhodný pro provedení ELISA stanovení vně laboratoří, neboť modrá barva reakčního produktu pro vizuální vyhodnocování výsledků kontrastuje s bezbarvými negativními vzorky.

- Substrátový roztok s OPD: 50 mg o-fenylendiamin dihydrochloridu na 100 ml 0,1M citrát-fosfátového pufru pH 5,0 s přidavkem 20 ml 30% H_2O_2 .
- Substrátový roztok s TMB: 1 ml roztoku 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinu o koncentraci 10 mg/ml dimetylsulfoxidu do 100 ml 0,1M citrát-fosfátového pufru pH 6,0 s přidavkem 20 μ l 30% H_2O_2 (Porstman et al., 1981).

Enzymová reakce s uvedenými substrátovými roztoky probíhala při teplotě 37 °C po dobu maximálně 30 min a poté bylo možné reakci zastavit přidavkem 2M H_2SO_4 . Intenzitu zbarvení je vhodné měřit při vlnových délkách 450 nm (TMB) a 492 nm (OPD).

Pro srovnání byl též testován komerčně dostupný substrátový roztok pro peroxidasu (Cambridge Veterinary Sci., Cambridge, UK). Je na trh dodáván jako dvousložková reagentie využívající chromogen TMB. Příprava substrátového roztoku je prostá – před použitím je nutné obě složky pouze důkladně smíchat v poměru 1 : 1.

Amplifikační systém biotin-streptavidin

Byl použit „pre-formed complex“ (Amersham Buchler GmbH & Co KG, SRN; RPN-1051) a metody navržené výrobcem. Po aplikaci detektorové protilátky (tab. II), inkubaci a následném promytí byla do jamek mikrotitrační destičky přidána biotinem značená protilátka v doporučeném ředění 1000x (doba interakce 1 h při 37 °C). Následovalo znovu promytí a napipetování konjugátu streptavidinu s křenovou peroxidasou při stejném faktoru ředění – reakce probíhala po dobu 30 min při stejné teplotě. Nakonec byla destička naposled promyta a aplikován komerční substrát pro peroxidasu s TMB.

Komerční souprava „Salmonella visual immunoassay“ (TECRA Diagnostics)

Souprava je určena pro rychlý a specifický screening potravinových i nepotravinových vzorků. Metoda byla uznána světovou organizací AOAC (Hughes et al., 1987; Jay et al., 1988; Lambini et al., 1990; Corbion et al., 1990; Flowers et al., 1988). Je založena na sendvičovém uspořádání ELISA, které předchází doporučená (Official Methods of Analysis, 1990) příprava vzorků. Po neselektivním i selektivním pomnožení bakterií, přítomných ve vzorku, a po povražení se stanovení provádí imunochemicky.

Vysoce specifická protilátka je výrobcem navázána na povrch mikrotitračních destiček. Pokud se buňka salmonely nachází ve vzorku, je v prvním kroku testu zachycena na povrch destičky prostřednictvím protilátky. „Sendvič“ je kompletován použitím druhé protilátky, rovněž specifické k salmonelám, která je enzymově značená.

Přítomnost salmonel ve vzorku je indikována zeleným zabarvením substrátu; pokud ve vzorku nebyla salmonela zjištěna, substrát nemění barvu a zůstává bezbarvý.

Komerční souprava „Unique Salmonella“ (TECRA Diagnostics)

Souprava umožňuje stanovení salmonel pomocí kombinace imunochemické a kultivační techniky. Vysoce specifické protilátky jsou výrobcem navázány na povrchu polystyrenových vrtulek – dipsticks.

Výrobce doporučuje použít modifikovanou peptonovou vodu (např. Oxoid CM50 nebo Difco 1810-1799) pro ředění, případně extrakci vzorků a zároveň i jako kultivační médium. Před prvním krokem testu je nutné pomnožit případné salmonely ze vzorku, jelikož jejich množství a často i vitalita bývá zpravidla velmi nízká. Kultivace má probíhat při teplotě 35–37 °C přes noc (minimálně 16 h). Takto předkultivovaný vzorek se použije v prvním kroku vlastního testu. Na polystyrenovou vrtulku, na jejíž povrch jsou výrobcem imobilizovány specifické protilátky proti salmonelám, se po ponoření do vzorku zachytí případné salmonely. Po důkladném promytí od nezureagovaných látek jsou imobilizované salmonely následným krokem dále neselektivně kultivovány. Tím se zvýší celková koncentrace, tj. počet buněk/ml, a dojde i ke značnému usnadnění průkazu salmonely ze vzorku pomocí přímé sendvičové ELISA techniky.

Vyhodnocení výsledků

Matematické zpracování a vyhodnocení výsledků popsali Hochel et al. (1995).

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

Kontrola přesnosti a reprodukovatelnosti testu ELISA

Byla zjišťována přesnost stanovení v uspořádání přímého sendvičového stanovení. Byla provedena kontrolní měření, určení průběhu přesnosti stanovení (precision profile – Ekins, 1983) a grafického znázornění variačního koeficientu CV v závislosti na koncentraci analytu (obr. 1). K tomuto účelu byly naměřeny kalibrační křivky o šesti paralelních stanoveních, vypočítán průměr hodnot absorbancí $\bar{x}$ a jejich směrodatná odchylka s . Variační koeficient je definován vztahem:

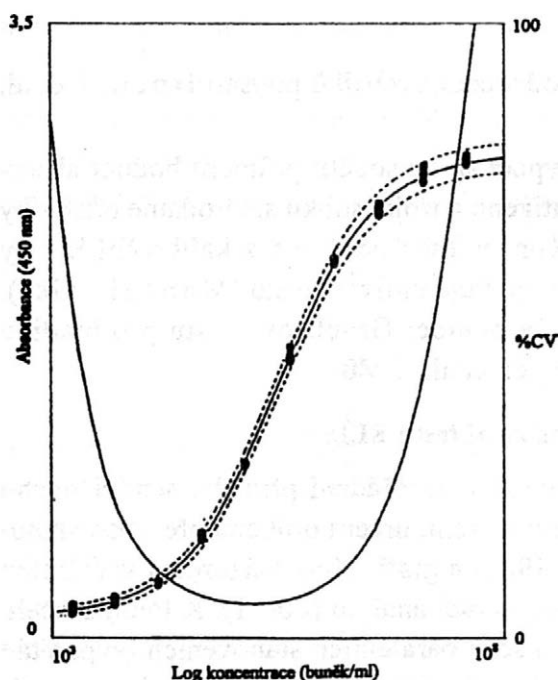
$$CV(\%) = 100 \cdot s / \bar{x}$$

Porovnáním předchozích a aktuálních kalibračních křivek lze tímto testem zjistit tendence stanovení a sledovat parametry přesnosti „uvnitř“ (within-plate, intraassay) a „mezi“ (between-plate, interassay) jednotlivými stanoveními, v našem případě mezi destičkami. Variační koeficient byl vypočítán z hodnot absorbancí pro stejné koncentrace antigenu (5×10^7 buněk/ml) v šesti nezávislých stanoveních přímé sendvičové ELISA metody.

VÝSLEDKY

Optimalizace koncentračních rozsahů reaktantů systému přímé sendvičové ELISA metody

Pro toto uspořádání byla vybrána stejná protilátka vazebná jako detektorová. Detektorová protilátka byla pouze upravena značením křenovou peroxidasou (schéma 1).



1. Kalibrační křivka stanovení salmonel metodou přímé sendvičové techniky ELISA (průběh přesnosti stanovení) – The calibration curve of *Salmonella* detection by direct sandwich ELISA (precision profile of detection)

log koncentrace (buněk/ml) – log concentration (cells/ml)

Byly provedeny především optimalizace koncentrací:

1. **Vazebné protilátky:** Ačkoliv koncentrace vazebné protilátky není kritickým bodem metod ELISA stanovení, byla u všech použitých protilátek optimalizována postupem popsaným dříve (R a u c h et al., 1989) a určena na 1 až 10 μ g bílkoviny/ml. Byla též zkoumána možnost skladování protilátkou potažených mikrotitračních destiček a bylo zjištěno, že destičky lze po důkladném vysušení silikagelem uchovávat za konstantní teploty 2 až 4 °C v exsikátoru po dobu několika měsíců bez významné ztráty aktivity.
2. **Detektorové protilátky:** Optimální koncentrace konjugátů jsou uvedeny v tab. I. Byly stanoveny jako koncentrace, při nichž bylo dosaženo nejnižšího detekčního limitu metody, nejnižší nespecifické vazby na povrch mikrotitrační destičky a zároveň dostatečně vysoké odezvy systému.

Optimalizace koncentrací použitých reagentů systému nepřímé sendvičové ELISA metody

U obou sendvičových technik byl použit identický způsob imobilizace protilátky na polystyrenový povrch mikrotitrační destičky, a tudíž i obdobná

koncentrace. Koncentrační rozsah pro detekční protilátky byl podrobně zkoumán a byl stanoven na 1–2 µg/ml pro testované polyklonální protilátky; u monoklonální IFR-0107 bylo dosaženo optimální koncentrace preparátu při naředění supernatantu hybridomové kultury 20krát. Při použití nevhodné koncentrace byl pozorován efekt, při němž se snižujícím se obsahem antigenu ve vzorku dochází ke zvyšování odezvy systému. V průběhu optimalizace koncentrace konjugátů bylo přihlédnuto k pokynům výrobce a vesměs za nejvhodnější byly určeny shodné koncentrace s uvedeným koncentračním rozmezím. Při vyšších koncentracích byla pozorována vysoká hodnota nespecifické vazby, při nižších koncentracích velmi nízká odezva systému.

Optimalizace systému kompetitivní nepřímé metody ELISA

Pro optimalizace tohoto uspořádání se ukázal rozhodujícím postup a určení koncentračního rozsahu imobilizovaného antigenu. Stanovení optimální koncentrace vázaného antigenu a detektorové protilátky byla provedena tak, že na sérii mikrotitračních destiček bylo navázáno různé množství antigenu (pro každou z destiček konstantní) a použito široké koncentrační rozmezí detektorové protilátky. Postupným zjemňováním ředění protilátky a optimalizací množství navázaného antigenu byly nakonec zjištěny obě hledané koncentrace. Kritériem výběru zde byl především detekční limit, přihlédnuto bylo též k dosaženým maximálním a minimálním odezvám systému.

Použití metody imobilizace prostřednictvím prosté fyzikální absorpce na povrch mikrotitračních destiček se ukázalo v případě vazby mikrobiálních buněk nedostačujícím. Maximální dosažená odezva systému nepřesahovala absorbance $A_{450, 492\text{nm}} = 0,3$. Proto byla tato metoda doplněna prokřížením takto navázaných buněk glutaraldehydem. Nejvhodnější doba působení tohoto bifunkčního činidla s povrchovými strukturami bakterií byla stanovena na 15 minut; zvyšování koncentrace nad 0,125 % (V/V) a prodlužování doby působení nad optimální hodnoty vedlo k poklesu citlivosti metody. Byla také sledována možnost skladování takto připravených a po promytí silikagelem vysušených destiček. Stabilita při obdobných podmínkách skladování (2–4 °C v exsikátoru se silikagelem) byla nižší než u desek s imobilizovanou protilátkou. Aktivita již v průběhu čtyř týdnů poklesla o 30 %.

Koncentrace 1 % BSA v PBS (w/V) byla vybrána jako optimální pro saturaci destiček; zvyšováním koncentrace bílkovin roste viskozita a pěnivost

roztoku. Tím se výrazně zhoršuje manipulace s mikrotitračními destičkami a snižuje se rovněž efektivita promývání. Při vynechání kroku sycení povrchu inertní bílkovinou dochází k výraznému nárůstu nespecifické vazby (o hodnotu $A = 0,2$). Mez detekce tohoto testu po provedených optimalizacích byla stanovena na $1,0 \times 10^6$ buněk/ml.

Porovnání testovaných metod vlastní detekce

U obou substrátových roztoků pro peroxidasu bylo optimalizováno množství peroxidu vodíku. Takto optimalizované roztoky byly následně porovnány s komerčně dostupným substrátovým pufrem. Ve všech sledovaných případech byla citlivost testu téměř shodná, rovněž i hodnoty nespecifické vazby. U komerčního substrátu však při identických podmínkách byla naměřena maximální odezva o jednotku absorbance vyšší než u optimalizovaných substrátů s TMB a o $A = 0,870$ v případě OPD.

Při nepřímém sendvičovém uspořádání byl aplikován amplifikační systém biotin-streptavidin a bylo dosaženo trojnásobného zvýšení citlivosti (tab. II).

Přesnost přímé sendvičové ELISA metody

Chyba mezi stanoveními byla určena na 15 %; chyba uvnitř měření činila pouze 5 %.

Komerční soupravy pro detekci salmonel firmy TECRA Diagnostics

Byly testovány dvě soupravy renomované firmy založené na principu imunochemické detekce salmonel. Obě techniky používají doporučený krok neselektivní předkultivace výchozího vzorku. Tím ale dochází k mnohonásobnému nárůstu počtu buněk/ml. V práci byly posuzovány pouze parametry vlastního stanovení a proto nebyl tento kultivační krok brán na zřetel. Pro vzorky uměle kontaminované známým množstvím buněk salmonel byly zjištěny následující přibližné detekční limity:

- pro test „Salmonella visual immunoassay“ byl stanoven na 10^4 buněk/ml,
- u soupravy „Unique Salmonella“ se pohyboval v rozmezí 10^5 – 10^6 buněk/ml.

DISKUSE

Po vypracování, optimalizaci a porovnání metod sendvičové a kompetitivní enzymové imunoanalýzy buněk salmonel jsme se snažili vybrat

nejvhodnější metodu pro screeningová stanovení těchto bakterií. Byly porovnány metody detekce salmonel pomocí jejich H- a O-antigenů, se zvláštním zaměřením na nejrozšířenější serovary salmonel (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*) a široké spektrum komerčně dostupných či připravených polyklonálních i monoklonálních protilátek, jejichž použitelnost byla ověřena sklíčkovou aglutinací na mikrobiologickém oddělení FN Bulovka.

Metoda přímého sendvičového stanovení ELISA využívající polyklonálních laboratorně připravených protilátek se ukázala být z hlediska citlivosti (detekční limit 4×10^3 buněk/ml) a časové náročnosti nejvhodnější. Křenovou peroxidasou značenou detektorovou protilátkou, která je nezbytná pro tuto analýzu, je však třeba připravit a získáme tím pouze omezené množství tohoto konjugátu. Rovněž kvalita laboratorně značených imunoglobulinů je různá. Použitím nepřímého sendvičového uspořádání se lze sice vyvarovat náročné přípravě imunoglobulinových konjugátů, ale dojde ke zvýšení meze detekce na trojnásobek. Předností nepřímého sendvičového testu pro detekci H-antigenů salmonel, sestaveného z komerčně dostupné vazebné protilátky CSA-1 a detektorové monoklonální protilátky IFR-0107, je dostupnost reagentů v libovolném množství, avšak detekční limit tohoto systému je vyšší ($3,4 \times 10^4$ buněk/ml). Z porovnání citlivostí dvou těchto sendvičových technik vyplývá, že somatické lipopolysacharidové O-antigeny salmonel jsou pro jejich stanovení popsanými technikami vhodnější než flagelární bílkovinné H-antigeny. Kompetitivní nepřímá technika se ukázala jako nejméně citlivá ($1,0 \times 10^6$ buněk/ml), což spolu s vysokou časovou náročností a pracností činí tuto metodu nejméně vhodnou pro screeningová stanovení.

Oba typy testovaných substrátových roztoků vykazují vysokou citlivost. Pro vizuální vyhodnocení je vhodnější použít jako chromogen 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin, zvláště pak komerčně dostupný substrátový roztok (Cambridge Vet. Sci.), jenž dosahuje výrazně vyšší odezvy detegovaných systémů. Amplifikací komerčním systémem biotin-streptavidin bylo dosaženo trojnásobného snížení detekčního limitu, avšak k metodě byl přidán jeden inkubační a promývací krok. Tím by ale vzrostla pracnost a v neposlední řadě též finanční náročnost stanovení.

Vyvinutá uspořádání testu ELISA by měla sloužit jako citlivá metoda vlastního stanovení salmonel. Podobné techniky jsou běžně komerčně využívány ve spojení s metodami imunochemické separace a především s kulturačními technikami (např. testované soupravy TECRA Diagnostics). Tyto

kombinace poskytují vysoce citlivá stanovení, při němž je možné určit přítomnost i velmi nízkých koncentrací salmonel. V porovnání s parametry souprav firmy TECRA Diagnostics byla většina předkládaných uspořádání ELISA shledána jako velmi uspokojivá.

Literatura

- BRINGMON, R. L. – ZAM, S. G., – BITTON, G. – FARRAH, S. R.: Detection of *Salmonella enteritidis* in environmental samples by monoclonal antibody-based ELISA. J. Immunol. Met., 152, 1992:132–142.
- CORBION, B. – FREMY, S. – PIRES-GOMES, C. – PIQUET, C. – REXACH, L. – PIGEON, C.: Detection des Salmonella dans les Aliments par six methods rapides. Published in Management et Technol. Aliment., 1990, č. 4: 44–45.
- ECKSCHLAGER, K. – HORSÁK, I. – KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod.. Technický průvodce 56. Praha, SNTL/Alfa 1980: 50–52.
- EKINS, R. P.: The precision profile:its use in assay design, assessment and quality control. In: HUNTER, W. M. – CORRIE, J. E. T. (Eds.): Immunoassays for Clinical Chemistry. 2nd ed. Edinburg, Churchill Livingstone 1983: 76–104.
- FLOWERS, R. S. – KLATT, M. J. – KEELAN, S. L.: Visual immunoassay for detection of salmonella in foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 1988: 973–980.
- HARBOE, N. – INGILD, A.: Immunization, isolation of immunoglobulins. estimation of antibody titre. Scand. J. Immunol., 2 (Suppl. 1), 1973: 161–164.
- HOCHÉL, I. – MÁLKOVÁ, K. – RAUCH, P.: Stanovení salmonel metodou ELISA. Potrav. Vědy, 13, 1995: 299–312.
- HUGHES, D. – SUTHERLAND, P. S. – KELLY, G. – DAVEY, G. R.: Comparison of the TECRA Salmonella Visual Immunoassay and standard culture methods for the detection of salmonellae in foods. Food Tech. Aust., 39, 1997: 446–447, 450–451, 454.
- JAY, L. S. – COMAR, D.: Comparative study of TECRA Salmonella Visual Immunoassay and Australian Standard cultural methods for analysis of salmonellae in foods. Food Tech. Aust., 40, 1988: 191–196.
- KAUFFMANN, F.: The Bacteriology of Enterobacteriaceae. Baltimore, Williams Wilkins 1966: 55–304.
- KAUFFMANN, F.: Serological Diagnosis of *Salmonella* sp. Copenhagen, Denmark, Kaufman-White Schema Munksgaard 1972.
- LAMBINI, M. – MAVRIDOU, A. – RICHARDSON, S. C. – PAPADAKIS, J. A.: Comparison of the TECRA Salmonella Immunoassay with the conventional culture method. Lett. Appl. Microbiol., 11, 1990: 182–184.

LEE, H. A. – WYATT, G. M. – BRAMHAM, S. – MORGAN, M. R. A.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day salmonella detection. Appl. Env. Microbiol., 56, 1990: 1541–1546.

MÁLKOVÁ, K. – HOCHÉL, I. – FUKAL, L. – RAUCH, P. – DEMNEROVÁ, K. – WYATT, G. M.: Imunomagnetické separace a detekce buněk *S. enteritidis* v potravinách. Potrav. Vědy, 14, 1996: 241–254.

MANČAL, P.: Metody enzymové imunoanalýzy. In: Informační služba SEVAC. 1987.

POPOFF, M. Y. – BOCKEMUHL, J. – McWHORTERMURLIN, A.: Supplement 1992 (No. 36) to the Kauffmann-White Scheme. Res. Microbiol., 144, 1992: 495–498.

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

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

WILSON, N. B. – NAKANE, P. K.: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W. – HOLUBAR, K. – WICK, G. (Eds.): Immunofluorescence and Related Staining Techniques. North Holland, Elsevier 1987: 215–225.

WYATT, G. M. – LANGLEY, M. N. – LEE, H. A. – MORGAN, M. R. A.: Salmonella immunoassay or enrichment-a chicken and egg situation? In: MORGAN, M. R. A. – SMITH, C. J. – WILLIAMS, P. A. (Ed.): Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay Systems. London., Elsevier Appl. Sci. 1992: 267–274.

WYATT, G. M. – LEE, H. A. – MORGAN, M. R. A.: Immunoassays in the food industry – Development of a rapid Salmonella assay. Food Sci. Technol. Today, 4, 1990: 178–180.

WYATT, G. M. – LANGLEY, M. N. – LEE, H. A. – MORGAN, M. R. A.: Further studies on the feasibility of one-day salmonella detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Appl. Env. Microbiol., 59, 1993: 1383–1390.

Official Methods of Analysis: 15th Ed. AOAC, Arlington, V. A. Method 989.14, 1990: 484–486.

Došlo 17. I. 1997

Kontaktní adresa:

Ing. Kateřina Málková, Vysoká škola chemicko-technologická
Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
tel.: + 420 2 2435 3019, 3027 fax: + 420 2 24355102, e-mail: katerina.malkova@vscht.cz

Structure and Functionality of Food Products International Conference
(Mragowo, Poland, May 18-20th, 1998) – FECS No 229

This conference is aimed at food scientists and technologists from universities, research centres and industry. The food areas covered include fruits and vegetables, cereals, milk and dairy products, meat, poultry and fish, emulsions, foams, spreads, dressings and biopolymer gels.

The programme will focus on:

- the relationship between structure and functional properties
- the influence of processing conditions on structure
- the application of physicochemical techniques to structural analysis
- future trends in analysis and measurement (on special emphasis on microscopy and image analysis)

Amongst the plenary presentations will be:

Microstructure and plant food quality – Prof. Dr. Felix Escher, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland

Microstructural changes in plant materials during processing – Prof. Dr. Jozef Fornal, Division of Food Science, IAR&FB, PAS, Olsztyn, Poland

The structure of dairy foods – Prof. Dr. Wolfgang Buchheim, Federal Dairy Research Centre, Institute of Process Engineering, Kiel, Germany

Muscle structure and meat quality – Dr. Richard Taylor, SRV, MRA de Theix, St. Genes Champanelle, France

Observations on fat spreads, emulsifiers and liquid crystals – Dr. Isaac Heertje, Unilever Research Laboratorium, Vlaardingen, The Netherlands

Structure-functional relationships of food gels - theory and practise – Prof. Dr. Anne-Marie Hermansson, SIK – The Swedish Institute for Food Research, Goteborg, Sweden

New imaging techniques and future developments – Dr. Han Blonk, Unilever Research Laboratorium, Vlaardingen, The Netherlands

Fufther details can be obtained from:

The conference office, Division of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima10, PO Box 55, 10-718 Olsztyn, Poland, fax: (48) 89 523 78 249

e-mail: office@food.irzbz.pan.olsztyn.pl

fornal@food.irzbz.pan.olsztyn.pl

<http://www.irzbz.pan.olsztyn.pl/microstructure/>

The Conference is held under the auspices of IAR&FR Polish Academy of Sciences Olsztyn, FECS Division Food Chemistry, IUFOST, Polish Chemical Society, State Committee for Scientific Research, University of Agriculture and Technology, Olsztyn.

SLEDOVÁNÍ CHEMILUMINISCENČNÍ REAKCE U MYŠÍ PO OVLIVNĚNÍ ROSTLINNÝMI LÁTKAMI A VITAMINY*

Study of the Chemiluminescence Reaction in Mice after Influencing with Plant Substances and Vitamins

Helena ŠESTÁKOVÁ, Bohumil TUREK, Petr ŠMERÁK¹, Markéta SEDMÍKOVÁ¹

State Institute of Public Health; ¹3rd Medical School, Charles University, Prague,
Czech Republic

Abstract: By the chemiluminescence method which is used to detect the production of oxygen radicals, particularly the production of the hydrogen peroxide–myeloperoxidase–halide cofactor complex, the effect of substances present in foodstuffs of plant origin on murine granulocytes studied. We have tested the influence of juglone, arbutine, and α -angelicalactone in combination with vitamins A and E. Significantly higher values of chemiluminescence have been found after application of each of the substances tested. After application of juglone to mice we have recorded 2.4 times higher values of chemiluminescence in comparison with the values found in untreated mice. Significant differences have also been found between influenced groups and controls with arbutine (1.5 times higher) as well as with α -angelicalactone (1.8 times higher). In all the experiments these increased values in groups of mice influenced by the substances tested were markedly reduced after application of vitamins A and E, even below the values found in the controls.

chemiluminescence; juglone; arbutine; α -angelicalactone

Abstrakt: Metodou chemiluminiscence, která sleduje produkci kyslíkových radikálů, speciálně produkci komplexu peroxid vodíku–myeloperoxidasa–halidový kofaktor, byl sledován účinek některých látek obsažených v poživatinách rostlinného původu na myší granulocyty. Testovali jsme vliv juglonu, arbutinu α -angelikalaktonu v kombinaci s vitaminy A a E. Zjistili jsme významně zvýšené hodnoty chemiluminiscence po ovlivnění všemi testovanými látkami. Po podání juglonu myším jsme zaznamenali 2,4krát vyšší hodnoty chemiluminiscence ve srovnání s hodnotami naměřenými u neovlivněných myší. Významný rozdíl

* Tato práce byla provedena v rámci projektu GA ČR 311/94/1739.

mezi ovlivněnými skupinami a kontrolou jsme našli také u arbutinu (1,5krát vyšší) a u α -angelikalaktonu (1,8krát vyšší). Ve všech pokusech byly tyto zvýšené hodnoty naměřené u skupin myši ovlivněných testovanými látkami výrazně sníženy po podání vitaminů A a E, dokonce až pod hodnoty chemiluminiscence zjištěné u kontrolní skupiny myši.

chemiluminiscence; juglon; arbutin; α -angelikalakton

Významný vliv na incidenci nádorových onemocnění má vystavení populace karcinogenním látkám. Kromě chemických karcinogenních látek existuje velká skupina přirozených látek vykazujících genotoxické účinky. Jedná se o látky přirozeně se vyskytující v poživatinách zejména rostlinného původu nebo látky tvořící se v rostlinách jako reakce na působení různých stresových faktorů (biologických, fyzikálních a chemických), souhrně označovaných jako fytoalexiny. Výsledný efekt těchto látek může být výrazně modifikován současným přívodem dalších látek, které mohou inhibovat nebo naopak zvyšovat jejich biologickou aktivitu.

Buňky zodpovědné za přirozenou obranu – polymorfonukleární leukocyty (PMNL) – jsou aktivovány různými fagotizačními stimuly, kromě bakterií též alergeny a z karcinogenních látek zejména promotory (Klein et al., 1991). I chemotaktické faktory mají vedle vlivu na pohyblivost schopnost spouštět oxidativní metabolismus PMNL s následnou tvorbou volných kyslíkových radikálů a uvolňováním lyzozomálních enzymů (Dahlgren, 1989; Klebanoff, 1980; Wilkinson, 1983). Jedním z nejúčinnějších mikrobiocidních a cytotoxických systémů PMNL je komplex peroxid vodíku–myeloperoxidasa (EC 1.11.1.7)–halidový kofaktor (Chatelet et al., 1982; Thomas et al., 1988).

Význam testování chemiluminiscence spočívá v možnosti sledovat ovlivnění aktivity produkce volných kyslíkových radikálů jednotlivými látkami v PMNL. Tato schopnost na jedné straně ovlivňuje možnost zvýšení efektu zánětlivých reakcí a fagocytózy ve vztahu k bakteriálním buňkám, ale zároveň zvyšuje i riziko působení volných radikálů při nedostatečné antioxidační ochraně.

Se zvyšováním potenciálního rizika karcinogeneze se zvyšuje význam ochranných procesů v organismu, zejména detoxikačních a antioxidačních, snižujících metabolickou aktivaci karcinogenních látek. Významnou

ochrannou funkci má imunitní systém. Do určité míry souvisí s prooxidačními a antioxidačními procesy v organismu a má rozhodující roli v konečných fázích onkogeneze.

Biologické obranné antioxidační systémy vychytávající volné radikály jsou jednak specifické antioxidační enzymy, jednak antioxidační substráty, které lze rozdělit na membránově lipofilní – karotenoidy (retinol), tokoferol a membránově hydrofilní – kyselina askorbová, glutathion, thioly, ceruloplazmin, kyselina močová a další (Zima et al., 1995).

Při sledování chemiluminiscenční aktivity nás zajímala především možnost ovlivnění endogenní indukce volných kyslíkových radikálů, ale i možnost jejich uplatnění v oxidačních procesech v buněčných membránách a organelách. Rozhraní prooxidačních a antioxidačních procesů je velmi kritické a spekulativní. Záleží na aktuální antioxidační aktivitě a na interakcích s jinými látkami, kdy i antioxidanty mohou za určitých podmínek působit prooxidačně, čímž se jejich biologická aktivita ve svém důsledku výrazně změní. Proto současné působení různých látek endocelulárně i exocelulárně pokládáme za velmi významné a v experimentální části jsme sledovali tyto pochody.

Studované sloučeniny byly vybrány nezávisle na struktuře a výskytu. Hlavním kritériem byl biologický účinek látek přítomných v potravinách, který je podle různých studií rozdílný.

MATERIÁL A METODY

Pokusná zvířata

Myši Balb/c, imbrední samice o hmotnosti 20–22 g.

Příprava testovaných látek

Arbutin – β -D-glukopyranosid hydrochinonu (Sigma) byl rozpuštěn v redestilované vodě. Aplikační dávka pro myš byla 1 g/kg tělesné hmotnosti.

Juglon – 5-hydroxy-1,4-naftochinon (Sigma) byl rozpuštěn v malém objemu acetonu a za stálého míchání při teplotě 35 °C byl přidán příslušný objem olivového oleje. Po odpaření acetonu byla koncentrace juglonu upravena na 80 mg/kg tělesné hmotnosti myši.

α -angelikalakton – 5-metyl-2(3H)-furanon (Fluka) byl rozpuštěn v olivovém oleji. Aplikační dávka pro myš byla 2,1 g/kg tělesné hmotnosti.

Příprava vitaminů

Axerophthol inj. (Biotika) – **Retinoli acetat** 50 500 m.j./ml byl ředěn olivovým olejem. Aplikační dávka pro myš byla 83,3 m.j./kg tělesné hmotnosti.

Erevit inj. (Biotika) – **Tocoferoli acetat** 30 mg/ml byl ředěn olivovým olejem. Aplikační dávka pro myš byla 10 mg/kg tělesné hmotnosti.

Podávání testovaných látek

Testované látky byly podávány jednorázově sondou do trávicího traktu myši. Ve všech pokusech byla příslušná látka podávána v objemovém množství 100 μ l na 10 g tělesné hmotnosti myši. V pokusech, v nichž byl podáván s testovanou látkou olivový olej, bylo aplikováno stejné objemové množství olivového oleje i kontrolní skupině.

Materiál pro chemiluminiscenční test

Dimethylsulfoxid (DMSO); veronalový pufr pH 7,3; lumino – hydrazid kyseliny 3-aminofthalové (Sigma) – zásobní roztok luminolu (3,5 mg luminolu ve 2 ml DMSO) se pro práci ředí redestilovanou vodou (1 : 10); polystyrenové zkumavky 4 cm³; analytický luminometr Lumino M 90a (JZD Obránců míru, Dolní Újezd u Litomyšle).

Provedení chemiluminiscenčního testu

Polymorfonukleární leukocyty byly získány z peritonea pěti myši (pro jedno vyšetření) po čtyřech hodinách po aplikaci 5 ml glykogenu. K výplachu peritonea byl použit veronalový pufr pH 7,3 s 2 j. heparinu na 1 ml. Získaná substance buněk byla promyta veronalovým pufrem bez heparinu (10min odstředění při 300 g). Konečná koncentrace buněk byla upravena na $5,75 \times 10^6$ na 1 ml ve veronalovém pufru bez heparinu. V polystyrenových zkumavkách bylo smícháno 0,6 ml veronalového pufru, 0,1 ml ředěného luminolu, 0,4 ml suspenze buněk získaných z peritonea pěti myši a 0,1 ml 1% zymozanu jako stimulans (v kontrole 0,1 ml veronalového pufru). Chemiluminiscenční aktivita byla měřena při pokojové teplotě v 5min intervalech po dobu 90 min na analytickém luminometru. Výsledky jsou udány v maximálních hodnotách (mV) chemiluminiscenční odpovědi polymorfonukleárních leukocytů v závislosti na čase.

VÝSLEDKY

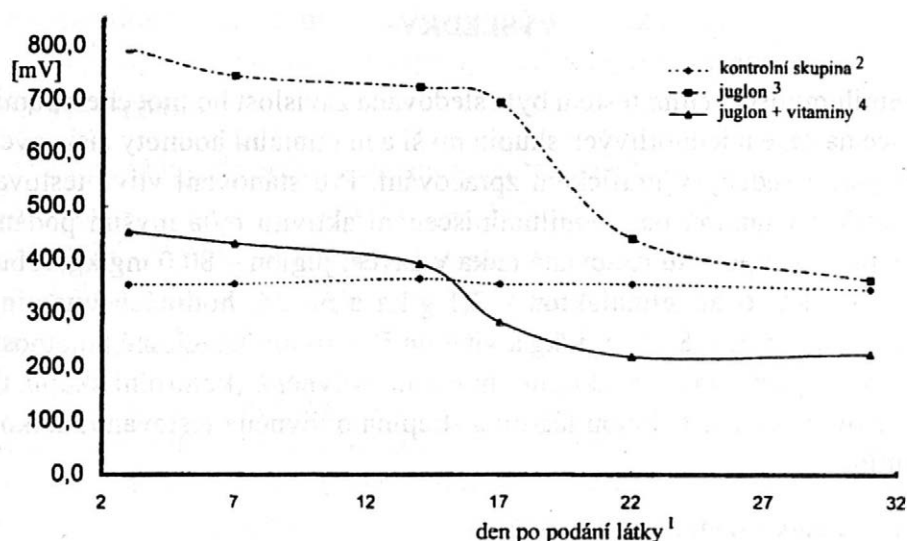
Chemiluminiscenčním testem byla sledována závislost hodnot chemiluminiscence na čase u jednotlivých skupin myši a maximální hodnoty získaných křivek jsou uvedeny v grafickém zpracování. Pro stanovení vlivu testovaných látek a vitaminů na chemiluminiscenční aktivitu byla myším podána vždy v první den pokusu testovaná látka v dávce: juglon – 80,0 mg/kg, arbutin – 1,0 g/kg, α -angelikalakton – 2,1 g/kg a po 24. hodinách vitaminy v dávce: vitamin A – 83,3 m. j./kg a vitamin E – 10 mg/kg tělesné hmotnosti myši. Byly vyšetřovány tři skupiny myši: neovlivněná (kontrolní skupina), skupina ovlivněná testovanou látkou a skupina ovlivněná testovanou látkou a vitaminy.

Sledování účinku juglonu a vitaminů

Po 19 dnů vyšetřování byly zaznamenány výrazně vyšší maximální hodnoty chemiluminiscence ($p < 0,01$) u skupiny myši ovlivněných juglonem ve srovnání s kontrolní skupinou. Nevýznamný rozdíl mezi těmito skupinami byl zjištěn až 31. den po podání juglonu. U skupiny myši ovlivněné juglonem a vitaminy byly zaznamenány hodnoty výrazně nižší ($p < 0,01$) ve srovnání se skupinou ovlivněnou pouze juglonem. Ve srovnání s kontrolou měla skupina ovlivněná juglonem a vitaminy zpočátku 3. a 7. den pokusu statisticky významně vyšší hodnoty chemiluminiscence ($p < 0,01$), které od 14. dne klesaly ($p < 0,05$) a od 17. dne byly hodnoty chemiluminiscence u skupiny ovlivněné juglonem a vitaminy významně nižší ve srovnání s kontrolou ($p < 0,01$) (obr. 1).

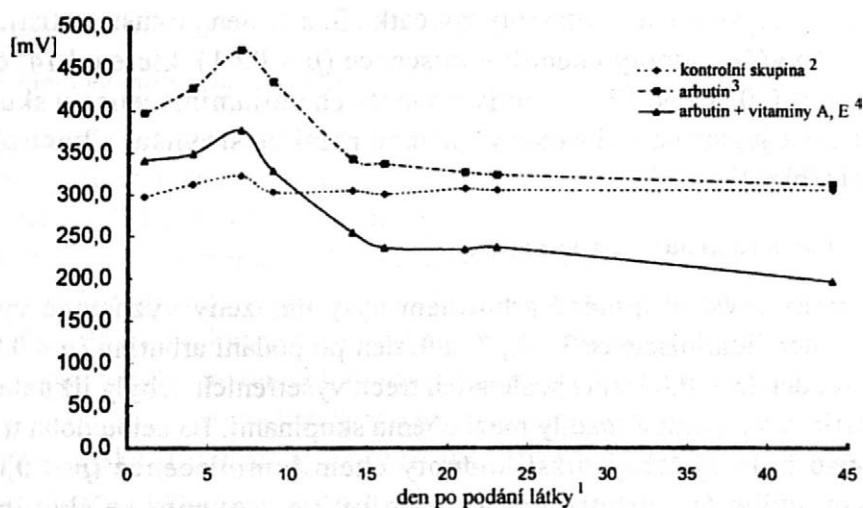
Sledování účinku arbutinu a vitaminů

U skupiny myši ovlivněné arbutinem byly nalezeny významně vyšší hodnoty chemiluminiscence 3., 4., 7. a 9. den po podání arbutinu ($p < 0,01$) a 14. a 16. den ($p < 0,05$). Při posledních třech vyšetřeních nebyly již nalezeny statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami. Po celou dobu trvání pokusu byly zjištěny nižší hodnoty chemiluminiscence ($p < 0,01$) u skupiny ovlivněné arbutinem a vitaminy ve srovnání se skupinou ovlivněnou pouze arbutinem. Ve srovnání s kontrolní skupinou byla u myši ovlivněných arbutinem a vitaminy naměřena významně vyšší maxima chemiluminiscence 3. a 7. den ($p < 0,01$) a 4. den ($p < 0,05$). Devátý den již



¹day after substant application; ²control group; ³juglone; ⁴juglone + vitamins

1. Chemiluminiscenční test juglonu (80 mg/kg) – Chemiluminescence test of juglone (80 mg/kg)
nebyl zaznamenán rozdíl mezi hodnotami obou skupin. Od 16. dne byly naopak zjištěny významně nižší hodnoty chemiluminescence ($p < 0,01$) u myší ovlivněných arbutinem a vitaminy (obr. 2).

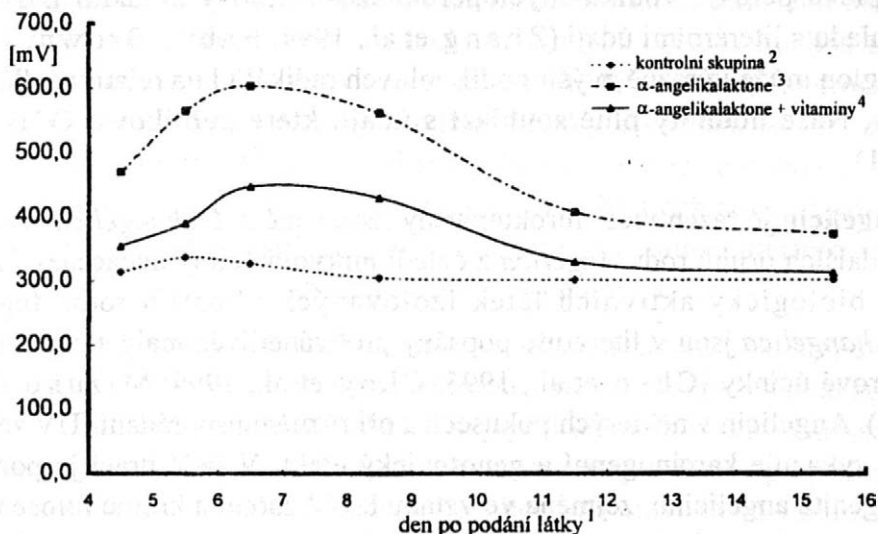


¹day after substant application; ²control group; ³arbutine; ⁴arbutine + vitamin A, E

2. Chemiluminiscenční test arbutinu (1,0 g/kg) – Chemiluminescence test of arbutine (1.0 g/kg)

Sledování účinku α -angelikalaktonu a vitaminů

Skupina myší ovlivněná angelikalaktonem vykazovala po celou dobu trvání pokusu statisticky významně vyšší maximální hodnoty chemiluminiscence ($p < 0,01$) jak ve srovnání s kontrolní skupinou, tak i se skupinou ovlivněnou angelikalaktonem a vitaminy. U skupiny ovlivněné angelikalaktonem a vitaminy byly zjištěny ve srovnání s kontrolou vyšší maxima chemiluminiscence 4., 5. a 11. den ($p < 0,05$), 6. a 8. den ($p < 0,01$) (obr. 3).



¹day after substant application; ²control group; ³ α -angelikalaktone; ⁴ α -angelikalaktone + vitamins

3. Chemiluminiscenční test α -angelikalaktonu (2,1 g/kg) – Chemiluminescence test of α -angelikalaktone (2.1 g/kg)

DISKUSE

Juglon – derivát naftochinonu přítomný v ořešáku královském (*Juglans regia*) je v odborné literatuře zmiňován pro svoji potenciální cytotoxicitu (Babich, Stern, 1993). Jak uvádějí Zhang et al. (1994), vyžaduje cytotoxicita juglonu bioredukci k přeměně na semichinon, který zpětně redukuje kyslík na superoxid. Autoři zjistili, že smrcení bakteriálních buněk juglonem bylo sníženo působením katalasy (EC 1.11.1.6) a zvýšeno v přítomnosti peroxidu vodíku. Toxicita juglonu byla namířena spíše proti buněčné membráně než proti DNA. Babu a Brown (1995) použili ke zkoumání různých

redoxních látek, mezi nimi i juglonu, enzymu dihydroxy-acid-dehydratasy (DHAD) (EC 4.2.1.9), který je zodpovědný za inaktivaci aktivních kyslíkových radikálů. Juglon spolu s dalšími testovanými látkami inhiboval aktivitu DHAD.

V našich pokusech jsme při stanovení chemiluminiscenční aktivity myších granulocytů zaznamenali po ovlivnění juglonem až 2,4krát vyšší hodnoty chemiluminiscence. Výsledky metody sledující zejména produkci komplexu peroxid vodíku–myeloperoxidasa–halidový kofaktor naznačují v souladu s literárními údaji (Zhang et al., 1994; Babu, Brown, 1995), že juglon může výrazně zvýšit podíl volných radikálů i na relativně dlouhou dobu. Naše hodnoty plně souhlasí s údaji, které publikoval O'Brien (1991).

Angelicin je řazen mezi furokumariny izolované z *Archangelica officinalis* a dalších druhů rodu *Angelica* z čeledi mrkvovitých (Daucaceae). U celé řady biologicky aktivních látek izolovaných z rostlin rodu *Angelica* a *Archangelica* jsou v literatuře popsány protizánětlivé, analgetické a protinádorové účinky (Chen et al., 1995; Choy et al., 1994; Mizuno et al., 1994). Angelicin v některých pokusech a při různém uspořádání (UV záření) však vykazuje karcinogenní a genotoxický efekt. V řadě prací je popsána mutagenita angelicinu, zejména ve vztahu k UV záření a kromě fotosenzibilizace vyvolává i kožní nádory (Pierceall et al., 1992). Nijhoff et al. (1995) studovali vliv přírodních antikarcinogenů, mj. také α -angelikalaktonu podávaného v dietě na enzymovou aktivitu glutathion-S-transferasy (GST) (EC 2.5.1.18) a hladinu glutathionu (GSH) v jednotlivých orgánech trávicího traktu krys. Z jejich výsledků vyplývá, že i relativně nízké koncentrace α -angelikalaktonu zvyšovaly enzymovou aktivitu GST a hladinu GSH a mohou mít chemoprotektivní účinek v žaludku, tenkém střevě a játrech krys následkem zvýšené aktivity GST detoxifikačního systému.

Naše výsledky při sledování účinku α -angelikalaktonu na chemiluminiscenci ukázaly zvýšené hodnoty peroxidu vodíku (1,8krát), které však byly méně výrazné ve srovnání s hodnotami naměřenými po ovlivnění juglonem. Navíc již 11. den po podání α -angelikalaktonu tyto hodnoty významně poklesly. Méně výrazné ovlivnění chemiluminiscence α -angelikalaktonem v našich pokusech podporují svými výsledky Nijhoff et al. (1995), kteří našli zvýšenou hladinu GSH a zvýšenou aktivitu GST po podání α -angeli-

kalaktonu krysám. Je známo, že glutathion, považovaný za jednu z redoxních látek v buňce, vychytává také hydroxylové radikály a singletový kyslík. Navíc slouží jako substrát pro antioxidační enzymy.

Hydrochinon je využíván především v chemickém a kosmetickém průmyslu. V přírodě se vyskytuje také jako β -D-glukopyranosid – **arbutin**. Analýzou zdrojů arbutinu bylo zjištěno jeho signifikantní množství v pšeničných produktech, hruškách, kávě a čaji. Volný hydrochinon se vyskytoval v kávě, červeném víně, pšenici a brokolici. Po konzumaci poživatin obsahujících arbutin a hydrochinon byla prokázána u lidí zvýšená hladina těchto látek v moči a plazmě (Deisinger et al., 1996). Arbutin, resp. hydrochinon vykazuje myelotoxické a imunotoxické účinky u exponovaných zvířat. Uspořádání experimentů bylo odlišné od běžné expozice člověka (EHC, 1994). Lewis et al. (1988) popsali inhibiční vliv hydrochinonu na produkci peroxidu vodíku a na vyvolání cytolyzy nádorových buněk interferonem při různých experimentálních koncentracích hydrochinonu.

V našich pokusech jsme zaznamenali, v souladu s nálezem, který publikovali Lewis et al. (1988), že chemiluminiscenční aktivitu ovlivňoval arbutin ze všech testovaných látek nejméně. Nejvyšší hodnota chemiluminiscence byla naměřena 7. den po podání arbutinu s vitaminy a 5. den po podání samotného arbutinu. V obou případech byla hodnota maximálně 1,5krát vyšší než u kontrolní skupiny.

Zjistili jsme, že všechny testované látky – juglon, arbutin a α -angelikalakton signifikantně zvyšovaly hodnoty chemiluminiscence, která odráží stupeň aktivity komplexu peroxid vodíku–myeloperoxidasa–halidový kofaktor. Peroxid vodíku spolu s dalšími reaktivními formami kyslíku (superoxidový radikál, hydroxylový radikál, singletový kyslík) patří k vysoce agresivním chemickým látkám vznikajícím během zánětu nebo při detoxikaci xenobiotik v endoplazmatickém retikulu. V organismu mohou poškozovat přímo DNA, RNA, aminokyseliny nebo tkáň peroxidací nenasycených mastných kyselin v buněčných membránách. Ovlivnění metabolismu arachidonové kyseliny zasahuje např. do tvorby prostaglandinů, které zpětně ovlivňují fagocytózu a produkci leukotrienů, z nichž LB_4 hraje důležitou roli v zánětu, působí jako chemotaktický faktor pro neutrofilie (Klein, 1990). V procesu peroxidace lipidů vznikají také další toxické produkty (alkany, alkanaly, alkenaly), zejména 4-hydroxy-2,3-trans nonenal (4-HNE) a malondialdehyd, který způso-

buje zesíťňování a polymeraci proteinů a tím přispívá k vyšší propustnosti membrán (Vladimirov, 1986; Zima et al., 1995). Chronická expozice organismu kyslíkovým radikálům hraje zásadní roli ve vývoji aterosklerózy [oxidovaná forma LDL zahajuje proces v cévní stěně (Jurgens et al., 1993)], ve vývoji karcinogeneze, zánětu, ischemických chorob a dalších poškozeních organismu. Oxidativní poškození způsobené zvýšeným podílem reaktivních kyslíkových radikálů je označováno jako „oxidativní stres“ a odráží posun v prooxidativní a antioxidativní rovnováze volných radikálů (Sies, 1986).

Karotenoidy i retinol (vitamin A), které jsou přítomné v potravinách, mají antioxidační a imunomodulační efekt. Zvyšují lymfocytární blastogenezi, cytotoxickou aktivitu lymfocytů a stimulují produkci různých cytokinů. Dále stimulují fagocytózu a schopnost neutrofilů a peritoneálních makrofágů smrtit bakterie (Chew, 1993). Imunomodulační účinek karotenoidů může potencovat imunitní ochranu proti vzniku nádorů. Ukazuje se, že β -karoten je aktivní zejména v promoční fázi karcinogeneze. Může být v cílové tkáni metabolizován přímo na kyselinu retinolovou (Gerster, 1993; Poppel, 1993). Karotenoidy chrání organismus proti fotosenzibilizaci „zhášením“ singletového kyslíku. β -karoten reaguje s hydroperoxidovými radikály a tvoří epoxidy a apokarotenoidní a další produkty (Canfield et al., 1992; Di Mascio et al., 1991). Fumarulo et al. (1991) zkoumali vliv retinoidů na produkci volných radikálů. Retinoidy inhibovaly produkci superoxidu a chemiluminiscenci. Schwartz et al. (1993) označují β -karoten za antioxidant, ale i za chemoprotektivní prooxidant. Ve své práci sledovali odlišný způsob kontroly nádorového růstu tímto prooxidantem ve srovnání s antioxidantem α -tokoferolem. Výsledkem byl v konečné fázi stejný efekt α -tokoferolu i β -karotenu.

Tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E) reagují s hydroxylovými a hydroxyperoxidovými radikály (Zima et al. 1995; Di Mascio et al., 1991; Schwartz et al., 1993). Jako antioxidant ovlivňuje vitamin E proces stárnutí, vznik nádorů kardiovaskulárních nemocí a sníženou obrannou schopnost. Funkce buněčné i nebuněčné imunity zvyšuje vitamin E *in vivo* i *in vitro* (Ames et al., 1993; Ginter, 1992).

Naše výsledky ukazují, že lipofilní antioxidanty retinol a α -tokoferol významně snížily všechny zvýšené hodnoty chemiluminiscence vyvolané

juglonem, angelikalaktonem a arbutinem, po působení juglonu a arbutinu přibližně po 14. dnech vyšetřování, až pod normu stanovenou kontrolou. Jak vyplývá z literárních údajů, lipofilní vitaminy inhibují chemiluminiscenci (Fumarulo et al., 1991) ať již svou schopností vychytávat volné radikály (Rousseau et al., 1992; Di Mascio et al., 1991; Schwartz et al., 1993), nebo zvýšením rezistence membránových lipidů k peroxidaci po zabudování lipofilních vitaminů do buněčných membrán (Ciaccio et al., 1993; Schwartz et al., 1993).

Závěr

Metodou chemiluminiscence, která sleduje produkci kyslíkových radikálů, speciálně produkci komplexu peroxid vodíku–myeloperoxidasa–halidový kofaktor byl sledován účinek látek obsažených v poživatinách rostlinného původu u myší.

Významně zvýšené hodnoty chemiluminiscence jsme zjistili u všech testovaných látek. Po podání juglonu myším jsme zaznamenali 2,4krát vyšší hodnoty chemiluminiscence ve srovnání s hodnotami naměřenými u neovlivněných myší. Takto vysoký rozdíl chemiluminiscenčních hodnot mezi ovlivněnou skupinou a kontrolou jsme nenalezli u arbutinu (1,5krát vyšší) ani u α -angelikalaktonu (1,8krát vyšší). Ve všech pokusech byly tyto zvýšené hodnoty naměřené u skupin myší ovlivněných testovanými látkami výrazně sníženy po podání vitaminů A a E, dokonce až pod hodnoty chemiluminiscence zjištěné u kontrolní skupiny myší.

Juglon, kterému je v literatuře připisován cytotoxický účinek, zvyšoval nejvíce ze všech testovaných látek hodnoty chemiluminiscence. Vitaminy jeho účinek výrazně supresovaly.

Angelicin s popsáním antikarcinogenním a chemoprotektivním účinkem také zvyšoval hodnoty chemiluminiscence, ale v menší míře než juglon. Také vitaminy neovlivňovaly jeho účinek tak výrazně jako účinek juglonu. Některé další látky obsažené v extraktech rostlin rodu *Angelica* a *Archangelica* mají imunomodulační efekt. Protože významnější působení angelikalaktonu na přirozenou imunitu trvalo v našich pokusech kratší dobu než u dalších testovaných látek, lze uvažovat o imunomodulačním nebo snad „samoregulačním“ účinku také u angelikalaktonu.

Arbutin nejméně ze všech testovaných látek zvýšil chemiluminiscenční reakci.

Získaných výsledků je možné využít v nutričně protektivních opatřeních při ochranné výživě i při suplementaci stravy.

Literatura

AMES, B. N. – SHIGENAGA, M. K. – HAGEN, T. M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 1993: 7915–7922.

BABICH, H. – STERN, A.: *In vitro* cytotoxicities of 1,4-naphthoquinone and hydroxylated 1,4-naphthoquinones to replicating cells. *J. Appl. Toxicol.*, 13, 1993: 353–358.

BABU, B. N. – BROWN, O. R.: Quantitative effects of redox-cycling chemicals on the oxidant-sensitive enzyme dihydroxy-acid dehydratase. *Microbios.*, 82, 1995, č. 332: 157–170.

CANFIELD, L. M. – FORAGE, J. W. – VALENZUELA, J. G.: Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 1992: 260–265.

CHATELET, L. R., de – LONG, G. D. – SHIRLEY, P. S. – BASS, D. A. – THOMAS, M. L. – HENDERSON, T. W. – COHEN, M. S.: Mechanism of the luminol-dependent chemiluminiscence of human neutrophils. *J. Immunol.*, 129, 1982: 1589–1593.

CIACIO, M. – VALENZA, M. – TESORIERE, L. – BONGIORNO, A. – ALBIERO, B. – LIVRA, M. A.: Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 302, 1993: 103–108.

DAHLGREN, C.: Is lysosomal fusion required for the granulocyte chemiluminiscence reaction? *Free Rad. Biol. Med.*, 6, 1989: 399–403.

DEISINGER, P. J. – HILL, T. S. – ENGLISH, J. C.: Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 47, 1996: 31–46.

DI MASCIO, P. – MURPHY, M. E. – SIES, H.: Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1991: 194–200.

FUMARULO, R. – CONESE, M. – RICCARDI, S. – GIORDANO, D. – MONTE-MURRO, P. – COLUCCI, M. – SEMERARO, N.: Retinoids inhibit the respiratory burst and degranulation of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Agents Actions.*, 34, 1991: 339–334.

GERSTER, H.: Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 63, 1993: 93–121.

- GINTER, E.: Nová koncepcia aterogenezy: úloha kyslíkových radikálov. Vnitř. Lék., 38, 1992: 1096–1104.
- CHEN, Y. F. – TSAI, H. Y. – WU, T. S.: Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Med.*, 61, 1995: 2–8.
- CHEW, B. P.: Role of carotenoids in the immune response. *J. Dairy. Sci.*, 76, 1993: 2804–2811.
- CHOY et al. 1994 - citováno na str. 8.
- JURGENSEN, G. – CHEN, Q. – LEDINSKI, G. – KAGER, G. – HAMMER, A., ESTERBAUER, H.: Oxidierte Lipoproteine und Atherogenese. *Acta Med. Austriaca*, 20, 1993: 85–89.
- KLEBANOFF, S. J.: Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Inter. Med.*, 39, 1980: 480–489.
- KLEIN, J.: Mediators and messenger. In: *Immunology*. Oxford, Blackwell Sci. Publ., 1990: 247–256.
- KLEIN, C. B. – FRENKEL, K. – COSTA, M.: The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 1991: 592–604.
- LEWIS, J. G. – ODOM, B. – ADAMS, D. O.: Toxic effect of benzene and benzene metabolites of mononuclear phagocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92, 1988: 246–254.
- MIZUNO, A. – TAKATA, M. – OKADA, Y. – OKUYAMA, T. – NISHINO, H. – NISHINO, A. – TAKAYASU, J. – IWASHIMA, A.: Structures of new coumarins and antitumor-promoting activity of coumarins from *Angelica edulis*. *Planta Med.*, 60, 1994: 333–336.
- NIJHOFF, W. A. – BOSBOOM, M. A. – SMIDT, M. H. – PETERS, W. H.: Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelicalactone and flavone. *Carcinogenesis*, 16, 1995: 607–612.
- O'BRIEN, P. J.: Molecular mechanism of chinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interaktions*, 80, 1991: 1–41.
- PIERCEALL, W. E. – KRIPKE, M. L. – ANANTHASWAMY, H. N.: N-ras mutation in ultraviolet radiation – induced murine skin cancer. *Cancer Res.*, 52, 1992: 3946–3951.
- POPPEL, G., van: Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies. *Eur. J. Cancer*, 29A, 1993: 1335–1344.
- REINHOLD, U.: Specific application of single nutrients as a basic treatment in immunostimulating therapy. *Med. hypotheses*, 22, 1987: 159–169.
- ROUSSEAU, E. J. – DAVISON, A. J. – DUNN, B.: Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free. Radic. Biol. Med.*, 13, 1992: 407–433.

SCHWARTZ, J. L. – ANTONIADES, D. Z. – ZHAO, S.: Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of prooxidants and antioxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 686, 1993: 262–279.

SIES, H.: Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 25, 1986: 1058–1071.

THOMAS, E. L. – LEHRER, R. I. – REST, R. F.: Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev. Infect. Dis.*, 10, 1988, (suppl.2): 450–456.

VLADIMIROV, Y. A.: Free radical lipid peroxidation in biomembranes: mechanism, regulation and biological consequences. In: *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. Alan R. Liss Inc., 1986, 141–195.

WILKINSON, P. C. (Ed.): *Chemotaxis and Inflammation*. New York, Churchill Livingstone 1983.

ZHANG, R. – HIRSCH, O. – MOHSEN, M. – SAMUNI, A.: Effects of nitroxide stable radicals on juglone cytotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 312, 1994: 385–391.

ZIMA, T. – ŠTÍPEK, S. – TESAŘ, V. – NĚMEČEK, K. – MĚCHUROVÁ, A.: Volné radikály v patogenezi vybraných onemocnění. *Čas. Lék. čes.*, 134, 1995: 291–295.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA. 157. Hydroquinone. Geneva, WHO 1994, 178 s.

Došlo 27. 5. 1997

Kontaktní adresa:

Mgr. Helena Šestáková, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48
100 42 Praha 10, Česká republika
tel.: + 420 2 6708 2317, fax: + 420 2 673 102 91

**TEPLOTNÍ HISTORIE ZELENINOVÝCH A LAHŮDKOVÝCH SALÁTŮ
V DISTRIBUČNÍM ŘETĚZCI A ODHAD POTENCIÁLNÍHO RŮSTU
MIKROORGANISMŮ***

**Thermal History of Vegetable Salads in a Distribution Chain
and Assessment of Potential Growth of Microorganisms**

Milan HOUŠKA, Rudolf GRÉE, Karel KÝHOS, Aleš LANDFELD¹, Kamila MÍKOVÁ²

Food Research Institute Prague;¹ Faculty of Mechanical Engineering, CTU;

*² Institute of Chemical Technology – Department of Food Chemistry
and Analysis, Prague, Czech Republic*

Abstract: Thermal history of foods during chain between producer and consumer can be the key factor which influence their quality and safety. The possible growth of microorganisms can be influenced also by water activity and pH of the specific food. The main goal of this work was the determination of the real time temperature history of the packaged vegetable salads during transport and distribution. The registered temperature history is then used for prediction of possible growth of microorganisms using predictive database Food Micro Model (FMM). This software enables the prediction of the growth of selected pathogenic and spoilage microorganisms. The application of FMM on real time-temperature history showed the potential of the method. This work showed the possibilities of risk assessment of potential growth of selected microorganisms during real time-temperature history. It was shown that for low acid salads there is the risk of growth of *Salmonella* and other pathogens. Therefore the chemical preservatives are recommended to be used for marketed product. The prediction of growth of yeast showed the possible spoilage time if the product is exposed to elevated temperatures.

distribution chain; vegetable salad; time temperature history; predictive microbiology; risk assessment; Food Micro Model

Abstrakt: Byla sledována teplotní historie baleného zeleninového salátu při jeho distribuci. Na základě hodnot aktivity vody a pH byl použit prostředek prediktivní mikrobiologie Food Micro Model, jehož program dovoluje predikci

* Tato práce byla vykonána s podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum MZe ČR, projekt č. EP 096000-6260.

růstu vybraných patogenních mikroorganismů. Byla sejmuta teplotní historie jednoho výrobku a na základě proměřených hodnot aplikována i na další druhy lahůdkových salátů. U všech vzorků byla testována možnost potencionálního růstu vybraných mikroorganismů bez ohledu na přítomnost použitých konzervačních činidel. Současně bylo konfrontováno dodržení záruční doby deklarované výrobcem v souvislosti s reálnou teplotní historií a provedenou predikcí růstu vybraných mikroorganismů

distribuce; zeleninový salát; teplotní historie; predikce; mikroorganismus; Food Micro Model

Při novém přístupu k řízení jakosti a zdravotní nezávadnosti potravin se přechází od hodnocení finálních výrobků k činnosti dozorové, v níž jsou problémy odstraňovány prevencí již v zárodku při jejich vzniku. Jsou tak analyzována možná specifická nebezpečí, což skýtá možnost jejich zvládnutí tak, aby byla zabezpečena dokonalá zdravotní nezávadnost a jakost výrobků.

Existuje několik principů a zásad pro analýzu nebezpečí a určení ochranných a řídicích míst (bodů) v průběhu celého potravního řetězce od primární produkce k finálnímu konzumentu. Základem je princip identifikace potenciálních nebezpečí spojených s produkcí potravin od prvovýroby přes zpracování a distribuci až ke spotřebiteli, např. Matyáš (1993), resp. Matyáš et al (1996).

Lze předpokládat, že u většiny výrobců je nebezpečí vzniku závad plně pod kontrolou i když u nich nebyl dosud zaveden jednotný systém HACCP tak jak je vyžadován v novém zákoně o potravinách. Je to dáno tradicemi a úrovní hygieny a sanitace v našich potravinářských závodech i úrovní vzdělání pracovníků.

Potraviny jsou po opuštění expedičních skladů závodů vystaveny situacím, stavům a podmínkám, které jim mohou významným způsobem uškodit. Jsou to především teplotní poměry, jímž je daná potravina vystavena, které zásadním způsobem ovlivňují údržnost či zdravotní nezávadnost.

Každá potravina svým složením, původem, zpracováním a recepturou předurčuje část hlavních podmínek ovlivňujících růst mikroorganismů jako je aktivita vody a pH. Tyto podmínky jsou tím více méně dány. Proto je v úseku distribuce hlavním vnějším parametrem teplota – čas neboli teplotní historie, která limituje možný růst mikroorganismů (pomineme-li chemickou kon-

potravin z hlediska údržnosti například degradací některých složek, oxidací tuků, úbytkem vitamínů apod. Nevhodná teplotní historie je však mnohem nebezpečnější, neboť může dojít k nežádoucímu pomnožení mikroorganismů. Popis různých typů infekcí a otrav z jídla včetně statistických přehledů uvádí nedávno publikovaná práce (Š r á m o v á, B e n e š, 1994).

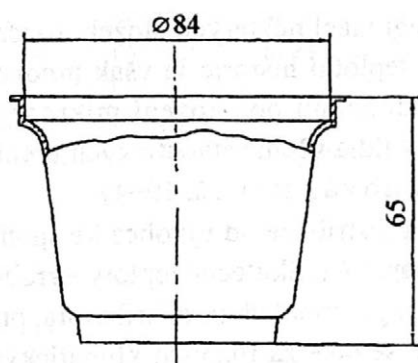
Průběh teplotní historie výrobků v úseku distribuce od výrobce ke spotřebiteli je v převážné míře anonymní a nezmapován. Skutečné teploty výrobků jsou velmi proměnlivé a často neodpovídají předpokladům distributora, prodejce i spotřebitele. Např. rozvoz výrobků se děje za různých klimatických podmínek. Teplotní historie je ovlivněna i každou manipulací s výrobkem nebo prostředím (překládání, otvírání dveří chlazeného prostoru). Klasickým případem je domácí chladnička, o níž se většina uživatelů domnívá, že zajišťuje vhodné podmínky pro skladování potravin. Není tomu tak vždy. Naše orientační měření prokázala, že v běžné nezaplňené chladničce se mění teplota od 4 do 12 °C, přičemž horní hranice teplot stoupá s četností otevření chladničky i do teplot nad 12 °C.

Ke zhodnocení, do jaké míry může nastat pomnožení nežádoucích mikroorganismů, je třeba znát skutečnou teplotní historii dané potravin, její aktivitu vody a pH. Pak lze využít moderního prostředku prediktivní mikrobiologie Food Micro Model – FMM (Leatherhead, MAFF, UK). Tento program umožňuje predikci růstu vybraných patogenních a kažení potravin působících mikroorganismů za podmínek dané teploty, aktivity vody a pH (případně dalších specifických parametrů) (M c C l u r e et al., 1994).

Všechny potraviny nejsou stejně rizikové. Statistická šetření a praxe hygienické služby ukazují na nejvíce rizikové skupiny potravin, kterými jsou produkty hromadného stravování (hamburgery v pouličních stáncích, majonézové saláty, cukrárenské výrobky vyrobené z tepelně neošetřených vaječných výrobků). Teplotními poměry při smažení hamburgerů se zabývali nedávno H o u š o v á a H o k e (1997). Tuto práci jsme proto zaměřili na zeleninové saláty.

MATERIÁL A METODY

Pro měření byly vybrány produkty firmy Boneco a.s. – typický zeleninový salát (Podzimní) v kelímku (obr. 1). Jednotlivé kelímky byly umístěny ve standardní lepenkové přepravce s 12 kruhovými otvory (obr. 2). Naplněná přepravka tvoří základní přepravní jednotku. Sousední místa byla vyplněna

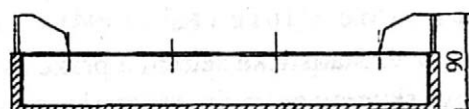


1. Schematický obrázek kelímku – A cup diagram

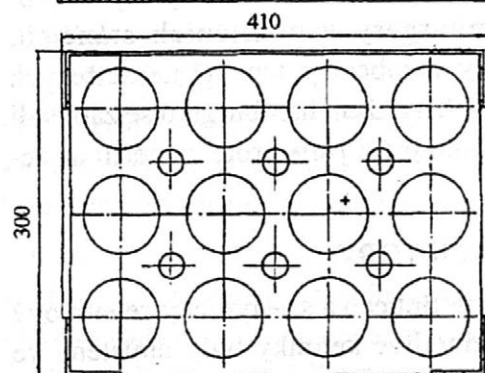
kelímky s produktem, pouze jedno sousední místo bylo osazeno válečkem z pěnového polystyrenu, který fixoval polohu teplotního čidla vzhledem ke kelímku. Čidlo teploty bylo vpíchnuto z boku do středu kelímku kolmo na osu souměrnosti. Druhé čidlo měřilo teplotu okolí kelímku a bylo volně uloženo v meziprostoru lepenkové přepravy. K vlastnímu snímání byla použita paměťová teplotní čidla TINYTALK Pt100 (Gemini

Orion Group, Ltd., UK), která byla naprogramována na 30 dnů provozu. Čidla byla kalibrována (odchylka max. 0,2 °C) a doba náběhu na hodnotu teploty byla stanovena v kapalině 60 sekund a na vzduchu 15 minut. Na základě dohody s firmou Boneco, byla paleta s paměťovými čidly teploty zařazena do dodávky pro prodejce v Hradci Králové.

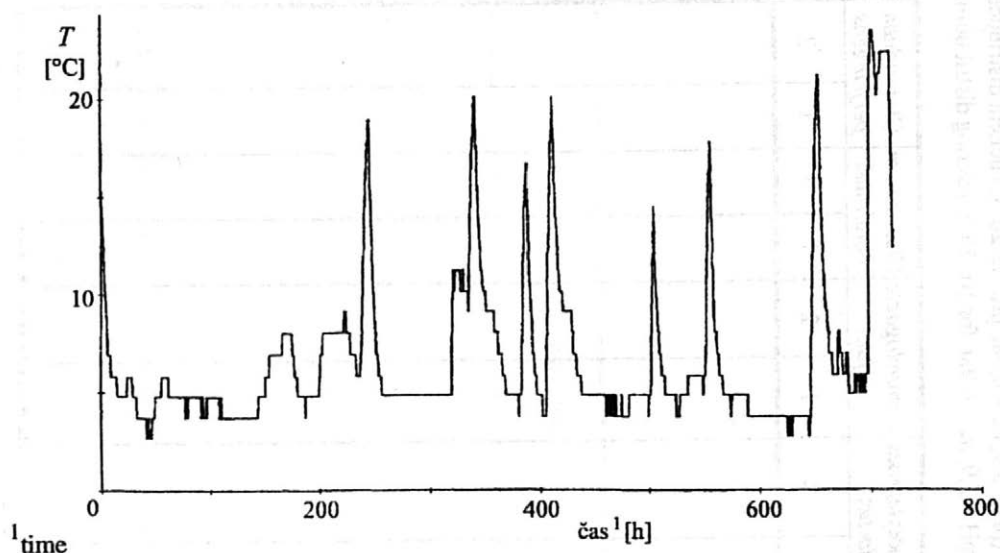
Pokus probíhal přímo v provozu, tj. teplotní čidla byla umístěna do produktu na výstupu z výrobní linky a absolvovala dopravu k prodejci (Hradec Králové), kde byl produkt nejprve umístěn do chlazeného meziskladu a poté přemístěn do prosklené chladicí vitriny prodejního stánku. Zde byl produkt střídavě nabízen v rámci skupinového balení při pultovém prodeji na pro-



2. Rozměry distribuční palety skupinového balení – The size of distribution pallet for group packaging



+ poloha měřeného kelímku¹



3. Skutečný průběh teploty v podzimním salátu – The real time temperature history in autumnal salad

dejně a poté opět skladován v chlazené vitrině. Pokus byl ukončen po 680 hodinách a následně byl zpracován teplotní záznam.

Vzhledem k tomu, že záznam teplotní historie lze přiřadit i k dalším stejně baleným druhům zeleninových a lahůdkových salátů a provést aplikaci FMM, byly dále k hodnocení vybrány saláty drůbeží a vlašský.

U vybraných druhů salátů byly stanoveny hodnoty aktivity vody (přístroj Novasina, Švýcarsko, laboratoř OHES Kladno) jako funkce teploty. Dále byly stanoveny hodnoty pH (po homogenizaci vzorku).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Skutečný průběh teploty v podzimním salátu (ve středu vzorku) pro modelový pokus je uveden na obr. 3. K použití teplotního průběhu pro predikci programem FMM bylo nutné jej zjednodušit do tvaru schodovitých funkcí. Program totiž umožňuje predikci růstu mikroorganismů pouze pro konstantní teplotní intervaly. Při náhradě skutečných průběhů se vycházelo z odhadů velikosti ploch nad jednotlivými časovými úseky. Náhradní schod má přibližně tutéž plochu. Schodovitá funkce byla tabelována jako délky časových

I. Predikce FMM potenciálního růstu mikroorganismů v log cfu/g ve vlašském salátu (pH = 3,9, a_w = 0,986 pro 10–20 °C) během distribuce
 – FMM prediction of possible microorganism growth in log cfu/g in autumnal salad (pH = 3,9, a_w = 0,986 for 10–20 °C) during distribution

Čas ¹ [h]		T [°C]	<i>Salmonella</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i> (lactic)		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Clostridium perfringens</i>	
Cel- kem ²	inter- val ³		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5	5	10,6	1	1,9			1	4,7										
10	5	7,2	1	2,7			1	6,8										
240	230	5,2	1	2,7			1	6,8										
243	3	13,7	1	13,5			1	12,4										
246	3	17,1	1	18,2			1	23										
250	4	13,7	1	21,4			1	30,5										
320	70	4,6	1	21,4			1	30,5										
337	17	10,0	1	26,9			1	45,4										
343	6	18,0	1	38,1			1,1	70										
365	22	6,4	1	42			1,1	80,2										
385	20	6,4	1	42			1,1	80,2										
390	5	15,6	1	47,9			1,1	93,8										
405	15	6,4	1	47,9			1,1	93,8										
410	5	12,9	1	51,2			1,1	>100										
413	3	18,7	1	57,5			1,6											
420	7	12,9	1	62,1			2											
505	85	5,3	1	62,1			2											

Čas ¹ [h]		T [°C]	Salmonella		Saccharomyces cerevisiae		Salmonella		Staphylococcus aureus		L. monocytogenes (lactic)		Campylogacte jejuni		Clostridium botulinum		Clostridium perfringens	
Cel- kem ²	inter- val ³		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
510	5	14,4	1	66,7			2,4											
550	40	5,3	1	66,7			2,4											
553	3	8,0	1	67,2			2,7											
557	4	17,7	1	74,3			3,1											
560	3	8,0	1	74,8			3,4											
650	90	4,7	1	74,8			3,4											
655	5	19,5	1	86,8			3,9											
680	25	9,2	1	93,3			4,2											
Poznámka ⁴			$a_w = 0,973$		$t = 21 \text{ h}$ $T 17 \text{ °C}$ $\log \text{ cfu/g} = 3$				pH mimo rozsah ⁵									

1 = log cfu/g; 2 = % lt

¹time; ²total; ³interval; ⁴notice; ⁵beyond the range

II. Predikce FMM potenciálního růstu mikroorganismů v log cfu/g ve vlašském salátu (pH = 4,5, a_w = 0,977 pro 10–20 °C) během distribuce
 – FMM prediction of possible microorganism growth in log cfu/g in autumnal salad (pH = 4,5, a_w = 0,977 for 10–20 °C) during distribution

Čas ¹ [h]		T [°C]	<i>Salmonella</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i> (lactic)		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
Cel-kem ²	inter-val ³		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5	5	10,6	1	3,4			1	1,5	1	0,8	1	1,3	0,6				1	0
10	5	7,5	1	4,9			1	1,5	1	1,3	1	1,9	0,3				1	0
240	230	5,2	1	4,9			1	1,5	1	1,3	1	98,5	0				1	0
243	3	13,7	1	9,1			1	3,3	1	2,9	1	99,8					1	0
246	3	17,1	1	17,3			1	7	1	7,6	1	>100					1	0,3
250	4	13,7	1	22,8			1	9,4	1	9,8	1,6						1	0,3
320	70	4,6	1	22,8			1	9,4	1	9,8	1,6						1	0,3
337	17	10,0	1	32,7			1	13,8	1	12	2,2						1	0,3
343	6	18,0	1	51,7			1	22,5	1	24	2,8						1	1,1
365	22	6,4	1	58,8			1	22,5	1	24	3,3						1	1,1
385	20	6,4	1	58,8			1	22,5	1	24	3,8						1	1,1
390	5	15,6	1	69,1			1	27	1	29,1	4,3						1	1,1
405	15	6,4	1	69,1			1	27	1	29,1	4,7						1	1,1
410	5	12,9	1	74,9			1	29,5	1	31,2	5,1						1	1,1
413	3	18,7	1	85,6			1	34,5	1	38,3	5,5						1	1,6
420	7	12,9	1	93,8			1	38,1	1	41,2	5,8						1	1,6

Čas ¹ [h]		T [°C]	Salmonella		Saccharomyces cerevisiae		Escherichia coli O157:H7		Staphylococcus aureus		L. monocyte- genes (lactic)		Campylobacter jejuni		Clostridium botulinum		Bacilus subtilis	
Cel- kem ²	inter- val ³		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
505	85	5,3	1	93,8			1	38,1	1	41,2	5,8					1	1,6	
510	5	14,4	1	>100			1	41,6	1	44,7	6,1					1	1,6	
550	40	5,3	1				1	41,6	1	44,7	6,1					1	1,6	
553	3	8,0	1,4				1	41,6	1	44,7	6,3					1	1,6	
557	4	17,7	2				1	47,1	1	52,1	6,6					1	2,1	
560	3	8,0	2,4				1	47,1	1	52,1	6,8					1	2,1	
650	90	4,7	2,4				1	47,1	1	52,1	6,8					1	2,1	
655	5	19,5	3				1	56,6	1	66,5	7,2					1	3,1	
680	25	9,2	3,4				1	56,6	1	66,5	7,6					1	3,1	
Poznámka ⁴					t = 21 h T > 17 °C log cfu/g = 2,8								model na přežití ⁵		pH mimo rozsah ⁶			

1 = log cfu/g; 2 = % lt

¹time; ²total; ³interval; ⁴notice; ⁵ model for survival; ⁶beyond the range

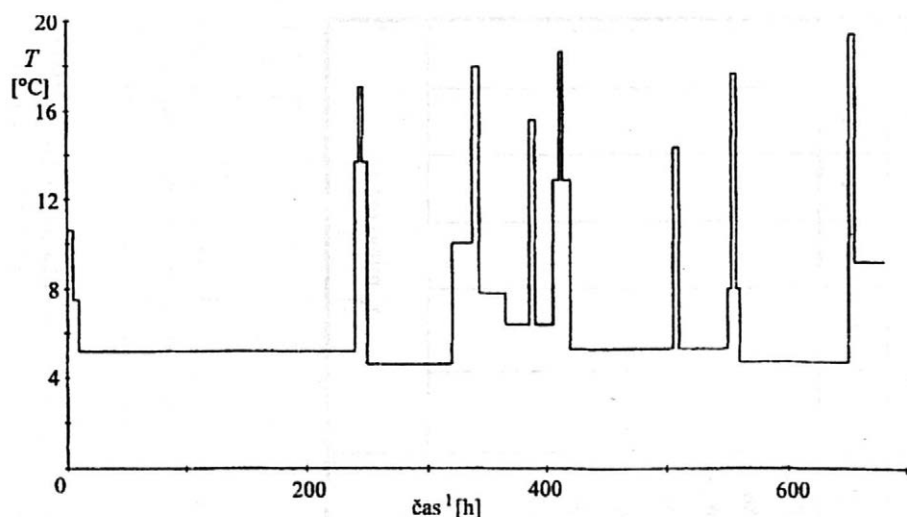
III. Predikce FMM potenciálního růstu mikroorganismů v log cfu/g v drůbežím salátu (pH = 5,1, a_w = 0,968 pro 10–20 °C) během distribuce – FMM prediction of possible microorganism growth in log cfu/g in chicken salad (pH = 5,1, a_w = 0,968 for 10–20 °C) during distribution

Čas ¹ [h]		T [°C]	<i>Salmonella</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>L. monocytogenes (lactic)</i>		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Clostridium perfringens</i>	
Cel-kem ²	inter-val ³		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
5	5	10,6					1	1,4	1	1,7	1	1,7						
10	5	7,5					1	1,4	1	1,7	1	2,6						
240	230	5,2					1	1,4	1	1,7	1	28						
243	3	13,7					1	3,1	1	5,1	1	29,7						
246	3	17,1					1	6,3	1	14,9	1	32,5						
250	4	13,7					1	8,5	1	19,4	1	34,5						
320	70	4,6					1	8,5	1	19,4	1	41						
337	17	10,0					1	12,5	1	24,1	1	46,1						
343	6	18,0					1	20,3	1,1	48,9	1	50,5						
365	22	7,8					1	20,3	1,1	51,1	1	54,8						
385	20	6,4					1	20,3	1,1	51,1	1	57,7						
390	5	15,6					1	24,4	1,1	61,6	1	61,5						
405	15	6,4					1	24,4	1,1	61,6	1	63,7						
410	5	12,9					1	26,7	1,1	65,8	1	66,2						
413	3	18,7					1	31,1	1,1	80,6	1	69,7						
420	7	12,9					1	34,3	1,1	86,6	1	73,2						

Čas ¹ [h]		T [°C]	Salmonella		Saccharomyces cerevisiae		Escherichia coli O157:H7		Staphylococcus aureus		L. monocy- genes (lactic)		Campylobacter jejuni		Clostridium botulinum		Clostridium perfringens	
Cel- kem ²	inter- val ³		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
505	85	5,3					1	34,3	1,1	86,6	1	82,8						
510	5	14,4					1	37,5	1,1	93,8	1	86						
550	40	5,3					1	37,5	1,1	93,8	1	90,5						
553	3	8,0					1	37,5	1,1	94,1	1	91,1						
557	4	17,7					1	42,4	1,1	>100	1	95,1						
560	3	8,0					1	42,4	1,6		1	95,7						
650	90	4,7					1	42,4	1,6		1	>100						
655	5	19,5					1	50,9	2,2		1,8							
680	25	9,2					1	50,9	2,7		2,4							
Poznámka ⁴			a_w mimo rozsah ⁵		$t = 21$ h $T > 17$ °C log cfu/g = 2,4								a_w mimo rozsah					

1 = log cfu/g; 2 = % lt

¹time; ²total; ³interval; ⁴notice; ⁵beyond the range

 ${}^1\text{time}$

4. Náhrada skutečného průběhu teploty schodovitou funkcí – Replacement of the real time temperature history by a step function

úseků a výše teploty (tab. I–III). Výsledná náhradní schodovitá funkce je uvedena na obr. 4.

IV. Aktivita vody a pH salátů (stanovení provedla OHES Kladno) – Water activity and pH value of salads (determined by Kladno District Hygienic and Epidemiologic Station)

Druh salátu ¹	$T [^{\circ}\text{C}]$	$a_w [-]$	pH [-]
Podzimní ²	5	0,987	3,87
	10	0,986	
	15	0,984	
	20	0,954	
Vlašský ³	10	0,985	4,5
	15	0,984	
	20	0,963	
	25	0,958	
Drůbeží ⁴	10	0,973	5,1
	15	0,972	
	20	0,960	
	25	0,938	

¹kind of salad; ²autumnal; ³Italia; ⁴chicken

V souvislosti s údaji v obr. 3 je důležité konstatovat, že výrobce předepíše skladování salátů při teplotách od 2 do 6 °C, a za tohoto předpokladu dává záruční dobu 4 týdnů (podzimní salát), resp. 3 týdnů (vlašský, drůbeží). Současně je nutné poznamenat, že saláty jsou konzervovány konzervanty kyselinou sorbovou a kyselinou benzoovou. Z údajů na obr. 3 vyplývá, že skutečné průběhy teplot zdaleka neodpovídají předepsanému režimu a naším úkolem bude zhodnotit nebezpečí nárůstu vybraných mikroorganismů modelovaných FMM při tomto průběhu teplot (bez ohledu na přítomnost konzervantů).

Naměřené hodnoty aktivity vody a pH jednotlivých druhů salátů jsou uvedeny v tab. IV.

K testování potenciálního růstu byly vybrány mikroorganismy, které jsou buď výrobcem přímo sledovány, nebo u nichž dané pH a aktivita vody jsou v rozsahu modelovatelného a tím prakticky možného růstu: *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (lactic), *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* a *Bacillus subtilis*.

Food Micromodel je zatím konstruován pro konstantní teplotu po celou dobu růstu. Použití pro nekonstantní teploty je možné za určitých podmínek. Tímto problémem se nedávno zabývali Baranyi et al. (1995), který ukázal, že toto modelování lze provést po částech.

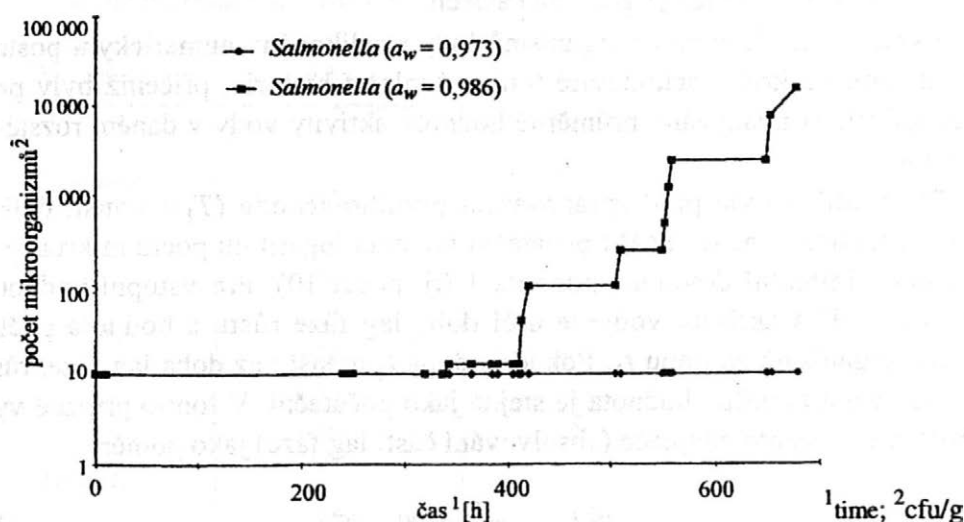
Hypotetické růsty mikroorganismů byly predikovány numerickým postupem krok po kroku schodovité funkce teplotní historie, přičemž byly pro jednoduchost uvažovány průměrné hodnoty aktivity vody v daném rozsahu teplot.

Při predikci byla před zpracováním prvního schodu ($T_1 = \text{konst}$, délka kroku t_1) dosazena do FMM počáteční hodnota logaritmu počtu mikroorganismů minimální dovolená hodnota 1 (tj. počet 10). Pro vstupní hodnoty teploty, pH a aktivity vody se určí doba lag fáze růstu a hodnota počtu mikroorganismů za dobu t_1 . Pokud je doba t_1 menší než doba lag fáze, růst nenastane a konečná hodnota je stejná jako počáteční. V tomto případě vypočteme procento adaptace (absolvování části lag fáze) jako poměr

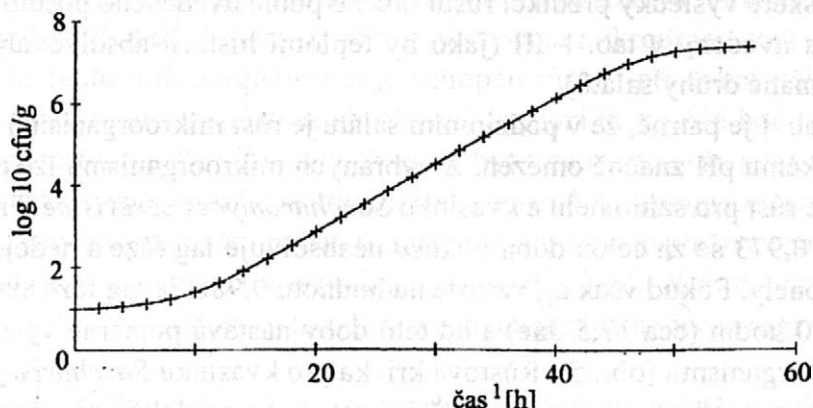
$$\% l t_1 = \frac{t_1}{\text{lag } t_1} 100 \quad (\%) \quad [1]$$

Pokud však nastane zvýšení počtu mikroorganismů na konci daného kroku, dosadíme tento počet jako výchozí pro další krok.

V příštím kroku provedeme predikci doby lag fáze pro teplotu T_2 a interval času t_2 a vypočteme poměr absolvování lag fáze podle rovnice [1]. Sečteme kumulativně tento poměr s předchozím a kontrolujeme, zda součet převyší 100 %. Pokud tato podmínka není splněna uvažujeme i v dalším kroku (nyní 3) s působením lag fáze a celý postup opakujeme včetně dosazení koncové hodnoty počtu z druhého kroku jako výchozí pro krok třetí. Pokud však je již lag fáze absolvována, je od dalšího kroku z predikce růstu vyloučena a to tak, že je nejprve lag fáze daného kroku vypočtena a poté přičtena k době trvání i -tého schodu t_i a pro tuto prodlouženou dobu predikce opakována a vypočten příslušný počet mikroorganismů. Nyní již v dalších krocích s lag fází neuvažujeme. Pokud by teplota v této fázi klesla pod teplotu růstu mikroorganismů, pak v dalších krocích bychom správně měli uvažovat s novou adaptační fází. Pro tyto skoky z oblasti růstu nemá FMM dostatečnou možnost predikce modifikované lag fáze (v závislosti na teplotě a době takového skoku mimo). Proto, chceme-li být na straně bezpečnosti, tyto vlivy zanedbáme a uvažujeme pouze, že v takovém skoku nenastává žádný růst mikroorganismů. V dalším kroku, který již růst mikroorganismů umožňuje, považujeme mikroorganismy za plně adaptované a neuvažujeme znovu lag fázi jako na počátku děje. Příklad tohoto postupu je uveden v tab. I u salmo-



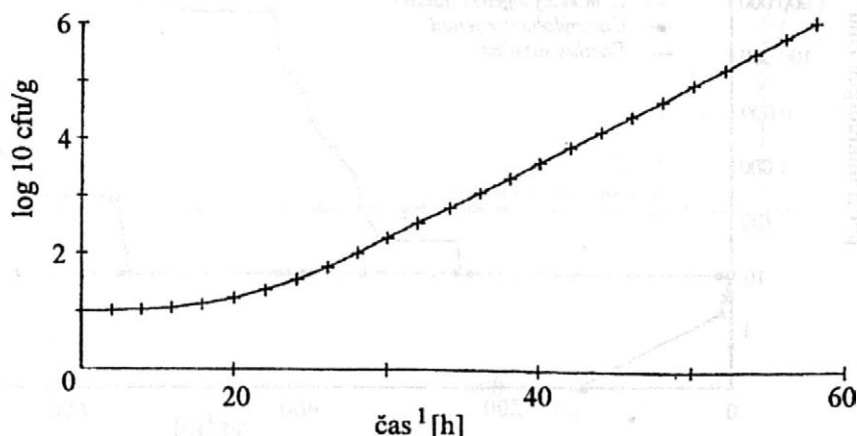
5. Predikce FMM potenciálního růstu mikroorganismů v podzimním salátu běhe distribuce
– FMM prediction of possible microorganism growth in autumnal salad during distribution

¹time

6. Růst *Saccharomyces cerevisiae* v podzimním salátu, $a_w = 0,986$, pH = 3,9 pro teploty vyšší než 17 °C po dobu 21 h, log cfu0 = 1/g – The growth of *Saccharomyces cerevisiae* in autumnal salad, $a_w = 0.986$, pH = 3.9 for temperatures higher than 17 °C for interval of 21 h, log cfu0 = 1/g

nely vypočtené pro $a_w = 0,986$ (od celkového času 505 hodin nastávají poklesy pod teplotu růstu, ale není uvažována nová lag fáze).

Pro modelování růstu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsme byli nuceni zvolit velmi přibližný postup, neboť FMM modeluje růst jen při teplotě 25 °C. Proto jsme z průběhů schodovité funkce teploty určili dobu, po kterou je teplota vyšší než 17 °C. Předpokládali jsme, že po tuto dobu byla konstantní teplota 25 °C. Vliv změn teplot na nižší hodnoty byl zanedbán.

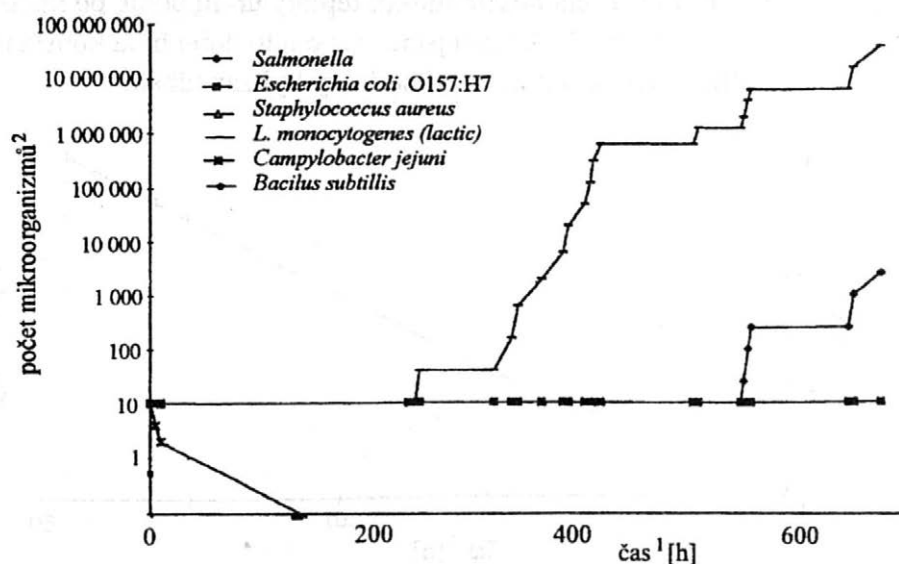
¹time

7. Růst *Saccharomyces cerevisiae* v drůbežím salátu, $a_w = 0,986$, pH = 5,1 pro teploty vyšší než 17 °C po dobu 21 h, log cfu0 = 1/g – The growth of *Saccharomyces cerevisiae* in chicken salad, $a_w = 0.986$, pH = 5.1 for temperatures higher than 17 °C for interval of 21 h, log cfu0 = 1/g

Veškeré výsledky predikcí růstu určené podle uvedeného postupu jsou pro pokus uvedeny v tab. I–III (jako by teplotní historii absolvovaly všechny zkoumané druhy salátů).

Z tab. I je patrné, že v podzimním salátu je růst mikroorganismů vzhledem k nízkému pH značně omezen. Z vybraných mikroorganismů lze modelovat pouze růst pro salmonelu a kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. Pro aktivitu vody 0,973 se za celou dobu pokusu neabsolvuje lag fáze a nedojde k růstu salmonely. Pokud však a_w vzroste na hodnotu 0,986, je lag fáze absolvována za 410 hodin (cca 17,5 dne) a od této doby nastává poměrně vysoký nárůst mikroorganismu (obr. 5). Růstová křivka pro kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* je uvedena na obr. 6, z níž je patrné, že po době expozice 21 hodin vzrostl celkový počet kvasinek z 10 na 1 000.

U vlašského salátu je situace poněkud horší vzhledem k značně vyšší hodnotě pH. Z tab. II je patrné, že potenciálně může růst salmonela, která absolvovala lag fázi při dané teplotní historii za 510 hodin (cca 21 dnů). *Escherichia coli* může být modelována, avšak za daných podmínek nevykázala žádný růst a absolvovala cca 56 % lag fáze. Podobné chování vykazuje i *Staphylococcus aureus*. Naproti tomu *Listeria monocytogenes* (model vyví-

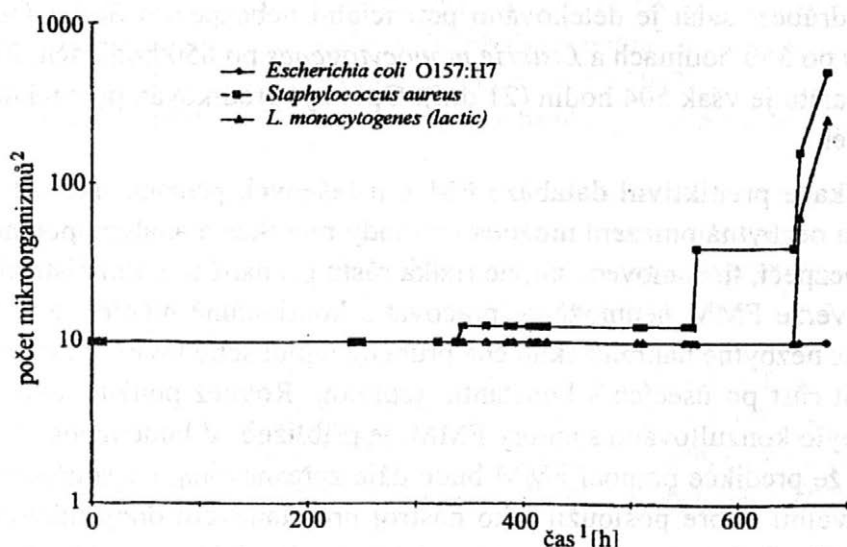


¹ time; ² cfu/g

8. Predikce FMM potenciálního růstu mikroorganismů ve vlašském salátu během distribuce
– FMM prediction of possible microorganism growth in Italian salad during distribution

nutý za přítomnosti kyseliny mléčné, avšak dosazena nulová hodnota koncentrace) vykazuje možný velmi rychlý nárůst počtu mikroorganismů. Je to dáno tím, že tento mikroorganismus je schopen růstu i při velmi nízkých teplotách. Tento mikroorganismus absolvoval lag fázi již za 246 hodin (cca 10 dnů). Naproti tomu *Bacillus subtilis* mohl být sice modelován avšak predikce nevykázala žádný nárůst počtu mikroorganismů. U *Campylobacter jejuni* je predikováno snižování počtu, tj. mikroorganismus nepřežívá (obr. 8). Růst *Saccharomyces cerevisiae* je prakticky totožný s predikcí růstu pro salát „podzimní“ (obr. 5) s tím, že v tab. II je uvedena přesná hodnota logaritmu výsledného počtu 2,8.

U drůbežního salátu (tab. III) je poměrně vysoká hodnota pH, avšak poměrně nízká hodnota aktivity vody, která zaručuje omezení růstu značného počtu mikroorganismů. *Escherichia coli* nevykazuje predikovatelný nárůst počtu po celou dobu pokusu (50 % absolvování lag fáze za 680 hodin). Zajímavé je, že v těchto podmínkách je predikován možný růst *Staphylococcus aureus* po absolvování lag fáze za 557 hodin (23 dnů). Rovněž u *Listerie monocytogenes* (*lactic*) je predikovatelný růst, avšak až po absolvování lag fáze za 650 hodin (27 dnů) – obr. 9.



¹time; ²cfu/g

9. Predikce FFM potencionálního růstu mikroorganismů v drůbežím salátu během distribuce
— FMM prediction of possible microorganism growth in chicken salad during distribution

Růst *Sacharomyces cerevisiae* je predikován poněkud odlišnou růstovou křivkou proti předchozím případům (obr. 7). Predikovaný konečný počet za 21 hodin je uveden v tab. III: $\log \text{cfu} = 2,4$.

Další výsledky pro podobný pokus včetně srovnání s počty mikroorganismů uvádějí Grée et al. (1997).

Závěry

Ukázalo se, že u podzimního salátu přichází v úvahu nebezpečí růstu salmonel a to při zvýšené hodnotě aktivity vody (tab. I). Z tabulky lze také usoudit na vliv aktivity vody na prodloužení lag fáze. Lze tedy prodloužit dobu trvanlivosti případnou změnou receptury salátu vedoucí ke snížení aktivity vody. Nelze zanedbat možný růst kvasinek.

U vlašského salátu se jeví možným potenciální růst salmonely až po 510 hodinách. Poměrně nebezpečným se za daných podmínek zdá možný růst *Listerie monocytogenes*, u níž je lag fáze absolvována po 246 hodinách. Růst kvasinek je možný.

Pro drůbeží salát je detekováno potenciální nebezpečí u *Staphylococcus aureus* po 550 hodinách a *Listerie monocytogenes* po 650 hodinách. Záruční doba salátu je však 504 hodin (21 dní). Opět byl predikován potenciální růst kvasinek.

Aplikace prediktivní databáze FMM u řešených případů ukázala i přes některá nezbytná omezení možnosti metody predikce a analýzy potenciálního nebezpečí, tj. stanovení stupně rizika růstu při dané teplotní historii. Současná verze FMM neumožňuje pracovat s kontinuálně měnící se teplotou. Proto je nezbytné nahradit skutečné průběhy teplot schodovitou funkcí a predikovat růst po úsecích s konstantní teplotou. Rovněž použití rovnice [1], které bylo konzultováno s autory FMM, je přibližné. V budoucnosti lze očekávat, že predikce pomocí FMM bude dále zpřesňována. I v současné verzi může velmi dobře posloužit jako nástroj pro stanovení doby údržnosti na základě fyzikálně chemických parametrů potravin (pH, a_w) a teplotní historie. Modelování lze využít i obráceně, tj. pro požadovanou dobu údržnosti a danou teplotní historii stanovit pH a a_w . Tyto parametry lze ovlivnit úpravou receptury.

Seznam symbolů

a_w	aktivita vody	[–]
cfu	počet mikroorganismů (jedinců na gram)	[–]
lagt	doba lag fáze	[s, h, dny]
T	teplota	[°C]
t	čas	[s, h, dny]
t_i	doba trvání i -tého teplotního schodu	[s, h, dny]
% t_i	procento absolvování lag fáze (adaptace mikroorganismů)	[%]
pH	kyselost	[–]

Literatura

- BARANYI, J. – ROBINSON, T. P. – KALOTI, A. – MACKEY, B. M.: Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. Int. J. Food Microbiol., 27, 1995: 61–75.
- GRÉE, R. – HOUŠKA, M. – LANDFELD, A. – KÝHOS, K. – MÍKOVÁ, K.: Teplotní historie zeleninových salátů v distribučním řetězci a odhad potenciálního růstu mikroorganismů. [Technická zpráva.] Praha, VÚPP 1997.
- HOUŠOVÁ, J. – HOKE, K.: Postupy přípravy hamburgerů z pohledu dosažených teplot. Výživa a potraviny, 1997 (v tisku).
- MATYÁŠ, Z.: Analýza nebezpečí a kritické kontrolní/ochranné body HACCP. Praha, Státní zdravotní ústav, Centrum hygieny potravinových řetězců v Brně 1993.
- MATYÁŠ, Z. – KOZÁK, A. – SOVJAK, R.: Podklady pro zavedení HACCP do zpracování masa a masných výrobků. Praha, Státní veterinární správa ČR a asociace veterinárních lékařů 1996.
- Mc CLURE, P. J. – BLACKBURN, C. de – COLE, M. B. – CURTIS, P. S. – JONES, J. E. – LEGAN, J. D. – OGDEN, I. D. – PECK, M. W. – ROBERTS, T. A. – SUTHERLAND, J. P. – WALKER, S. J.: Modelling of growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. Int. J. Food Microbiol., 23, 1994: 265–275.
- ŠRÁMOVÁ, H. – BENEŠ, Č.: Infekce a otravy z jídla. Praha, ÚZPI 1994.
- Food Micro Model Ltd, version 2, Randalls Road, Leatherhead. Surrey, KT22 7RY, United Kingdom, October 1996.

Došlo 17. 6. 1997

Summary

Thermal history of foods in a chain between producer and consumer can be the key factor which influences their quality and safety. The possible growth of microorganisms can be influenced also by water activity and pH of the specific food.

The main goal of this work was to determine of the real time temperature history of the packaged vegetable salads during transport and distribution. The registered temperature history is then used for prediction of possible growth of microorganisms using predictive database Food Micro Model (FMM). This software enables the prediction of the growth of selected pathogenic and spoilage microorganisms.

The time temperature history was measured for typical product and this history was applied to evaluation of possible risks of growth for other two types of salads.

We selected the vegetable salad autumnal (podzimní) packaged in the plastic cup (Fig. 1). The cups are placed in the paper tray (Fig. 2). Temperature sensor TINYTALK Pt100 (Gemini UK) was placed into the middle of the cup content. Second sensor was placed in the tray to measure the temperature of the ambient air.

The sensors were launched for one month of the measuring time. Thermometers were placed into the product at the end of the production line and were transported with products to the market place. The product was placed into the cooled room and offered during days to consumers on a bar with other products. During nights the products was stored in a refrigerated box. This regime is typical for small retail stores.

The time temperature history measured during the retail regime is shown in Fig. 3. The corresponding step function copying the measured graph is shown in Fig. 4. We need the step function representation for FMM which is designed only for constant temperatures. Tables I-III contain also the representation of the step function of the measured time temperature history.

The shelf life of 4 or 3 weeks is valid for salads assuming the storage temperature between 2-6 °C. Comparing the data in Fig. 3 we can see that the assumption of the producer is not fulfilled. There is a task to evaluate the danger of the possible growth for the real time temperature history. The measured water activities and pH values are shown in Table IV.

These parameters together with FMM can be used for predictions. We took into account the following microorganisms: *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (lactic), *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Theoretical growth of microorganisms was predicted by the method step by step using the step function defined in tables and using relation [1]. This relation evaluates the step of adaptation of microorganisms at local temperature (lag phase is absolved also step by step). If the sum of all the partial lag phases overcomes 100% we can say that the microorganism is adopted and make other predictions without taking into account the lag phase. If the temperature after this moment goes down

below the minimum growth temperature we say only that during this interval there is no growth but we will not take into account new necessary adaptation phase later (we say to be on the safe side of modelling), see the prediction of *Salmonella* growth with $a_w = 0.986$ (Table I).

For the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* we have chosen the raw calculation of the equivalent time at temperature 25 °C (because the FMM contains the model valid only for this temperature). We took into account only time intervals for which the temperature was above 17.5 °C. For that time we expected the temperature being 25 °C.

The prediction results are shown in Tables I–III. Table I shows that at low pH value (salad autumnal) the growth of microorganisms is limited. For that salad we modelled only the growth of *Salmonella* and *Saccharomyces cerevisiae*. If the salad exhibits water activity $a_w = 0.973$ the lag phase of the *Salmonella* is not finished during the time history. For salad of the same type having the water activity $a_w = 0.986$ the lag phase is finished after 410 hours followed by intensive stepwise growth (Fig. 5).

The Italian (vlašský) salad (mixture of vegetable pieces with sausage and mayonnaise) has the higher pH value than autumnal salad. The higher pH enables to grow *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* can be modelled but they did not show the growth (Table II). *Listeria monocytogenes* showed the biggest potential to grow because it is able to grow at low temperatures. Calculated predictions are shown graphically in Fig. 8.

Chicken salad (pieces of vegetables with pieces of chicken meat and mayonnaise) has the higher value of pH but the lower water activity than other products. The low water activity prevents the growth of *Salmonella* and prolongs the lag phases of other microorganisms (Table III). The only small growth was predicted for *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The graphical representation of predicted growth is shown in Fig. 9. The possible growth of *Saccharomyces cerevisiae* is shown in Fig. 7.

The application of FMM in real time-temperature history showed the potential of the method. This work showed the possibilities of risk assessment of potential growth of selected microorganisms during real time-temperature history. It was shown that for low acid salads there is a risk of the growth of *Salmonella* and other pathogens. Therefore the chemical preservatives are recommended to be used for marketed product. The prediction of growth of yeast showed the possible spoilage time if the product is exposed to elevated temperatures.

Kontaktní adresa:

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

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Životné jubileum Prof. Ing. Alexandra Dandára, DrSc.

1. novembra 1997 sa dožil 60 let popredný slovenský pedagogicko-vedecký a výskumný odborník Prof. Ing. Alexander Dandár, DrSc., vedúci Katedry sacharidov a konzervácie potravín, na Chemicko-technologickú fakultu Slovenskej technickej univerzity v Bratislave.

Oblasťou jeho pedagogicko-výchovnej činnosti je chémia a technológia potravín v širšom slova zmysle. Užšie sa najmä vo vedecko-výskumnej činnosti venoval problematike fyzikálno-chemickým procesom pri spracovaní cukrovej repy. V tejto problematike dosiahol veľmi významné výsledky v teórii čírenia cukrovarníckych štiav pod vedením akad. J. Vašátka. Prioritné výsledky svojich prác publikoval v početných našich i zahraničných periodikách a prezentoval na viacerých významných vedeckých zahraničných podujatiach. O aktuálnosti problematiky svedčí aj veľký počet citácií podľa SCI. Vo vedecko-výskumnej oblasti dosiahol postupne titul CSc. (1967) a DrSc. (1996).

Po skončení aspirantského štúdia (1967) sa stále viac zapájal do pedagogického procesu na Katedre sacharidov a konzervácie potravín. Prednášal postupne rad predmetov, napr. Chémiu sacharidov a sprievodných látok, Strojné zariadenia priemyslu sacharidov, Technologické výpočty a Špeciálnu cukrovarnícku technológiu. Neskôr prednášal nosný predmet Cukrovarnícka technológia. Vychoval veľký počet diplomantov (81) a aspirantov, resp. doktorandov. Jeho pedagogický rast bol dynamický – asistent (1966), odborný asistent (1967), docent (1980), profesor (1997). Pre pedagogickú prácu menovaného je samozrejmosťou, že svoje prednášky neustále dopĺňal o nové teoretické aj praktické poznatky z literatúry, ako aj o vlastné experimentálne podložené výsledky. Spolu so spolupracovníkmi napísal viacero vysokoškolských učebných textov. Jeho pedagogické kvality ocenili viaceré technické univerzity, napr. v Berlíne, Braunschweigu, Lódži a pod., kde pôsobil ako hosťujúci prednášateľ.

Prof. Dandár je neobyčajne aktívny v odborných a spoločenských organizáciách. Na prvom mieste treba uviesť jeho významnú funkciu viceprezidenta administratívneho a vedeckého výboru Celosvetovej organizácie technologov repných cukrovarov (C.I.T.S.), ďalej predsedu slovenského komitétu Medzinárodnej komisie pre cukrovarnícke jednotné analytické metódy (ICUMSA). Okrem toho zastáva funkciu predsedu Slovenskej spoločnosti pre poľnohospodárske, lesnícke, potravinárske a veterinárne vedy pri SAV. Zorganizoval niekoľko medzinárodných vedeckých konferencií.

Želáme Prof. Ing. Alexandrovi Dandárovi, DrSc., veľa pevného zdravia, vitality a energie do ďalšej práce. Nech ďalej šíri dobré meno vyspelosti nášho cukrovarníckeho priemyslu a cukrovarníckej školy.

Prof. Ing. A. Pribela, DrSc.

PŘEHLEDY

ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOSTI PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ A JEJICH SYNERGISTŮ*

Bohumil TUREK

Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika

Přírodní látky, kromě těch, které vykazují známé toxické účinky, se považují obecně za substance zdraví prospěšné. O látkách s antioxidačními účinky to platí dvojnásob.

Na druhé straně je třeba brát v úvahu jejich možné nepříznivé vlivy, které mohou přicházet v úvahu zejména při použití antioxidačních látek jako izolovaných substancí ve vyšším množství a nebo při použití většího množství výchozího přírodního substrátu, ve kterém se přirozené antioxidanty vyskytují.

Obdobně to platí také o jejich synergistech a umělých antioxidantech.

Přírodní antioxidanty

Do této skupiny patří především:

- tokoferoly (alfa, beta, gama, delta)
- karoteny (alfa, beta, gama)
- karotenoidy – lykopen
 - beta-cryptoxantin
 - lutein
 - canthaxanthin
 - zeaxanthin
 - další karotenoidy: auroxanthin, luteoxanthin, neoxanthin, violaxanthin
- retinol, retinal, kyselina retinolová
- kyselina askorbová
- polyfenoly – flavony a flavonoidy
- estery kyseliny galové
- guajaková pryskyřice
- kyselina nordihydroguajaretová

* Práce byla provedena v rámci úkolu podporovaného GA ČR č. 509/93/0419.

K umělým antioxidačním látkám řadíme m. j.:

- butylhydroxytoluen (BHT)
- butylhydroxyanizol (BHA)
- butylhydrochinon (TBHQ)
- propylgalát
- oktylgalát
- dodecylgalát
- estery mastných kyselin s kyselinou askorbovou (Diplock, 1991)

Mezi antioxidační látky patří též sloučeniny prvků, které jsou zastoupeny v antioxidačních enzymech, především selen (glutathionperoxidasa), zinek (membránová a plazmatická superoxiddismutasa), měď (membránová superoxiddismutasa) a mangan (plazmatická superoxiddismutasa). Vyšší dávky těchto prvků mohou být z hlediska zdravotní nezávadnosti problematické.

U selenu jde při vyšších dávkách (Albrecht, 1994) o možné karcinogenní účinky. Doporučená denní dávka pro selen, původně stanovená v rozmezí 50–200 µg byla např. v USA upravena na 55 µg u žen a 70 µg u mužů za den (Food and Nutrition Board, 1989). U mědi v iontové formě ve vyšších hodnotách dochází k urychlení řetězových reakcí volných kyslíkových radikálů. Také nízké hodnoty mědi jsou velmi rizikové. Pro uplatnění mědi jako součásti antioxidační ochrany lidského organismu (účast v membránové superoxiddismutase) je optimální denní dávka 2 mg, resp. 1 až 3 mg (Turnlund, 1994).

Ukazuje se, že i vzájemný poměr mezi zinkem a mědí je z hlediska výsledného efektu těchto látek významný.

K synergistickým látkám lze počítat: chelátotvorné látky (EDTA), kyselinu citronovou a její estery zejména citran monoizopropylový a citran monostearylový, kyselinu ortofosforečnou a její sole, lecitin.

Z výše uvedených látek můžeme považovat za bezpečné ze zdravotního hlediska kyselinu askorbovou a její estery (Niki, 1991). Přesto však se dávky nad 3–4 g již považují za nežádoucí, neboť způsobují zažívací potíže, průjem nebo hemochromatózu. Dávky kyseliny askorbové 4 g a vyšší mohou u některých osob zvýšit tvorbu a vylučování oxalátů se zvýšením rizika oxalátové nefrolithiasy.

Za látky prakticky netoxické je možné považovat karoteny, i když také u této skupiny se uvádí některé nepříznivé účinky. Jde však pouze o ukládání β-karotenu v kůži (karotenosa, karotenodermie) při hodnotách 350–400 µg ve 100 ml krve. K těmto hodnotám v krvi dochází při konzumaci 30 mg β-karotenu denně asi po dobu 1 měsíce nebo 15 mg denně po delší dobu (Underwood, 1989; Gerster, 1993).

K poměrně bezpečným látkám ze skupiny synergistů lze počítat lecitin a kyselinu citronovou, resp. citrany.

Ostatní antioxidační látky a synergenní látky mohou mít za určitých podmínek různé nepříznivé vlivy a mají pro své použití určitá omezení.

Retinol, retinal a kyselina retinolová – vitamin A a jeho metabolity vykazují při vyšších dávkách nepříznivé až toxické účinky. Vysoké dávky retinolu vyvolávají poškození jaterních buněk (jedná se o působení na buněčné membrány). Dávky vyvolávající toxický efekt dosahují hodnot 150 000–300 000 m. j. retinolu denně po delší dobu (měsíc a déle). Z klinických projevů se mohou vyskytovat též změny na pokožce, zažívací potíže, zvracení nebo průjem (Olson, 1983). Jednorázové podání většího množství vitaminu A nemusí mít nepříznivý efekt, závažnější je dlouhodobé působení vyšších dávek.

Ireverzibilním metabolitem retinolu i retinalu je kyselina retinolová. Vzniká oxidací těchto látek, ale ke zpětné redukci nemůže dojít. Kyselina retinolová si do určité míry zachovává vitaminový efekt, reguluje růst a diferenciaci různých buněk endodermálních, mesodermálních i ektodermálních. Ovlivňuje též embryonální vývoj. Při vyšších dávkách však vykazuje teratogenní efekt v experimentu u krysa a primátů (Eckhardt, Schmitt, 1994). Pokud se uvádějí teratogenní účinky retinolu, jde o působení kyseliny retinolové, případně jejích derivátů. Těhotným ženám se vyšší dávky vitaminu A nedoporučují (Underwood, 1989).

Karotenoidy ve vyšších dávkách ještě nejsou z toxikologického hlediska dostatečně ověřeny. Některé byly podezírány z toxických účinků již dříve, jako např. lykopen ve vztahu k poškození jater (Reich et al., 1960).

Vitamin E (α -tokoferol) je významnou antioxidační látkou. Tuto aktivitu vykazuje však pouze v lipofilním prostředí. Ve vodném prostředí má prooxidační efekt, pokud se nevyskytuje spolu s jinou silně antioxidační látkou. Také tento vitamin má určitá omezení. Vysoké dávky α -tokoferolu zvyšují hladinu cholesterolu u krysa, zvyšují obsah tuku v játrech a vyvolávají sklerotické změny v aortě u krysa. U lidí podávání 720 mg α -tokoferolu denně po delší době vyvolává slabost, narušení metabolismu steroidních hormonů a hemoragie. U starších lidí dávka 5 mg α -tokoferolu na kg tělesné hmotnosti za den může též zvyšovat hladinu cholesterolu (Würtzen, 1990).

Pro α -tokoferol je stanovena hodnota ADI (acceptable daily intake) 0,15–2 mg na 1 kg tělesné hmotnosti (TOX DATA FOOD, 1991). Dolní hranice ADI je v podstatě hodnota denní doporučené dávky pro α -tokoferol.

Antioxidační látky mohou modifikovat karcinogenní proces i při experimentálním podání karcinogenu. Ve většině případů antioxidační látky zasahují do metabolické aktivace karcinogenů (tvorba peroxidových vazeb, které umožňují kovalentní vazby s nukleovými kyselinami buněk a vznik adduktů) a tento proces inhibují a blokují.

V některých případech však dochází ke zvýšení karcinogenního efektu. Jde např. i o vitamin E, který zvyšuje tvorbu nádorů střev u myši po podání 1,2 dimetyl-hydrazin dihydrochloridu, ale i o další antioxidační látky jako např. kyselinu askorbovou,

ethoxyquin, včetně syntetických antioxidantů BHT a BHA, které mohou za různých podmínek riziko karcinogeneze zvyšovat, jak bylo prokázáno v experimentech na zvířatech (Kahl, 1986).

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolových látek, které tvoří dva fenolové kruhy a tři uhlíkaté řetězce. Jde o sekundární metabolity různých rostlin.

Flavony jsou velmi rozšířenou podskupinou flavonoidů, které se vyskytují v ovoci a zelenině.

Hydroxylované flavony byly mezi prvními přírodními látkami, u kterých byla prokázána mutagenní aktivita v Amesově testu. Dalšími studiemi byla mutagenní aktivita prokázána u více než třiceti přirozeně se vyskytujících flavonů (Mac Gregor, 1986). U některých byl zjištěn genotoxický efekt i na savčích buňkách. Mezi ně patří např. kvercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon) a kaempferol (3,4,5,7-tetrahydroxy-flavon), dále pak 5, 7, 8-hydroxy nebo -methoxy-flavony jako norwogonin (5,7,8-trihydroxyflavon), sexangularetin (3,4',5,7-tetrahydroxy-8-methoxyflavon) a limocitrin (3,4',5,7-tetrahydroxy-3',8-dimethoxyflavon). Obecně lze říci, že flavonoidy s mutagenní aktivitou jsou především takové, které mají volnou hydroxylovou skupinu na 3. a 5. pozici. Pokud je na pozicích 3, 4' a 5 místo hydroxylové skupiny metylová, je mutagenní aktivita blokována (Mac Gregor, 1986).

Mutagenní aktivitu vykazují, jak uvádějí Brown a Dietrich (1979), tyto flavonoidy: galangin, kaempferol, kvercetin, kvercitrin, dále velmi nízkou aktivitu vykazují též rutin, rhamnelin, morin, fisetin, robinelin, myricetin.

U savčích buněk kvercetin a příbuzné flavony vyvolávají lokální mutace, chromozomální aberace, výměny sesterských chromatidů (SCEs) a single-strand DNA zlomy (McGregor, 1984).

Karcinogenní účinky kvercetinu v pokuse *in vivo* u krys prokázal Pamuk et al. (1980). Při dávce 0,1 % kvercetinu v potravě pozoroval časté nádory střev a močového měchýře. Po dávce 2 % kvercetinu zjistili Ertrück et al. (1984) u krys vznik hepatomů. V jiných studiích byla též negativní zjištění, v jednom případě došlo k adenomu plic.

Zvýšený počet mutací na místě *hgprt* u fibroblastů V79 křečků vyvolává kromě kvercetinu též kaempferol (Maruta et al., 1982) a u ovariálních buněk křečků vyvolává mutagenní efekt kvercetin, kaempferol a galangin (Carver et al., 1983).

Kvercetin se vyskytuje v salátu (až 200 mg v kg), dále v menším množství v brokolici, růžičkové kapustě a borůvkách, přičemž však většina těchto rostlin má ve výsledném účinku efekt antikarcinogenní. Rutin, který nemá tak výrazné nepříznivé účinky, se vyskytuje zejména v pohance. K hydroxylaci rutinu a tvorbě kvercetinu může dojít endogenně působením mikroflóry trávicího ústrojí.

Mnohé karcinogenní látky vyžadují předchozí metabolickou aktivaci, aby mohly uplatnit svůj účinek. Flavonoidy, ačkoliv mají antioxidační efekt, indukují metabolickou aktivaci řady karcinogenů tím, že zvyšují účinek AHH aryl-hydrokarbon-hydrolasy (B u e n i n g et al., 1981). Jedná se zejména o flavony a metylované deriváty tangeretin a mobiletin.

Jiné flavonoidy naopak tlumí aktivaci karcinogenních látek ovlivněním mikrosomálních enzymů, zejména cytochromu P-460. V jejich antikarcinogenním účinku se uplatní antioxidační a imunomodulační efekt (Wiltrout, Hornung, 1988).

Taniny, pokud se definují jako komplexní polyfenolové sloučeniny, se vyskytují především v čaji *Camelia sinesis*. Obsah taninu v černém čaji dosahuje až 33 %, v zeleném od 4 do 10 % (Lay Woo, 1987). Určité množství taninů obsahuje též cider, kakao a červené víno. V jednom litru červeného vína se může vyskytovat až 1 g taninu. Průměrný denní příjem taninu u lidí se odhaduje na 400 mg.

Z experimentálních i epidemiologických studií u lidí vyplývá, že se tanin může podílet na vyšší incidenci nádorů jícnu. Doporučuje se podávat čaj s mlékem, zejména pokud je silný (Morton, 1986).

Guajaková pryskyřice, guajaková guma je poměrně bezpečná přírodní antioxidační látka. Toxikologické studie byly prováděny u řady experimentálních zvířat (např. krysy, kočky, psi), biochemické sledování bylo prováděno i u lidí. Hodnota NOEL pro krysu je 250 mg/kg tělesné hmotnosti (t. h.) a hodnota ADI je stanovena pro tuto látku na 0–2,5 mg/kg t. h. (TOX DATA FOOD, 1991). Guajaková guma je používána jako potravní aditivum.

Kyselina nordihydroguajaretová, derivát bispyrokatecholu, která byla též používána jako aditivní látka není dosud dostatečně toxikologicky zhodnocena. Není stanovena hodnota ADI a považuje se za možné, že při metabolismu přechází na odpovídající ortoquinony, které mohou vyvolávat u krysy mesenterální cysty. K tomu je třeba dodat, že krysy jsou na vznik těchto cyst náchylné (TOX DATA FOOD, 1991).

Syntetické antioxidanty a synergisty

Ze syntetických antioxidačních látek jsou z toxikologického hlediska významné butylhydroxytoluen – BHT, butylhydroxyanisol – BHA a propylgalát.

BHT je ve vyšších dávkách toxický, poškozují plicní tkáň, vyvolává hyperplazie a dystrofie v různých orgánech. V játrech zvyšuje proliferaci endoplazmatického retikula v buňkách a zvyšuje aktivitu mikrosomálních enzymů, což může mít význam i v metabolické aktivaci karcinogenních látek. Vyvolává též zvětšení štítné žlázy. BHT vykazuje karcinogenní, ale nikoliv mutagenní účinky. V onkogením procesu působí jako iniciátor i jako promotor. V experimentu u zvířat vyvolává především karcinomy jater a to již v dávkách 250 mg/kg. NOEL (no adverse effect level) byla

u BHT stanovena na 5 mg/kg t. h. V pozdějším hodnocení pro vyhlášení ADI byla použita hodnota NOAEL 25 mg/kg při bezpečnostním faktoru 200 a dočasně vyhlášena hodnota ADI 0–0,125 mg/kg (Würtzen, 1990).

BHA především poškozuje jaterní buňky, LOEL (lowest effect level) je 100 mg/kg t. h. a NOEL je 50 mg/kg t. h. BHA podobně jako BHT není mutagenní a v onkogenním procesu vykazuje podle podmínek jak inhibiční, tak promoční efekt. Původně stanovená dočasná hodnota ADI na 0–0,5 mg/kg t. h. byla v roce 1987 snížena na 0,3 mg/kg, ale v roce 1989 znovu upravena na 0,5 mg/kg t. h.

Pro propyl, oktyl a dodecylgalát byla v roce 1980 stanovena hodnota ADI 0–0,2 mg/kg t. h. a v roce 1987 upravena na 0–0,5 mg/kg t. h. Pro propylgalát byla v roce 1987 vyhlášena hodnota ADI 0–2,5 mg/kg t. h.

Propylgalát není mutagenní ani karcinogenní a inhibuje vznik nádorů po expozici N-nitrosaminům a dimethylbenzantracenu.

Většina uváděných nepříznivých vlivů antioxidačních látek a jejich synergistů byla experimentálně prokázána u zvířat.

Extrapolace pro podmínky v lidském organismu je obtížná. Výsledky experimentálních prací byly v některých případech aplikovány pro základní toxické údaje pro lidskou populaci ve formě ADI, případně další doporučení např. u vitaminu A – retinolu.

Literatura

ALBRECHT, R. – PÉLISSIER, M. A. – BOISSET, M.: Excessive dietary selenium decreases the vitamin A storage and the enzymatic antioxidant defence in the liver of rats. *Toxicol. Letters*, 70, 1994: 291–297.

BROWN, J. P. – DIETRICH, P. S.: Mutagenicity of Plant Flavonols in the Salmonella mammalian microsome test. *Mutat. Res.*, 66, 1979: 223–240.

BUENING, M. K. – CHANG, R. L. – HUANG, M. R. et al.: Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and Aflatoxin B₁ metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res.*, 41, 1981: 67–72.

CARVER, J. H. – CARRANO, A. V. – Mac GREGOR, J. T.: Genetic effects of the flavonols galanigin, kaempferol and quercetin on Chinese ovary cells *in vitro*. *Mutat. Res.*, 113, 1983: 45–60.

DIPLOCK, A. T.: Antioxidant nutrients and disease prevention: An overview. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1991: 189S–193S.

ECKHARDT, K. – SCHMITT, G.: A retinoic acid receptor alfa antagonist counteracts retinoid teratogenicity *in vitro* and reduced incidence and/or severity malformations *in vivo*. *Toxicol. Letters*, 70, 1994: 299–308.

- ERTRÜCK, E. – HATCHER, J. F. – NUNOYA, T. et al.: Hepatic tumors in Sprague Dawley and Fisher 344 female rats exposed chronically to quercetin or its glycoside rutin. *Cancer Res.*, 25, 1984: 95.
- GERSTER, H.: Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Inter. J. Vit. Nutr. Res.*, 6, 1993: 93–121.
- KAHL, R.: The dual role of antioxidants in the modification of chemical carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health, C 4* (1), 1986: 47–92.
- LAY, D. V. – WOO, Y.-T.: Naturally occurring carcinogens. *Envir. Carcin. Revs. (J. Envir. Sci. Hlth)*, C5, 1987: 121–176.
- MAC GREGOR, J. T.: Genetic and carcinogenic effects of plant flavonoids. In: FREIDMAN, M. (Ed.): *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety. Symp. of Food Safety, Metabolism and Nutrition, San Francisco. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 177, New York, Plenum Press 1984.
- MAC GREGOR, J. T.: Genetic toxicology of dietary flavonoids. In: KNUDSEN, I. – ALAN, R.: *Genetic Toxicology of the Diet*. New York, Liss Inc. 1986.
- MARUTA, A. – ISHEI, T. – UYETA, M.: Mutagenicity of quercetin and kaempferol on cultured mammalian cells. *Gann*, 70, 1982: 273–276.
- MORTON, J. F.: Potential carcinogenicity of herbal tea. *Envir. Carcin. Revs. (J. Envir. Sci. Hlth)*, C4, 1986: 203–223.
- NIKI, E.: Vitamin C as an Antioxidant. *World Review of Nutrition and Dietetics*. In: SIMOPOULOS, A. P. (Ed.): *Selected Vitamins, Minerals and Functional Consequences*. Basel, Karger 1991.
- OLSON, J. A.: Adverse effects of large doses of vitamin A and retinoids. *Semin. Onkol.*, 10, 1983: 290–293.
- PAMUKU, A. M. – YALCINER, S. et al.: Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilium*). *Cancer Res.*, 40, 1980: 3468–3472.
- REICH, P. – SCHWACHMANN, H. – CRAIG, J. M.: Lycopopenia: a variant of carotenemia. *New Eng. J. Med.*, 262, 1960: 263.
- TURNLUND, J. R.: Copper. In: SHILS, M. E. – OLSON, J. A. – SHIKE, M. (Eds.): *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia, Lea & Febiger 1994.
- UNDERWOOD, B. A.: Teratogenicity of Vitamin A. In: WALTER, P. – STÄHELIN, H. – BRUCHBACHER, G.: *Elevated Dosages of Vitamins*. NY-Bern-Stuttgart, Hans Huber Pubs. Toronto-Lewiston 1989.
- WIETROUT, R. H. – HORNING, R. L.: Natural products as antitumor agents: Direct and indirect mechanisms of activity of flavonoids. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 1988: 220–222.

WÜRTZEN, G.: Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: Antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.*, 28, 1990: 743–745.

FOOD and NUTRITION BOARD. National Academy of Science. Recommended Dietary Allowances. 10th ed. Washington, DC., National Academy Press 1989.

TOX DATA FOOD. Technoalimenti. Milano, OEMF 1991.

Safety of Natural Antioxidants and their Synergists

Possible negative effects of antioxidants have been evaluated in this paper. In general, they represent a group of substances with very beneficial effects in the human organism, and they substantially participate in decreasing risks of the origin of tumorous and cardiac-vascular diseases. Certain limitations and conditions are indicated in order to reduce opportunities for the origin of negative expressions that can appear when antioxidants are used.

Kontaktní adresa:

MUDr. Bohumil Turek, CSc., Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, Česká republika
tel.: + 420 2 6708 2317, fax: + 420 2 673 102 91

Bohačenko I., Veselý Z., Homolka P.: Aflatoxins in feed, the possibilities of feed detoxification and its influence on nutritive value – Aflatoxiny v krmivech, možnosti detoxikace a její vliv na nutriční hodnotu	363
Bohačenko I., Kopicová Z.: Influence of polychlorinated biphenyls on the content and composition of fatty acids in fish fat – Vliv polychlorovaných bifenylů na obsah a spektrum mastných kyselin v rybím tuku	173
Bubník Z., Korčáková I., Kadlec P., Štarhová H., Pour V., Uherek M.: Isolation of inulin from chicory root – Izolace inulinu z čekanky	49
Dostálová J.: Classification of foods in the Czech Republic – Klasifikace potravin v České republice	69
Dostálová J.: Classification of legumes and legume products – Klasifikace luštěnin a výrobků z luštěnin	261
Čížková H., Kubec R., Koplík R., Velíšek J., Davídek J.: Obsah selenu v některých zeleninách a možnost transformace netěkavých sloučenin selenu na těkavé produkty – Content of selenium in some vegetables	197
Ereifej K. I.: The level of cadmium, iron, tin, copper, zinc, nickel, lead and manganese in the tomato paste packed in glass jars, tin cans and sterilized pouches – Koncentrace kadmia, železa, cínu, mědi, zinku, niklu, olova a manganu v rajském protlaku baleném ve sklenicích, plechovkách a sterilizovaných sáčcích	187
Girotti S., Ferri E. N., Fini F., Righetti S., Bolelli L., Budini R., Lasi G., Roubal P., Fukal L., Hochel I., Rauch P.: Determination of microbial contamination in milk by ATP assay – Stanovení mikrobiální kontaminace mléka pomocí stanovení ATP	241
Greif G., Greifová M., Drdák M.: Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC – Determination of biogenic amines in foods from animal sources by HPLC method	121
Hajšlová J., Kosinková P., Kocourek V., Poustka J., Holadová K.: GC/MS procedure for analysis of synthetic pyrethroid residues in treated cereals – GC/MS metoda pro analýzu reziduí syntetických pyrethroidů používaných v obilninách	1
Holasová M.: Distribution of tocopherols and tocotrienols in the main products of wheat and rye milling – Distribuce tokoferolů a tokotrienolů v hlavních produktech mletí pšenice a žita	343

Houška M., Greé R., Kýhos K., Landfeld A., Míková K.: Teplotní historie zeleninových a lahůdkových salátů v distribučním řetězci a odhad potenciálního růstu mikroorganismů – Thermal history of vegetable salads in a distribution chain and assessment of potential growth of microorganisms	451	✓
Houšová J., Hoke K.: Mikrovlnný ohřev – vliv kovového obalu na rozložení teplot a rychlost ohřevu potravin – Microwave heating – the effect of metallic package on temperature distribution and rate of food heating	211	✓
Hozová B., Zemanovič J., Sklenářová Z.: Prediction of the growth inhibition of <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 953 demonstrated at an example of selected antimicrobials in milk – Predikcia inhibície rastu <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 953 demonštrovaná na príklade vybraných antimikrobiálnych látok v mlieku	81	
Hrnčířík K., Velíšek J.: Glucosinolate content of common Brassicaceae family vegetables – Obsah glukosinolátů v běžných zeleninách čeledi Brassicaceae	161	
Kalač P., Šlapetová M.: Mercury contents in fruiting bodies of wild growing edible mushrooms – Obsah rtuti v plodnicích volně rostoucích jedlých hub	405	
Kmínková M., Moučka Z., Kučera J.: Isolation and characterisation of the proteolytic enzymes of carp hepatopancreas – Izolace a charakterizace proteolytických enzymů v hepatopankreatu kapra	351	
Kocourek V., Tomanová M., Hajšlová J.: Stability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in some extraction solvents – Stabilita polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v některých extrakčních rozpouštědlech	91	
Koreňovská M., Zaušková O., Poláčeková O.: Distribúcia chrómu a niklu v mlieku – Distribution of chromium and nickel in milk	131	✓
Koreňovská M., Zaušková P.: Chróm a nikel vo výrobnom procese syrov – Chromium and nickel in production process of cheeses	289	✓
Kýhos K., Strohmalm J., Novotná P., Houška M., Štěpán M.: Stanovení pevnosti gelu obnovených tepelně opracovaných sušených vaječných bílků – Determination of gel strength in reconstituted hot roomed dried egg whites	391	✓
Málková K., Hochel I., Fukal L., Demnerová K., Rauch P., Škvor J., Poplštejn M., Wyatt G. M.: Porovnání a optimalizace metod stanovení salmonel pomocí enzymové imunoanalýzy – Comparison and optimisation of methods for determination of salmonellas by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays	419	✓
Mayer Z., Houška M.: Initial freezing point vs. composition of fruits – Počáteční bod tuhnutí a složení ovoce	329	✓
Pípek P., Dobiáš J., Soukup V.: The composition of modified atmosphere during storage of meat products – Složení modifikované atmosféry během skladování masných výrobků	249	
Pločková M., Chumchalová J., Tomanová J.: Antifungal activity of <i>Lactobacillus acidophilus</i> , CH5 metabolites – Antifungální účinek metabolitů produkovaných kmenem <i>Lactobacillus acidophilus</i> , CH5	39	

Pokorný J., Kalinová Z.: Effect of non-volatile flavour substances on the perceived intensities of volatile aroma substances – Vliv netěkavých chuťově aktivních látek na intenzitu vjemu těkavých aromatických složek	111
Prokúpková L., Novotná P.: Barva ovocných jogurtů – Colour of fruit yoghurts	375 ✓
Prošková A., Gottvaldová M., Kučera J.: Preparation and characterisation of a dextran-lysozyme conjugate – Příprava a charakterizace konjugátu dextran-lysozym	321
Sakurai H., Pokorný J., Nguyen H. T. T., Réblová Z., Valentová H., Ishii K.: Reaction of dehydroascorbic acid with aspartame – Reakce dehydroaskorbové kyseliny s aspartamem	13
Schwarz W., Brát J., Bromová H.: Influence of soaps on the course of rapeseed oil bleaching – Vliv mýdel na průběh bělení řepkového oleje	411
Šestáková H., Turek B., Šmerák P., Sedmíková M.: Chemiluminiscenční reakce u myši po ovlivnění rostlinnými látkami a vitaminy – Chemiluminescence reaction in mice after influencing with plant substances and vitamins	437
Šviráková E., Plocková M., Řiháková Z.: Influence of KH_2PO_4 on the concentration of nisin produced by <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> NIZO R5 – Vliv přísady KH_2PO_4 na absolutní produkci nisinu u kmene <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> NIZO R5	29
Turek B., Bárta I., Šmerák P., Kováčová E., Sedmíková M., Šestáková H.: Mutagenní aktivity některých látek rostlinného původu – Mutagenic activity of substances of plant origin	271 ✓
Volf M., Voldřich M., Votavová L., Vacek J., Kadlec P.: Colour changes during the processing of potato tubers – Barevné změny během zpracování brambor	101

PŘEHLEDY – REVIEW

Aubourg S. P.: Nutrient changes during fish canning – Změny živin při tepelné sterilaci ryb	229
Jankovský M., Staszková L., Holoubek J.: Lysozym – zajímavá bílkovina – Lysozyme – an interesting protein	297 ✓
Schwarz W., Svoboda Z., Slavičková V.: Palm oil – Palmový olej	147
Voldřich M., Pyš P., Opatová H.: Autenticita ovocných nápojů a metody identifikace falšování – Authenticity of fruit beverages, detection of falsification	307 ✓
Turek B.: Zdravotní nezávadnosti přírodních antioxidantů a jejich synergistů – Safety of natural antioxidants and their synergists	473 ✓

KRÁTKÁ SDĚLENÍ – SHORT COMMUNICATION

Pipek P., Kadaňová V., Bačo B., Březina P.: The use of organic acids for surface decontamination of poultry – Použití organických kyselin na dekontaminaci drůbeže	137
--	-----

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA – FROM THE SCIENTIFIC LIVE

Davídek J.: Symposium "Quality Assurance in Food Laboratories" Lisbon, 15–17 September 1996 [FECS Event No. 216]	237
Houška M.: Konference a workshop "Modelling of Thermal Properties and Behaviour of Foods during Production, Storage and Distribution" (Praha, 23.–25. června 1997)	317
Holasová M., Fiedlerová V.: XXVIII. sympozium o nových směrech výroby a hodnocení potravin	319

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Ingr I.: Profesor Stanislav Gajdůšek šedesátiletý	403
Príbela A.: Životné jubileum Prof. Ing. Alexandra Dandára, DrSc.	472
Velíšek J.: Životní jubileum prof. Ing. Jiřího Davídka, DrSc.	235

Instructions for authors

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

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

Text

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

Tables and Figures

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

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

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

Obsah – Contents

Kalač P., Šlapetová M.: Mercury contents in fruiting bodies of wild growing edible mushrooms – Obsah rtuti v plodnicích volně rostoucích jedlých hub.	405
Schwarz W., Brát J., Bromová H.: Influence of soaps on the course of rapeseed oil bleaching – Vliv mýdel na průběh bělení řepkového oleje	411
Málková K., Hochel I., Fukal L., Demnerová K., Rauch P., Škvor J., Poplštejn M., Wyatt G. M.: Porovnání a optimalizace metod stanovení salmonel pomocí enzymové imunoanalýzy – Comparison and optimisation of methods for determination of salmonellas by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.	419
Šestáková H., Turek B., Šmerák P., Sedmíková M.: Sledování chemiluminiscenční reakce u myší po ovlivnění rostlinnými látkami a vitaminy – Study of the chemiluminescence reaction in mice after influencing with plant substances and vitamins	437
Houška M., Greé R., Kýhos K., Landfeld A., Míková K.: Teplotní historie zeleninových a lahůdkových salátů v distribučním řetzcí a odhad potenciálního růstu mikroorganismů – Thermal history of vegetable salads in a distribution chain and assessment of potential growth of microorganisms	451
PŘEHLEDY – REVIEW	
Turek B.: Zdravotní nezávadnosti přírodních antioxidantů a jejich synergistů – Safety of natural antioxidants and their synergists	473
ŽIVOTNÍ JUBILEA	
Príběla A.: Životné jubileum Prof. Ing. Alexandra Dandára, DrSc.	472

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

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